

# 同志社大学

## 2014年度 個人研究費研究経過・成果報告書

2015年 3月 17日提出

所 属	職 名	氏 名
高等研究教育機構	特定任用研究員 (助教)	江頭 良明
研 究 題 目	シナプス小胞の塩化物イオン動態の解析に基づく伝達物質充填機構の解明	
研 究 成 果 の 概 要	<p>神経伝達はシナプス小胞内に貯蔵された神経伝達物質がシナプス間隙に放出されることを介して成立している。したがって、どのようにして神経伝達物質がシナプス小胞に充填されるかは重要な問題であり、アセチルコリンやモノアミンについては解明されている。しかし、グルタミン酸については、中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質でありながら、その小胞充填機構は不明である。これまでの研究により、グルタミン酸の充填にともなって、小胞内の pH および塩化物イオン濃度が変化することが示唆されている。ただし、それらの定量的な解析はなく、グルタミン酸充填機構を議論する材料としては不十分であった。そこで本研究では、培養神経細胞のシナプスでの小胞内 pH および塩化物イオン濃度を定量的に測定することを目指す。また、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)を欠損したノックアウトマウスの培養神経細胞についても同様の測定を行い、グルタミン酸充填と小胞内のイオン動態の関連を明らかにする。シナプス小胞の酸性化については、pH 感受性のある緑色蛍光タンパク質改変体(pHluorin)を用いてモニターできることがすでに知られており、その時間経過等は報告されている。しかし、pH 変化を定量的に測定することを目的とした場合、従来使われている pHluorin では正確な測定が困難であることがわかった。これは、pHluorin の pKa が小胞の最終的な pH に対して比較的高いことに由来する。そこで我々は、小胞内 pH 測定により適した蛍光タンパク質として mOrange2 を選び、これを小胞タンパク質である synaptophysin に融合させたプローブを新規に作成した。このプローブを用いて解析したところ、小胞の酸性化過程は以前に pHluorin によって見積もられていたよりも 3 倍程度遅いことが判明した。また、小胞内のバッファリングキャパシティを見積もることで、輸送される H<sup>+</sup>の総量が従来の想定よりもはるかに多いことも明らかにした。この事実は、シナプス伝達の維持機構の研究にとって重要な知見であるため、mOrange2 を用いたプローブの有用性ととも論文として報告した。現在は、このプローブを用いて、VGLUT1 を欠損した小胞の pH 測定等を行っている。これまでに、VGLUT1 の有無は小胞内 pH 及び酸性化の時間経過には影響しないが、小胞内バッファリングキャパシティに影響することが分かっている。また、塩化物イオン濃度の測定については、共同研究による最適なプローブの開発を含め、解析系の立ち上げを行っている。</p> <p>発表論文 Egashira Y, Takase M and Takamori S. (2015) Monitoring of Vacuolar-Type H<sup>+</sup> ATPase-Mediated Proton Influx into Synaptic Vesicles. J Neurosci. 35(8):3701-10.</p>	