みにれびゅう

# 神経伝達物質グルタミン酸のシナプス小胞再充填速度の実測

堀 哲也

#### 1. はじめに

化学シナプスでは神経伝達物質がシナプス小胞の開口放出により放出される。開口放出の後、小胞は形質膜からエンドサイトーシスにより回収され、再び神経伝達物質が充填され次の開口放出に備える。したがって、回収、再利用されたシナプス小胞が再びシナプス伝達に寄与するためには、再度の伝達物質充填が不可欠である。

シナプス小胞へのグルタミン酸充填は液胞型 H<sup>+</sup>-ATP アーゼ活性によって生じた H<sup>+</sup>濃度勾配を利用して、小胞 型グルタミン酸輸送体 (vesicular glutamate transporters: VGLUTs) によって行われる. グルタミン酸充填の生化学 的な取り込み測定は単離精製シナプス小胞標本や膜再構成 系を用いて行われ、VGLUT による放射標識されたグルタ ミン酸の充填時間は10数分であると報告されてきた1.2). 一方、げっ歯類海馬体グルタミン酸作動性の興奮性シナプ スにおける電気生理学的観測による知見では、高頻度のシ ナプス伝達によって大量のシナプス小胞が消費され再充填 される環境においても微小シナプス電流 (miniature excitatory postsynaptic currents: mEPSCs, 単一シナプス小胞由来 の電流応答を反映する)振幅は変化しないことが報告され ており、シナプス小胞への神経伝達物質充填はずっと速 く、数秒の単位で完了されなければならないと予測され る3,4).

では、シナプス部位における神経伝達物質の充填時間は 実際にはどのくらいなのだろうか? この疑問にアプロー チするため我々はシナプス前終末に直接パッチクランプ記 録を適用し、ケイジド化合物を用いて細胞質の神経伝達物 質濃度を急速に上昇させることでシナプス小胞へのグルタ ミン酸充填を直接計測することを試みたので、ここに紹介 したい<sup>5</sup>.

沖縄科学技術大学院大学細胞分子シナプス機能ユニット研究員(〒904-0495 沖縄県国頭郡恩納村字谷茶 1919-1) The rate of synaptic vesicle filling with neurotransmitter glutamate

**Tetsuya Hori** (Cellular and Molecular Synaptic Function Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, 1919–1 Tancha, Onna-son, Okinawa 904–0495, Japan)

# 2. ケイジドグルタミン酸光分解を利用したシナプス小 胞へのグルタミン酸充填速度の測定

図1に、実験の概要を示す。哺乳動物中枢神経系興奮性シナプスにおいて、シナプス前終末細胞質中のグルタミン酸をシナプス小胞には輸送されないケイジドグルタミン酸(NMI-glutamate)に置換すると、神経活動に伴う小胞の開口放出に伴って小胞内に貯蔵されたグルタミン酸はシナプス間隙に放出され空になり、シナプス応答が減弱する。ほぼすべての小胞が空になった後、紫外線を照射し、細胞質グルタミン酸濃度を瞬時に上昇させる。光照射後のシナプス応答を継時的に測定することで、小胞へのグルタミン酸充填過程を観測することが可能となる。

実験はマウス脳幹急性スライス標本を作製し、表面に露出するヘルドのカリックス(calyx of Held)と呼ばれる大型のシナプス前終末と台形体内側核(MNTB)シナプス後細胞で電気生理学記録を行った(図2上段)。このシナプスは聴覚伝達路におけるグルタミン酸作動性の興奮性シナプスで、細胞体を直接取り巻く大きなシナプス前終末から光学顕微鏡目視下に直接パッチクランプが適用できるため、シナプス前終末膜の直接電気記録と前終末細胞質成分の置換が行える。電極内にケイジドグルタミン酸を含む細胞内溶液を用いて前終末ホールセルパッチクランプを行うと、軸索への繰り返し刺激(1 Hz)とともに後シナプス電流(EPSC)振幅の減少が観察される(図2下段)。これは

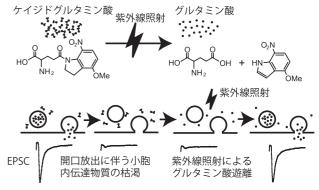
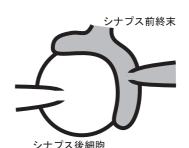


図1 ケイジドグルタミン酸光分解を利用した、シナプス小胞 へのグルタミン酸充填速度測定の模式図



脳幹スライス表面の様子 左側:MNTB細胞体、右側:calyx of Held前終末から同時電気記録を行う。



ファッス g mind アイジドグルタミン酸を含む溶液で ンナプス前終末をホールセルパッチ

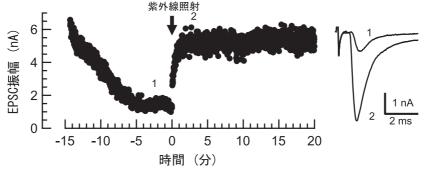


図2 グルタミン酸充填速度の測定 ケイジドグルタミン酸をパッチクランプ法でシナプス前終末に注入して光分解を 行い,シナプス小胞へのグルタミン酸充填速度を測定する。下図は文献5より改 変,紫外線照射の後,シナプス小胞へのグルタミン酸充填に伴うEPSC 振幅の増 加が観測される。

細胞質内グルタミン酸が洗い流され、開口放出により一度 グルタミン酸がシナプス小胞から放出されると、再充填さ れないことが原因である<sup>6</sup>. EPSC が実験開始直後の大き さから十分小さくなった後紫外線を照射し、ケイジドグル タミン酸から迅速にグルタミン酸を遊離させると、光照射 直後から EPSC 振幅は増加し始め、およそ1分以内に実験 開始直後とほぼ同程度(94%)にまで回復する.

この EPSC 振幅回復過程は一次指数関数(式は図3の説明を参照)でよく近似でき、回復の時定数は約17秒であった。この EPSC 回復過程は液胞型 H<sup>+</sup>-ATP アーゼ阻害薬である bafilomycin A1 により阻害される。さらに、軸索刺激による誘発性 EPSC が減弱した後、mEPSC を観察したところ、グルタミン酸光分解の後 mEPSC 振幅と発生頻度が上昇し、記録開始直後と同程度に回復した。単位時間あたりの mEPSC 総電荷量の回復過程は誘発性 EPSC と同様一次指数関数でよく近似され、回復の時定数は約18秒であった。これらの実験結果は EPSC 回復過程が液胞型ATP アーゼ活性と VGLUT によるシナプス小胞へのグルタミン酸充填過程を反映することを強く示唆する.

この測定はシナプス小胞の再充填を直接計測しているわけではなく,シナプス応答を指標としていることから,前

終末におけるカルシウム流入や開口放出するシナプス小胞 数の増加をも検出している恐れがある. そこでシナプス前 終末細胞膜容量測定を行った. 電解質にはさまれた細胞膜 は電気的にはコンデンサとしての性質があり、脂質二重膜 の単位面積あたりの電気容量(固有膜容量)は一定である. 形質膜の電気容量は膜の表面積に正比例するので、膜面積 の増減を伴う開口放出およびエンドサイトーシスを電気的 に測定できる. 光分解前後での開口放出とそれに引き続く エンドサイトーシスの時間を比較すると、光分解前後で は、前終末における電位依存性カルシウム電流の振幅、開 口放出量、およびエンドサイトーシスの時定数には統計的 に有意な差はみられない5. ケイジドグルタミン酸光分解 とそれに伴う細胞内および小胞内グルタミン酸濃度の変化 は、シナプス前終末におけるカルシウム流入、シナプス小 胞開口放出、そして形質膜からの回収再利用過程には影響 を与えないことが確認できた.

次に、小胞充填の細胞質グルタミン酸濃度依存性と、グルタミン酸充填の結合親和性  $(K_m)$  を検討する目的で、さまざまな濃度のケイジドグルタミン酸  $(2\sim10~\text{mM})$  を用い、EPSC 振幅の回復速度を計測した。光分解後のEPSC 回復速度は細胞質遊離グルタミン酸濃度に依存し、

回復時定数の濃度依存性から Lineweaver-Burk プロット図を作成すると、小胞グルタミン酸充填の  $K_m$  値は  $0.91\,\mathrm{mM}$  と推定された5. この値は再構成系における実験で報告されている VGLUT1 および VGLUT2 の  $K_m$  値と近い値である7.8. 一方で、推定される小胞充填時定数の最小値( $1/V_{\mathrm{max}}$ )は 15.1 秒で、これは単離シナプス小胞を用いた実験系で報告されている、放射ラベルされたグルタミン酸取り込み時定数3.4.9 に比べて  $10\,\mathrm{GR}$  倍以上速い実験結果となった.充填速度の実験結果の差は、取り込み実験における小胞外イオン環境の違い、あるいはシナプス小胞単離精製に伴う重要分子の欠落やグルタミン酸取り込み分子機構へのダメージが主な原因ではないかと考えられる.

# 3. シナプス小胞へのグルタミン酸充填速度に影響する 因子

次にシナプス小胞へのグルタミン酸充填速度に影響する因子を捜索した。まず始めに、温度依存性を検討した。生理的温度条件下(37度)での取り込み時定数は7秒で、この結果から計算される温度計数  $Q_{10}$  は2.4 であった。この値は海馬スライス標本アストロサイト細胞へのグルタミン酸取り込みにおける温度依存性に近い $^{10}$ .

次に生後発達依存性を検討した.マウス聴覚神経系では外耳道の開口前後(生後 10 日前後)でさまざまな分子サブタイプのスイッチングが起こるが、この期間に VGLUT分子は VGLUT1 の発現量が発達依存的に増加し、一方VGLUT2 発現量は同程度を維持することが報告されている<sup>11,12)</sup>. 耳道開口前にあたる生後 7~9 日齢では取り込み時定数は約 60 秒であった. これは、耳道開口後にあたる生後 13~15 日齢(17 秒)および生後 20~22 日齢(14 秒)と比較して有意に遅い. これは、シナプス小胞膜上に発現する VGLUT 分子数の発達依存的な増加に伴い充填速度が早くなっていると考えられる.

さらに、細胞質塩化物イオン濃度依存性について検討した。単離精製シナプス小胞では小胞外塩化物イオン濃度が数 mM(1~10 mM)の間で最も早く取り込まれ、低濃度でも高濃度でも充填速度が低下する二相性を示すことが報告されている<sup>47)</sup>. 一方、Price、Trussell らによる報告では、calyx of Held シナプス前終末細胞質の塩化物イオン濃度を変えても mEPSC 振幅に影響がない<sup>13)</sup>. 我々は、前終末ホールセルパッチ電極内の塩化物イオンをメタンスルホン酸に置換し、さまざまな塩化物イオンをメタンスルホン酸に置換し、さまざまな塩化物イオン濃度(0.02、0.2、2、30、110 mM)での EPSC 回復時定数を測定した、取り込み時定数、および EPSC の回復率はいずれも塩化物イオン濃度が30 mM のとき最大となり、単離小胞での報告と同様の塩化物イオン濃度に対する二相性を示した。グラミシジンによる穿孔パッチクランプによる研究結果で

は、calyx of Held シナプス前終末の細胞質塩化物イオン濃度は21 mM と報告されており<sup>13)</sup>、前シナプス塩化物イオン濃度はシナプス小胞への伝達物質充填に最適な環境に保たれているといえる.

# 4. グルタミン酸再充填速度の生理学的意味

シナプス小胞が時定数 15 秒で再充填されることの生理 学的重要性は何か? シナプス小胞内の伝達物質濃度につ いては直接的な証拠はないが、大半の陰イオンがグルタミ ン酸に置き換えられるとするとその濃度は 60~100 mM 程 度に達するであろう. シナプス小胞の大きさを直径 50 nm の球. 小胞内のグルタミン酸濃度を仮に 60 mM とした場 合. およそ 2000 分子強のグルタミン酸充填を 45 秒かけて 完了する計算となる.Ryan らは海馬培養細胞シナプスに おける蛍光色素 FM1-43 取り込み実験においてグルタミン 酸輸送速度を毎秒 70 分子と仮定し充填完了時間を 30 秒と 概算し、シナプス小胞の平均再利用時間60秒と比較して 十分短いと考察しているが14), 我々の直接観察による実験 結果はこの時間経過にきわめて近い. 我々の実験結果から 推定される輸送速度は毎秒80分子強である。高森らの報 告5から小胞膜上の VGLUT 分子数を 10 分子とすると, VGLUT 1分子あたりの輸送速度は毎秒8.4グルタミン酸 分子となり、単離シナプス小胞を用いた実験系で報告され た速度より10倍速い。一方でこの速度で小胞が充填され れば、シナプス小胞の平均再利用時間より短時間で伝達物 質充填が完了する. 他方、シナプス小胞再利用過程の研究 においては kiss-and-run に代表される速い再利用過程も提 唱されている. 図3に示すように、再利用時間が短い場 合、シナプス小胞は伝達物質の充填が不十分なまま次の開 口放出を起こすため、シナプス素量振幅が低下し、シナプ ス伝達を減弱する可能性がある.

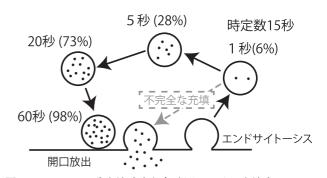


図 3 グルタミン酸充填速度と各時間における充填率 シナプス小胞は一次指数関数 EPSC = EPSC $_{ss}$  +  $Ae^{(-\tau^0)}$  (EPSC $_{ss}$ : 充 填後の平均 EPSC 振幅,A: EPSC 振幅の回復量, $\tau$ : 回復時定 数)に従って充填される.

## 5. おわりに

多くのシナプス研究では素量サイズ q はもっぱら後シナプス受容体の数や性質の変化として考察され、前シナプス素量放出サイズは変化しないという前提で仮説が構築されてきた. 我々の今回の研究結果が、素量放出サイズの変動やばらつきがシナプス伝達に寄与する可能性を考慮する手がかりになれば幸いである.

- Maycox, P.R., Deckwerth, T., Hell, J.W., & Jahn, R. (1988) J. Biol. Chem., 263, 15423–15428.
- Carlson, M.D., Kish, P.E., & Ueda, T. (1989) J. Biol. Chem., 264, 7369-7376.
- Zhou, Q., Petersen, C.C.H., & Nicoll, R.A. (2000) J. Physiol., 525, 195–206.
- 4) Südhof, T.C. (2004) Annu. Rev. Neurosci., 27, 509-547.
- 5) Hori, T. & Takahashi, T. (2012) Neuron, 76, 511-517.
- 6) Ishikawa, T., Sahara, Y., & Takahashi, T. (2002) Neuron, 34,

613-621.

- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Jr., & Edwards, R.H. (2000) Science, 289, 957–960.
- 8) Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., & El Mestikawy, S. (2002) *J. Neurosci.*, 22, 5442–5451.
- 9) Naito, S. & Ueda, T. (1985) J. Neurochem., 44, 99-109.
- Bergles, D.E. & Jahr, C.E. (1998) J. Neurosci., 18, 7709– 7716.
- 11) Billups, B. (2005) Neurosci. Lett., 382, 66–70.
- 12) Blaesse, P., Ehrhardt, S., Friauf, E., & Nothwang, H.G. (2005) Cell Tissue Res., 320, 33–50.
- Price, G.D. & Trussell, L.O. (2006) J. Neurosci., 26, 11432– 11436.
- 14) Ryan, T.A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F.E., Tsien, R.W., & Smith, S.J. (1993) *Neuron*, 11, 713–724.
- 15) Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006) Cell, 127, 831–846

## 著者寸描 🚃

## ●堀 哲也 (ほり てつや)



沖縄科学技術大学院大学細胞分子シナプス 機能ユニット研究員. 博士 (医学).

■略歴 1970 年鳥取県に生る. 93 年岡山 大学理学部卒業. 九州大学大学院修士課程 を経て, 東京大学大学院医学系研究科にて 学位取得. 2002 年ミュンヘン大学 Arthur Konnerth 研究室に留学. 04 年東京大学医

学系研究科助手. 2007年より現職.

- ■研究テーマと抱負 大学進学時から脳と意識に興味があり、 一貫して電気生理的手法によるシナプスの理解を目的として研 究しています.
- ■趣味 歩くこと,音楽鑑賞.