

同志社大学

2015年度 個人研究費研究経過・成果報告書

2016年2月15日提出

所 属	職 名	氏 名
脳科学研究科	教授	高森 茂雄
研 究 題 目	少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析	
研 究 成 果 の 概 要	<p>神経伝達物質のシナプス小胞への再充填は、シナプス伝達に必要な不可欠な過程である。シナプス小胞膜には、神経伝達物質に特異的なトランスポーターが存在し、小胞内外のプロトン勾配を利用する。ニューロンにおいて、シナプス小胞内の pH は約 5.6 程度に酸性化していると報告されているが、直径 40 nm のシナプス小胞内には実質的に遊離プロトンは存在しない計算となる。一方、神経伝達物質は 1,000-2,000 個と見積もられており、実質 1 つも存在しないプロトンが 1,000-2,000 の基質輸送を達成できる機構の理解は重要である。本年度は、昨年度に開発した pH プローブを利用して、興奮性伝達物質を含むグルタミン酸性小胞と抑性伝達物質を含む GABA 性シナプス小胞のプロトン動態を定量的に解明するための実験を行い、以下の実験結果を得た。</p> <p>【1】 GABA 性小胞内 pH は驚くほど高い：従来、シナプス小胞をはじめとした分泌小胞内の pH は 5.6-5.8 程度まで酸性化されていると考えられていた。今回、GABA 作動性ニューロン特異的に Venus 蛍光タンパク質を発現するマウス(VGAT-Venus マウス)から得られた海馬神経細胞に pH プローブを発現させ、その小胞内 pH を測定したところ、GABA を含む小胞の内腔 pH は約 6.4 であった。また、小胞内緩衝能はグルタミン酸性小胞が 56mM/pH であるのに対し、GABA 性小胞は 23mM/pH 程度であった。</p> <p>【2】 GABA 性小胞内 pH は特徴的なプロトン動態を示す：電気刺激中及び刺激後の GABA 性小胞内 pH の動態を継時的に測定した結果、グルタミン酸性小胞とは異なり、一時的な過酸性化に引き続きアルカリ化を経て定常状態の pH(6.4)に到達することがわかった。</p> <p>【3】 GABA 性小胞の特徴的なプロトン動態は GABA 再充填の結果である：上記で得られた GABA 性小胞内 pH の特徴が GABA 輸送と関係するかどうかを検証するために、VGAT 欠損ニューロンにおける pH イメージングを行った。その結果、VGAT が無い小胞では、一過性の過酸性化は見られず、pH6.0 まで酸性化されることがわかった。</p> <p>【1】～【3】の結果から、GABA のシナプス小胞への再充填は VGAT による GABA/H⁺交換輸送によって行われること、VGAT の活性化には小胞内が酸性化されることが重要であること、定常状態においても内腔の GABA は漏れやすいため、GABA 含有量を一定に保つためには、GABA/H⁺交換輸送が随時行われている必要があること等、GABA 再充填・維持機構が明らかとなった。この成果は、論文投稿中である(Egashira et al., submitted)。</p>	