

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22700418

研究課題名（和文） 哺乳類中枢神経系におけるシナプス小胞神経伝達物質充填機構の解明

研究課題名（英文） Refilling rate of synaptic vesicles with glutamate in the mammalian presynaptic terminal

研究代表者

堀 哲也 (HORI TETSUYA)

同志社大学・脳科学研究科・嘱託研究員

研究者番号：70396703

研究成果の概要（和文）：哺乳動物中枢神経系での神経伝達物質のシナプス小胞内再充填時間をホールセル記録下で前末端内のグルタミン酸濃度を caged glutamate 光分解によって操作し、一旦枯渇した小胞が充填されるために必要な時間を求めた。小胞へのグルタミン酸充填時定数は 15 秒であり、1 分以内に神経伝達物質が再充填され、再利用可能になることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：At the excitatory presynaptic terminal, we measured the rate of vesicle refilling with glutamate by rapidly increasing cytosolic glutamate concentration using caged compound photolysis, after depleting vesicular glutamate by whole-cell dialysis. Vesicle refilling rate, assessed from postsynaptic currents, had a time constant of about 15s at room temperature, and filled within 1 min for next exocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス前終末, グルタミン酸, シナプス小胞, Calyx of Held

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質はシナプス前終末の微小細胞内器官であるシナプス小胞に充填され、神経細胞の興奮に伴って開口放出により放出された後、形質膜から回収、再利用され、再充填される。単離シナプス小胞へ放射ラベルされたグルタミン酸の充填時間を観測した先行研究では、シナプス小胞充填に数分かかることが報告されている。この速度は、生体内での早い神経伝達を実現するには不十分であると考えられる。このため、研究代表者

は単離されていない小胞の、神経前終末での充填時間を明らかにする目的で研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物中枢神経系での神経伝達物質のシナプス小胞内再充填時間と、充填を修飾するメカニズムを明らかにすることである。哺乳動物脳幹のグルタミン酸作動性シナプス前末端 calyx of Held は、大型なため、ホールセル記録下で前末端内のグル

タミン酸濃度を操作することによって、小胞内グルタミン酸濃度を変化させることが可能である(Ishikawa et al 2002)。本研究はこのシナプス前末端に、ピペット急速灌流法および caged glutamate を適用し、グルタミン酸濃度測定法、Cl⁻濃度測定法を併用して、小胞内と前末端細胞内のグルタミン酸濃度の経時間変化を追跡する。更に前末端における小胞充填時間の温度依存性と生後発達変化を明らかにする。

3. 研究の方法

哺乳動物の中樞神経細胞におけるシナプス前末端とシナプス後細胞から直接記録を行い、同時にシナプス前終末の細胞質組成を操作することで、シナプス小胞充填機構の直接的測定方法を確立する事が、本研究の最大の目標であり、特徴である。

具体的な方法としては、マウス脳幹の横断面急性スライス標本から、シナプス後細胞と巨大シナプス前末端 calyx of Held を直視下固定し、シナプス後細胞と前末端からの同時ホールセル記録を行うことで実現する。研究計画の1年目ではシナプス小胞充填速度の測定とその修飾機構を検討する。2年目には蛍光プローブを用いた測光実験を行い、1年目の実験結果と比較検討し、実験方法の妥当性を検証する。巨大シナプス部位に限定されない、あらゆる脳標本でのシナプス小胞充填過程の解析実験を可能にすることも視野に入れ、研究を展開する。

4. 研究成果

(1)シナプス小胞グルタミン酸充填速度の観測：生理的前末端濃度のグルタミン酸 (3-5mM;Ishikawa et al, 2002) の下に、一旦枯渇した小胞が充填されるために必要な時間を求めた。小胞へのグルタミン酸充填時定数は 15 秒であり、1分以内に神経伝達物質が再充填され、再利用可能になることを明らかにした。

(2) 小胞充填機構の温度依存性：記録温度を変えて、上記の実験を行った。生理的温度 (35° C) では充填時定数が約 8 秒に早まり、小胞充填の温度依存係数 Q10 は 1.8 であった。

(3) 小胞充填機構の生後発達変化：上記の実験を生後 7 日、14 日、21 日のマウスを用いて行った。充填時定数は、生後 7 日では約 40 秒、生後 21 日では 13 秒であり、生後発達に伴う小胞充填速度の促進が観測された。

(4) 小胞充填機構の Cl⁻濃度依存性：前末端ホールセル内液の Cl⁻濃度を変えて、上記の実験を行った。小胞充填速度は、前終末細胞質内の Cl⁻濃度が 30mM の時最大となり、高 Cl⁻濃度および低 Cl⁻濃度条件下では小胞充填速度と充填量の低下が観測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Tetsuya Hori, Tomoyuki Takahashi Refilling rate of synaptic vesicles with glutamate in the mammalian presynaptic terminal 北米神経科学会 2011 年 11 月 14 日 Washington DC convention center (Washington, DC アメリカ合衆国)

2. Tetsuya Hori, Tomoyuki Takahashi Neurotransmitter refilling rate of synaptic vesicles measured in the central presynaptic terminal 日本生理学会大会 2010 年 5 月 19 日 岩手市民文化ホール (岩手 日本)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 哲也 (HORI TETSUYA)

同志社大学・脳科学研究科・嘱託研究員

研究者番号：70396703