

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18397

研究課題名(和文)興奮性及び抑制性神経伝達物質によるシナプス小胞再充填機構の比較解析

研究課題名(英文)Comparative analysis of the mechanism underlying synaptic vesicle refilling with excitatory and inhibitory neurotransmitters

研究代表者

江頭 良明 (Egashira, Yoshihiro)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：80582410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳にはグルタミン酸作動性とGABA作動性の神経細胞が存在する。持続的神経伝達のためには、それぞれの伝達物質がシナプス小胞内に再充填されなければならないが、その機構は十分には分かっていない。本研究では、これらの伝達物質の再充填機構を知るために、培養海馬細胞でグルタミン酸シナプスとGABAシナプスを区別して小胞内pHをモニターした。シナプス小胞内腔に適したpHセンサータンパク質を用いることで、両者で有意なpHの違いがあることが分かった。またGABAの取込みの有無によるpH動態の違いから、GABAとH<sup>+</sup>の対向輸送が示された。またGABAの取込みの時定数はグルタミン酸に比べ数倍遅いことも分かった。

研究成果の概要(英文)：The mammalian brain consists of two major classes of neurons, glutamatergic neurons and GABAergic neurons. For sustained synaptic transmission, synaptic vesicles (SVs) are required to be recycled and refilled with each neurotransmitter using an H<sup>+</sup> electrochemical gradient. However, neither the mechanism nor the kinetics of vesicular refilling with both neurotransmitters in living neurons have been fully elucidated. To characterize vesicular uptake of these neurotransmitters into SVs, we monitored luminal pH of GABAergic SVs separately from that of excitatory glutamatergic SVs in cultured hippocampal neurons. By using a pH sensor optimal for the SV lumen, we found that GABAergic SVs exhibited an unexpectedly higher resting pH (pH 6.4) than glutamatergic SVs (pH 5.8). Comparison of luminal pH dynamics in the presence or absence of GABA uptake revealed GABA/H<sup>+</sup> antiport. Furthermore, the kinetics of GABA transport was slower (>20s) than that of glutamate uptake (~7s).

研究分野：神経生理学

キーワード：神経伝達物質 シナプス小胞 pHイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類中枢神経系では、グルタミン酸が興奮性シナプス伝達を、GABA が抑制性シナプス伝達を担っている。いずれの神経伝達物質も、シナプス小胞膜上にある液胞性 H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) によって形成された H<sup>+</sup>の電気化学的勾配を駆動力にして小胞内に充填される。小胞内の伝達物質量がシナプス伝達の最小構成単位になることから、グルタミン酸と GABA の小胞充填機構の違いは、脳の興奮性・抑制性を左右する最も基礎的な要素として関心を集めてきた。主に脳から精製されたシナプス小胞を対象に研究されてきたが、小胞内輸送の分子実体であるトランスポーター(グルタミン酸を輸送する VGLUT、GABA を輸送する VGAT) がクローニングされて以降は、精製した V-ATPase 及びトランスポーターを人工的な脂質膜に再構成した系による解析が進められてきた。しかし、グルタミン酸・GABA いずれの充填機構についても十分なコンセンサスが得られるには至っていない。図 1 のように充填に伴う H<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>の挙動について、複数の説が提唱されている(1)。

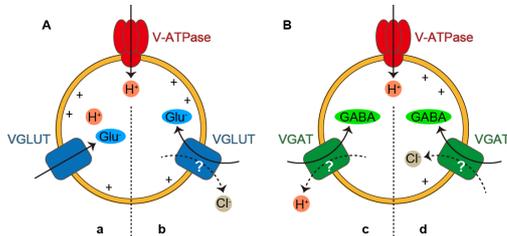


図 1. A. グルタミン酸 (Glu) の小胞充填モデル。VGLUT が Glu のみを輸送するモデル(a)と Cl<sup>-</sup>の排出を同時に行うモデル(b)。B. GABA の小胞充填モデル。VGAT が GABA と H<sup>+</sup>を対向輸送するモデル(c)と GABA と Cl<sup>-</sup>を共輸送するモデル(d)が提唱されている。

従来の *in vitro* における生化学的研究の問題点は、実験条件が必ずしも生理的条件を反映していないことである。事実、小胞内のイオン環境についてはほとんど分かっておらず、仮定のもとに研究が進められてきた。その結果が上述の混乱につながった可能性が大きい。そこで研究代表者は、所属研究室の高森茂雄教授らと共に、培養細胞下の機能的シナプスで、小胞内のイオン環境を定量的に記述することに取り組んできた。

近年の分子遺伝学ツールの発展により、各種イオンに対する多様なタンパク質プローブが開発されている。研究代表者はまず、シナプス小胞内 H<sup>+</sup>の正確な測定に適した pH 感受性蛍光タンパク質として mOraneg2 を選択し、シナプス小胞タンパク質の synaptophysin と融合させたプローブ (syp-mOr) を開発した。ウイルスにより syp-mOr を培養神経細胞に発現させることで、興奮性シナプス小胞の H<sup>+</sup>動態をライブ観察し、単一小胞あたり~1200 個の H<sup>+</sup>が時定数 15s の速度で輸送されるといった定量値

を初めて報告した(2)。これらの数値は従来の想定と異なる点が多く、機能的シナプスで小胞内イオン環境を定量することの重要性が浮き彫りになった。

## 2. 研究の目的

中枢神経系の機能は、興奮性シナプス伝達と抑制性シナプス伝達の正常なバランスの上に成立している。いずれのシナプス伝達も、それぞれの神経伝達物質が単一シナプス小胞内に充填された量(量子)を基本単位として行われているが、その量子の決定機構及び制御機構は、いずれの神経伝達物質についてもまだ十分に解明されていない。本研究では、興奮性及び抑制性神経伝達物質がシナプス小胞に再充填される機構の違いを明らかにする。特に、シナプス小胞再充填に伴う H<sup>+</sup>の挙動を培養神経細胞下で比較・解析することで、脳の興奮性と抑制性の制御に関わる最も基本的なレベルでの差異を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

シナプス小胞内 pH センサーである syp-mOr を海馬培養神経細胞に発現させ、小胞内 H<sup>+</sup>動態を蛍光ライブイメージングにより測定する。syp-mOr の蛍光は pH のみを反映したものであるが、小胞の H<sup>+</sup>バッファ能力を計測することで、pH 変動を H<sup>+</sup>総量の動態へ換算できることは代表者が興奮性シナプスですでに報告している(2)。この手法を抑制性シナプスに適用するために、群馬大学医学部の柳川教授らが作成した VGAT-Venus トランスジェニック (Tg) マウスを用いる。抑制性神経細胞は海馬培養細胞中で一割程度しか存在しないが、このマウスは抑制性神経細胞特異的に黄色蛍光タンパク質 Venus を発現しているため、橙色の syp-mOr の発現と合わせて、容易に抑制性シナプス終末を同定できる。

伝達物質の充填に依存した H<sup>+</sup>の挙動を解析するためには、小胞充填がない状態の H<sup>+</sup>動態と比較しなくてはならない。そのために、VGAT を Cre recombinase 依存的に欠損できる VGAT-flox ノックイン (KI) マウス(柳川教授より提供)を用いる。この KI について homozygous かつ VGAT-Venus Tg であるマウスから培養細胞を作成し、そこにレンチウイルスベクターにより Cre recombinase と syp-mOr を同時発現させることで、VGAT を欠損する GABA 性シナプス小胞での H<sup>+</sup>解析を行う。グルタミン酸の輸送に依存した H<sup>+</sup>動態を解明するためには、VGLUT1 KO マウス(ドイツ Max Planck 研究所・Nils Brose 博士より提供)を用いた解析を行う。

## 4. 研究成果

<抑制性神経伝達物質 GABA のシナプス小胞再充填機構>

興奮性シナプスを対象とした先行研究から小胞の再酸性化における H<sup>+</sup>動態がグルタミン酸の再充填と関連している可能性が示唆された(2)。充填機構が異なる可能性のある GABA を取り込む抑制性シナプス小胞では、その再酸性化の様相がそもそも異なるかもしれない。もしそうであれば、それらの違いから、グルタミン酸と GABA の小胞充填機構、特に H<sup>+</sup>との共役様式について知見が得られるだろう。そこで、興奮性と抑制性のシナプス終末を区別して、同様の mOrange2 による小胞内 pH ライブイメージングを適用することにした。

抑制性神経細胞特異的に黄色蛍光タンパク質の Venus を発現する VGAT-Venus トランスジェニックマウスの培養海馬神経細胞を用いることで、同一視野内の興奮性・抑制性両シナプスで同時に小胞内 pH イメージングを行ったところ、2つのシナプスで mOrange2 の蛍光強度に明らかな違いが見られた(図2)。

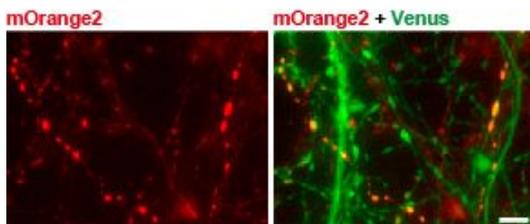


図2. VGAT-Venus トランスジェニックマウス由来の海馬培養神経細胞とそのシナプス小胞内に発現させた mOrange2 の蛍光画像。mOrange2 の蛍光強度の強いシナプス終末は Venus の蛍光を持つ軸索上にあり、抑制性シナプス終末であることがわかる。scale bar: 5μm。

静止状態の小胞内 pH を算出すると、グルタミン酸性シナプス小胞が pH~5.8 であったのに対し、GABA 性シナプス小胞は pH~6.4 と有意に高かった。この違いはかなり明確なものであったが、pKa の高い pHluorin の蛍光で見ると顕著な違いとしては現れないため、これまで見過ごされてきたと思われる。つまり、mOrange2 をプローブとして用いたことで初めて示された事実である。では、GABA あるいはグルタミン酸を取り込んでいる時の小胞内 pH 動態に違いはあるだろうか？この点を調べるために、電気刺激によってエキソ・エンドサイトーシスを起こした時の mOrange2 の蛍光変化をイメージングした。興奮性のシナプス小胞では、エンドサイトーシス後、その静止状態の pH に向かって酸性化が起きるだけであるが、驚いたことに、抑制性シナプス小胞では、その静止状態の pH よりも深い pH (~6) まで酸性化が進行し、そのあとでゆっくりとしたアルカリ化が生じていることが明らかとなった。つまり GABA を取り込む小胞は、酸性化とアルカリ化の合わさった二相性の pH 変化を示す。

GABA 小胞で見られるこの特徴的な pH 動態は、GABA の取込みに関連しているだろうか？この可能性を検証するために、VGAT をコンディショナルノックアウトした培養細胞で同様の pH イメージングを行った。VGAT を欠損した抑制性神経細胞は当然ながら GABA による抑制性の応答を引き起こさない。VGAT<sup>-/-</sup>の GABA シナプスで静止状態の小胞内 pH を測定すると pH~6 とより酸性になっていることが分かった。VGAT の発現をレスキューすると、もとの pH~6.4 に戻ることから、GABA の取込みが小胞内をアルカリ化していると考えられる。このことを裏付けるように、VGAT<sup>-/-</sup>では電気刺激後の二相性の蛍光変化が消失して興奮性シナプスと似たような応答を示した(図3 A, B)。

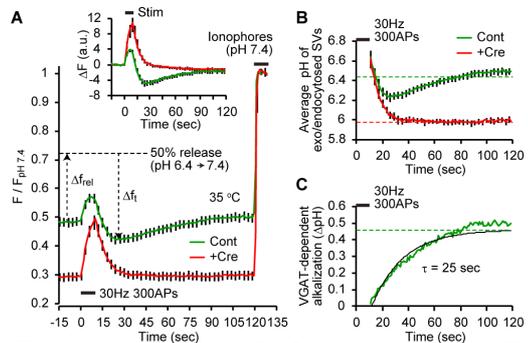


図3. A, VGAT flox KI 神経細胞を用いて、GABA の取込みの有り (Cont) 無し (+Cre) で電気刺激ともなう Syp-mOr の蛍光変化を比較。GABA の取込みがあると刺激後に一過性のオーバーシュートが見られる。B, 蛍光変化を pH 変化に変換した。GABA シナプス小胞の高い pH は刺激後のアルカリ化によることわがる。C, アルカリ化の成分のみを抽出し、経時変化を求めた。時定数 25 秒は GABA の充填速度を反映していると考えられる。

また我々は、mOrange2 の持つ pH 定量性を活かして、VGAT<sup>+/+</sup>と VGAT<sup>-/-</sup>の小胞内 pH 動態の比較から GABA の取込みに依存したアルカリ化の成分を抽出することを行った。その結果、シナプス終末にある全小胞の約半分を動員するような刺激の後で、生理的温度において、時定数 25 秒で小胞のアルカリ化が起きていることが分かった(図3 C)。この速度は GABA の充填速度そのものであると考えられるが、グルタミン酸の取込み速度(生理的温度では 7 秒 9))と比べると大変遅い。このことから、高頻度発火時の抑制性シナプスでは、GABA の再充填過程が持続的シナプス伝達の維持にとって律速となる可能性も示唆された。

以上の結果を図4に要約した。GABA の小胞再充填機構について第一に言えることは、GABA の流入が H<sup>+</sup>の流出と共役しているということである。プロテオリポソームを用いた研究から VGAT が GABA/Cl<sup>-</sup>の共輸送体とする説が提唱されているが(3)、今回の結果は、生きた神経細胞内においては H<sup>+</sup>との対向輸送が行われていることを強く支持している。また、小胞内の一定以上の酸性化が

VGATの機能に必要なことや、定常状態でも小胞からのGABAは漏出し、小胞内GABA量の維持には継続したGABA輸送が必要であることを示唆されるが、これらのことも過去の報告とよく一致している(4)。

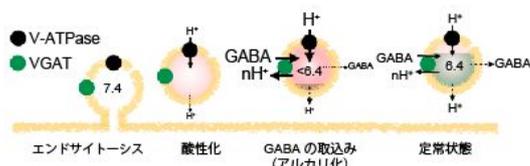


図4. シナプス小胞内のpH変化とGABAの再充填過程を模式的に示す。

<培養神経細胞で興奮性細胞特異性をもつウイルスベクターの作成>

VGAT欠損細胞を用いることでGABAの小胞充填がH<sup>+</sup>との対向輸送であることが示されたように、VGLUT1欠損細胞で同様のシナプス小胞内pH測定を行うことで、グルタミン酸の取込みにともなうH<sup>+</sup>の挙動が分かると考えられる。そのためにVGLUT1 KOマウスを利用するが、当然上記の研究と同じように興奮性・抑制性の区別をしなくてはならない。ここで問題となったのが、homozygousでの維持が不可能なVGLUT1 KOマウスとVGAT-Venusのダブルトランスジェニックを作成することは、実験の効率を大きく制限するということである。そこで、VGLUT1 KOの興奮性シナプスに限定したイメージングを容易にするために、興奮性神経細胞に選択的に遺伝子発現を引き起こすウイルスベクターの開発を第一に行うことにした。

上述の研究で使用してきたウイルスベクターはヒトsynapsin Iプロモーターで遺伝子発現を誘導する。このプロモーターは成体マウスのin vivo脳では興奮性神経細胞に選択性を持つことが報告されているが、培養神経細胞では抑制性神経細胞にも遺伝子発現を引き起こしていた。in vivo脳で興奮性神経細胞特異性を示すプロモーターとしてはαCaMKIIプロモーターも知られている。まずはこれらのプロモーターが培養海馬神経細胞ではどの程度興奮性神経細胞に特異性を示すのか、VGAT-Venusトランスジェニックマウス由来の細胞に赤色蛍光タンパク質を発現させることで定量解析した。その結果、いずれのプロモーターも培養細胞ではGABA神経細胞の7-9割に遺伝子発現を起こしており、興奮性神経細胞特異性はあまりないことが分かった。

そこで次に、培養下でより興奮性神経細胞特異性を示すプロモーターの探索を行った。海馬興奮性神経細胞特異的に発現する3つの遺伝子の転写開始点上流のゲノム配列を候補として利用したところ、VGLUT1の上流2.1kbの配列が最も高い選択性を示した。

GABA神経細胞での発現は2割以下であり、また発現しているGABA性神経細胞での発現量はグルタミン酸性神経細胞での発現量に比べ大幅に少なかった(図5)。

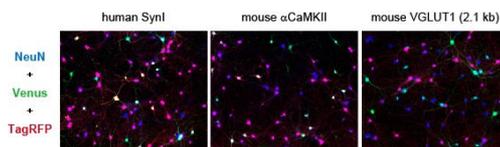


図5. VGAT-Venus培養海馬神経細胞に各プロモーターをもつレンチウイルスでTagRFPを発現させた。NeuNは全ての神経細胞を示す。3色重なって白色に見える細胞が遺伝子発現しているGABA細胞を示す。Synapsin IやαCaMKIIのプロモーターに比べVGLUT1プロモーターでは白色の細胞が少ない。

これらの結果を支持するように、VGLUT1プロモーターによってチャンネルロドプシンを培養神経細胞に発現させ、光刺激によって発生するシナプス応答を記録したところ、興奮性シナプス伝達は生じているが抑制性シナプス伝達はほとんど生じていなかった。同様の実験をSynapsin Iプロモーターを使って行ったところ、記録した全ての細胞で抑制性シナプス応答が記録されたことから、VGLUT1プロモーターを利用することで興奮性神経細胞特異性が飛躍的に向上することが明確となった(図6)。以上の結果は現在論文として投稿中である。

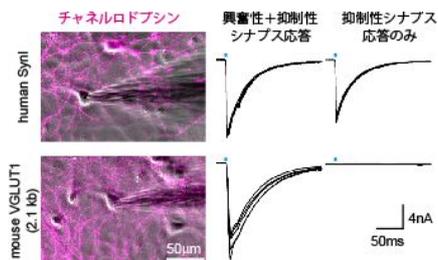


図6. 海馬培養神経細胞にSynapsin IまたはVGLUT1プロモーターでチャンネルロドプシンを発現させた。光刺激(トレース上の青いバーの所で照射)をすると、いずれのプロモーターでも応答が見られる(トレース左側)。しかしグルタミン酸受容体の阻害剤を加えて抑制性シナプス応答のみを記録すると、VGLUT1プロモーターの条件では応答が見られない(トレース右側)。

#### 参考文献

1. Edwards, R.H. (2007) *Neuron*, **55**, 835-858.
2. Egashira, Y., Takase, M. & Takamori, S. (2015) *J. Neurosci.*, **35**, 3701-3710.
3. Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H. & Moriyama, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 35073-35078.
4. Hell, J.W., Maycox, P.R. & Jahn, R. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2111-2117.

#### 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 2件)

1. 江頭良明、高森茂雄  
神経伝達物質のシナプス小胞内輸送機構  
生化学 89巻6号、2017、856-860  
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890856

2. Egashira Y, Takase M, Watanabe S,  
Ishida J, Fukamizu A, Kaneko R,  
Yanagawa Y, Takamori S.  
Unique pH dynamics in GABAergic  
synaptic vesicles illuminates the  
mechanism and kinetics of GABA loading.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2016; 113,  
10702-10707.  
doi: 10.1073/pnas.1604527113.

〔学会発表〕(計 1件)

Yoshihiro Egashira, Yuchio Yanagawa and  
Shigeo Takamori  
Lentiviral vectors carrying Tet-Off system  
driven by vesicular glutamate transporter  
1 promoter preferentially transduce  
excitatory neurons in cultured  
hippocampal neurons.  
JSPS Core-to-Core Symposium  
“Nanobiology of neural plasticity based on  
optical nanoscopy”  
Doshisha Biwako Retreat Center, Otsu,  
Japan. Nov. 29 – Dec. 1, 2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
江頭 良明 (EGASHIRA Yoshihiro)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80582410

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )