

ラット小脳顆粒細胞におけるボツリヌス神経毒素及び一酸化窒素の作用

○津々木博康¹、居原秀²、幸田知子³、向本雅郁³、小崎俊司³¹大阪府大・理学系研究科、²大阪府大・総科・分子生物、³大阪府大・院・農学生命

[目的] ボツリヌス神経毒素(BoNT)は、SNARE-complexを切断することで神経伝達物質の放出を阻害する。一酸化窒素(NO)は神経伝達物質の放出制御を行い、LTP、LTDに関与していると考えられている。これまでに、BoNT、NOの作用を細胞レベルで解析した報告は少ない。本研究では、ラット小脳顆粒細胞の初代培養系を用い、神経伝達物質としてのグルタミン酸放出の解析およびSNARE-complex形成の解析を行うことで、ラット小脳顆粒細胞におけるBoNT、NOの作用を明らかにすることを目的とした。[方法] 小脳顆粒細胞は、7日齢ラットから小脳を摘出し、細胞をパパイニン酵素処理によって分離し、FCS、ウマ血清を含む培地で 2×10^6 cell / mlになるように調製した後、5%CO₂存在下、37°Cで5日間培養した。培養した顆粒細胞は、ボツリヌス神経毒素B型(BoNT/B)、及びNO発生剤であるNOC-7、NO合成酵素(NOS)阻害剤であるL-NAME、L-NMMAで処理した後、高濃度カリウムで脱分極刺激を行った。培地内に放出されたグルタミン酸は、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。また、各処理を行った顆粒細胞をサンプルとして、グルタミン酸放出に関与するSNARE-complexの形成を二次元SDS-PAGE、ウェスタンブロットによって解析した。[結果] 小脳顆粒細胞を5nMのBoNT/Bで処理した結果、脱分極により誘発されたグルタミン酸放出量は、未処理のものとは比べて、約10%にまで阻害された。また、1mMのL-NAME、L-NMMA処理では約138%まで促進され、1mMのNOC-7処理では約70%にまで阻害された。このことから、今回用いたラット小脳顆粒細胞において、BoNT/Bが神経伝達物質の放出を強力に阻害することが明らかとなり、さらにNOが阻害的に作用していることも明らかとなった。現在、BoNT、NO発生剤などで処理した顆粒細胞を用いた二次元SDS-PAGEとウェスタンブロットにより、SNARE-complex解析を行っている。