

課題番号	LS118
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	シナプス伝達における伝達物質制御メカニズムの包括的解明
研究機関・ 部局・職名	同志社大学・脳科学研究科・教授
氏名	高森 茂雄

1. 当該年度の研究目的

我々の脳高次機能は、複雑な神経回路を形成した脳内において、神経細胞同士がシナプスを介して相互にシグナルを伝えることで実現される。1950 年代の Katz らの研究成果から、シナプス伝達はシナプス終末からの一定の大きさを有した量子(= quanta)の放出によって喚起されることが示唆されているが、哺乳類中枢神経系における Quanta の制御機構・修飾機構に関する知見は乏しいのが現状である。本研究計画では、神経伝達物質をシナプス小胞内腔に輸送し、Quanta の形成における中核的な役割を果たす小胞型神経伝達物質トランスポーターの作働原理を解明し、シナプス伝達の修飾機構の一端を明らかにすることを目的とする。

神経伝達物質のシナプス小胞への輸送は、液胞型プロトン ATPアーゼ(V-ATPase)によって形成されるプロトン電気化学勾配を駆動力とする二次輸送である。しかしながら、プロトンによる電位勾配と pH 勾配が輸送を駆動する仕組みの詳細は解明されていない。本年度は、独自に開発したシナプス小胞内緩衝能測定法、シナプス小胞内プロトン・Cl⁻動態イメージング法を応用して、従来提唱されていた輸送モデルを再検証し、神経伝達物質輸送のメカニズムを明らかにする。

2. 研究の実施状況

神経伝達物質のシナプス小胞への再充填過程は、V-ATPase が形成するプロトン勾配に依存しているが、プロトンが如神経伝達物質トランスポーターを駆動するメカニズムに関しては論争が続いている。本年度の研究計画では、組換えトランスポータータンパク質のリポソーム再構成系や神経初代培養細胞を実験モデルとして用い、伝達物質再充填とプロトンやCl⁻の相関関係を詳細に解析してきた。本年度は、神経初代培養細胞における小胞内 pH 測定のプローブとして従来から広く用いられている pHluorin(pH 感受性 GFP)の問題点を改善し、以下の新しい知見を得た。

【1】伝達物質輸送の駆動力となる V-ATPase のキネティクス

pHluorin をシナプス小胞内腔に発現させることで、エンドサイトーシス後の小胞酸性化過程をモニターすると、時定数 τ が 0.5~5 秒であることが報告されている(Atluri P.P. & Ryan T.A., J Neurosci, 2006; Gandhi S.P., & Stevens C.F., Nature 2003 等)。しかしながら、pHluorin の pKa は 7.1 であることから、pH6 以下は検出限界となる。シナプス小胞内の pH は 5.7 程度と推測されているが、0.3 の pH 差はプロト

ン濃度に換算すると2倍の差となるため、小胞内酸性化を忠実に測定するプローブとしては適していない。この問題点を解決するために、mOrange2(pKa~6.5)を小胞タンパク質である Synaptophysin の小胞内腔部位に融合させ(Syp-mOr)、Atluri らの方法を用いてエンドサイトーシス後の酸性化を測定すると、蛍光減弱の時定数 | はこれまで報告されていた数値よりも 3-30 倍遅く、ヘルドのカリックスシナプスで測定されたグルタミン酸のシナプス小胞再充填過程と類似していた(Hori T & Takahashi T, Neuron, 2012)。また、シナプス小胞内腔のプロトン緩衝能を測定したところ、約 50mM/pH であった。従来は、小胞酸性化が少数のプロトン流入で迅速に起こり、その後にグルタミン酸再充填が続くと考えられて来た。今回の研究成果から、シナプス小胞の酸性化過程は約 1000 個のプロトンが時定数 | 15秒程度で進行する反応であり、グルタミン酸再充填と類似した時間経過を辿ることが示唆された(Egashira Y., et al., 投稿準備中)。

【2】グルタミン酸性小胞と GABA 性小胞のプロトン輸送の差異

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性神経伝達物質である GABA は、それぞれ特異的なトランスポーター(VGLUT と VGAT)によってシナプス小胞に濃縮されるが、その pH 依存性が異なることが示唆されてきた。本項目では、小胞内 pH プローブを用いて、含有する神経伝達物質を異にするシナプス小胞の内腔 pH とプロトン流入総量を定量した。興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを簡便に区別する為に、抑制性ニューロンのみ蛍光タンパク質を発現する VGAT-Venus マウス由来の海馬初代培養細胞を用いて Syp-mOr を用いた小胞内 pH 測定を行なった結果、グルタミン酸含有小胞と GABA 含有小胞では pH や緩衝能に大きな違いがあった(未発表データ故数値省略)。また、VGLUT1 欠損マウスではグルタミン酸を含まないにも関わらず野生型と pH が同一であった。これらの実験結果を総合すると、グルタミン酸含有小胞の方が GABA 含有小胞よりも約 5 倍のプロトンを取り込むことが判明した。シナプス小胞への総プロトン流入量は生後発達期で大きく変動することから、シナプス成熟の過程で伝達物質再充填分子機構が成立することが示唆された。これまでの研究では、グルタミン酸含有小胞と GABA 含有小胞の構成成分は、トランスポーターの違いを除いて酷似していることが示されていた。我々の発見は、両小胞では V-ATPase を含むタンパク質量が大きく異なることを示しており、その違いが異なる小胞再充填の駆動力を生み出す可能性がある(Egashira Y., Yanagawa Y, et al., 投稿準備中)。

【まとめ】

本年度は、小胞内 pH プローブを従来広く使用されていた pHluorin から mOrange に変えることで、小胞内酸性化のキネティクスや小胞内プロトン総流入量に関して、従来の知見と異なる発見に至った。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計1件
計1件	Takamori S. Directing Traffic into the Future: Vesicle identities in motion. Dev Cell, 27: 484, 2013.
	(掲載済み一査読無し) 計0件
	(未掲載) 計0件

様式19 別紙1

<p>会議発表</p> <p>計2件</p>	<p>専門家向け 計2件</p> <p>第1回少数性生物学研究会 招待講演 発表者:高森茂雄 発表標題:局所におけるイオン少数性問題 主催機関:新学術領域「少数性生物学」 開催期間:2013/7/11</p> <p>Janelia Conference on Synaptic Vesicle Biogenesis 発表者:ShigeoTakamori 発表標題:Determinants for glutamate loading and re-acidification of synaptic vesicles 主催機関:Janelia Farm research campus 開催期間:2013/10/13~16</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書</p> <p>計1件</p>	<p>Takamori S. Transport of amino acid neurotransmitters into synaptic vesicles. In 'Presynaptic Terminals'edited by Mochida S. Springer Publishing. in press.</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	
<p>国民との科学・技術対話 の実施状況</p>	<p>標題:「世界とつながる。英語でひろがる。サイエンス・ダイアログで、教室に未来がやってくる。」 実施日 2013/6/21 場所:福井県立若狭高校 対象者:高校2年生 内容:独立行政法人に本学術振興会サイエンス・ダイアログ事業において、外国人特別研究員が福井県立若狭高校にて講義を行う為、通訳として同行。日本語による補足解説を実施。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載</p> <p>計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	130,000,000	101,950,000	28,050,000	0	0
間接経費	39,000,000	30,585,000	8,415,000	0	0
合計	169,000,000	132,535,000	36,465,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	3,763,892	28,050,000	0	31,813,892	31,813,892	0	0
間接経費	0	8,415,000	0	8,415,000	8,415,000	0	0
合計	3,763,892	36,465,000	0	40,228,892	40,228,892	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,644,382	実験試薬、時間分解分光測定装置
旅費	324,360	学会発表(アメリカ、京都、鹿児島)
謝金・人件費等	9,172,847	研究員人件費
その他	1,672,303	実験施設使用料等
直接経費計	31,813,892	
間接経費計	8,415,000	
合計	40,228,892	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
時間分解分光測定 装置	TSP-1000-01型/株 式会社ユニソク製	1	11,959,500	11,959,500	2014/2/20	同志社大学
				0		
				0		