

博士学位論文審査要旨

2019年7月24日

論文題目： Dual roles of the plasma membrane calcium ATPases for presynaptic Ca^{2+} homeostasis and the modulation of H^+ gradient in synaptic vesicles

シナプス小胞における Plasma membrane calcium ATPase の二つの役割：
シナプス前終末の Ca^{2+} 恒常性機能とシナプス小胞の H^+ 濃度勾配の調節

学位申請者： 大野 孔靖

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査： 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査： 脳科学研究科 教授 元山 純

要旨：

シナプス前終末は、神経伝達物質放出を担うことで、神経間の信号伝達、神経回路の機能修飾など重要な役割を果たしている。シナプス前終末が直径1ミクロンほどの小さな構造であり、しかもシナプス前終末標本やその内部構造を選択的に分離する手法が技術的に非常に高度なため、現在でも素子レベル・分子レベルの知見に関しては全容が明らかになっていない。本研究では、マウス脳からシナプス小胞を単離し、生化学的手法を用いることで、シナプス小胞が Ca^{2+} イオンを取り込む可能性を示唆し、さらに形質膜 Ca^{2+} ポンプがその機能を担う可能性を示唆したものである。

本研究では、研究室の独自の手法であるシナプス小胞分画の精製法を利用し、まず小胞酸性化の計測をおこなった。シナプス小胞外の Ca^{2+} 濃度上昇に伴い、小胞酸性化阻害が起こったことから $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体の存在が示唆された。また、放射性同位体標識した Ca^{2+} イオンがシナプス小胞内に取り込まれていることを確認した。

さらに $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体の実体として、シナプス前終末の Ca^{2+} 濃度を制御している可能性が示唆されている SV2 タンパク質に関し、ノックアウトマウスを作製し、実験を行ったところ、シナプス小胞 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体ではない可能性が強く示唆された。小胞体膜 Ca^{2+} ポンプを薬理的に阻害しても Ca^{2+} 取り込みやシナプス小胞酸性化に影響はなかったが、形質膜 Ca^{2+} ポンプの阻害は効果が見られたため、シナプス小胞上の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体の実体は形質膜 Ca^{2+} ポンプである可能性が示唆された。

形質膜 Ca^{2+} ポンプが形質膜ではなくシナプス小胞などに存在していることを証明するため、形質膜 Ca^{2+} ポンプ (PMCA1) のシナプス小胞内腔側、あるいは細胞外側に pH 感受性タンパク質を結合させた蛍光プローブを海馬神経細胞に発現させると、シナプス小胞と同様の時間経過でエキソサイトーシス、エンドサイトーシスし、テタヌス毒素によって終末内サイクリングが阻害されることがわかった。よって、シナプス小胞などに存在していることが示唆された。

本研究は、生化学・生理学・遺伝学を組み合わせることによって、シナプス小胞が Ca^{2+} イオンを取り込む可能性を示唆した新規性の高い研究である。実際のシナプス前終末においてどの程度の機能を有するものかは今後の研究が必要であるが、これまでにない新たな Ca^{2+} 制御機構となる可能性を持っている。よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいと判断された。

わしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2019年7月24日

論文題目: Dual roles of the plasma membrane calcium ATPases for presynaptic Ca^{2+} homeostasis and the modulation of H^+ gradient in synaptic vesicles

シナプス小胞における Plasma membrane calcium ATPase の二つの役割:
シナプス前終末の Ca^{2+} 恒常性機能とシナプス小胞の H^+ 濃度勾配の調節

学位申請者: 大野 孔靖

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 坂場 武史

副査: 脳科学研究科 教授 櫻井 芳雄

副査: 脳科学研究科 教授 元山 純

要 旨:

博士論文提出者は同志社大学大学院脳科学研究科高森茂雄教授の指導下でシナプス前終末の生化学的研究に従事してきた。2019年7月17日午前10時5分から90分間博士論文の内容に関して英語で発表を行い、質疑応答をおこなった。発表に関しては研究の目的・方法・結果・解釈に関して説明が適切に行われていた。また、博士論文の内容に関して英語での説明ができていることから英語に関する語学力は博士課程修了者として十分であると判断した。さらにその後30分間主査・副査3名によって、博士論文研究内容および一般的な生命科学・神経科学の知識に関して非公開で口頭試問を行った。当該分野や隣接領域の基礎的な生命科学に関し、博士課程修了に足る十分な知識を持っていることを確認した。以上のことから、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目：Dual roles of the plasma membrane calcium ATPases for presynaptic Ca^{2+} homeostasis and the modulation of H^+ gradient in synaptic vesicles
シナプス小胞における Plasma membrane calcium ATPase の二つの役割：シナプス前終末の Ca^{2+} 恒常性機能とシナプス小胞の H^+ 濃度勾配の調節

氏名： 大野 孔靖

要旨：

神経細胞間の化学シナプスでは、シナプス前終末（情報送り手側）からシナプス小胞内腔に貯蔵されている神経伝達物質が放出され、それがシナプス後細胞（情報受け手側）の受容体に作用することで情報が伝達される（シナプス伝達）。神経伝達物質の放出は、シナプス前細胞の細胞体からシナプス前終末へ活動電位が到達したときに、大きく促進される。活動電位の到達により、シナプス前終末の膜電位が脱分極し、シナプス前終末の細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開口し、シナプス前終末の細胞質における Ca^{2+} 濃度が上昇する。これによりシナプス小胞膜が細胞膜と融合を起し、小胞内に貯蔵されていた神経伝達物質が開口放出される（エキソサイトーシス）。したがって、シナプス前終末の細胞質 Ca^{2+} 濃度の制御は、シナプス伝達を行う上で重要な役割を担っている。シナプス前終末の細胞質 Ca^{2+} 濃度を制御する機構の一つとして、シナプス小胞上に存在するタンパク質が細胞質の Ca^{2+} をシナプス小胞内へ輸送し、その後、 Ca^{2+} を細胞外へ開口放出する機構の存在が、いくつかの実験から示唆されている。

過去の研究では、シビレエイの電気器官から単離したシナプス小胞を用いて、放射性同位体標識した Ca^{2+} の取り込み実験を行い、ATP 依存的に Ca^{2+} が取り込まれることが示された (Israel et al., 1980)。さらに、ヒツジの脳から単離したシナプス小胞分画を標本として、放射性同位体標識した Ca^{2+} を用いたシナプス小胞への取り込み実験や、pH 感受性蛍光色素を用いた実験 (Acridine orange を用いた小胞酸性化測定) が行われ、中性条件下の pH で作動する高親和性の Ca^{2+} 輸送体 (P-type ATPase) と、塩基性条件下の pH 8.5 で作動する低親和性の Ca^{2+} と H^+ の交換輸送体 ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体) がシナプス小胞にあるという報告がされている (Goncalves et al., 1999, 2000)。

また、シナプス小胞タンパク質の一つである synaptic vesicle protein 2 (SV2) を欠損させると、シナプス前終末での Ca^{2+} 濃度が上昇することが Ca^{2+} 感受性の蛍光色素を用いたイメージングや電気生理学的手法を用いた実験から示唆された (Janz et al., 1999; Wan et al., 2010)。以上のことから、SV2 がシナプス小胞上にある Ca^{2+} 輸送タンパク質の候補として考えられている。

更には、小胞体膜に局在していると考えられている Ca^{2+} 輸送タンパク質 Sarcoplasmic endoplasmic reticulum (SERCA)、或いは細胞膜に局在している Ca^{2+} 輸送タンパク質 Plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) もシナプス小胞上にある Ca^{2+} 輸送タンパク質の候補として考えられている。これらのタンパク質は、ラットの脳から単離したシナプス小胞分画を標本として、質量分析が行われ、そこから検出されている (Takamori et al., 2006)。

本研究では、これらの過去の研究から、どのタンパク質がシナプス小胞で Ca^{2+} の輸送を行っているかを Acridine orange を用いた小胞酸性化測定、放射性同位体標識した Ca^{2+} の取り込み実験によって検証を行った。

まず、塩基性条件下の pH 8.5 で作動すると報告のあった低親和性の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送体が、細胞質付近の条件下 (pH 7.2) においても $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 交換輸送が働くかどうかを Acridine orange を用

いた小胞酸性化測定によって検証した。シナプス小胞分画に ATP を加えてシナプス小胞上に存在する H⁺輸送体である Vacuolar-type H⁺ ATPase (V-ATPase)を駆動させ、シナプス小胞内を酸性化させた後に、Ca²⁺を加えたところ、シナプス小胞内のアルカリ化が観察された。その結果から細胞質付近の条件下 (pH 7.2) においても Ca²⁺/H⁺交換輸送体が働いていることが確認された。更に、pH 7.2 の条件下で働く Ca²⁺/H⁺交換輸送体の Ca²⁺親和性を調べるために、加える Ca²⁺の量を変えながらシナプス小胞のアルカリ化を観察した。そこから、シナプス小胞上の Ca²⁺/H⁺交換輸送体が pH 7.2 の条件下においては高親和性 (K_m~400 nM) であり、生理的条件下のシナプス前終末の Ca²⁺濃度範囲で作動可能であることを示した。

次に、この pH 7.2 の条件下で作動する Ca²⁺/H⁺交換輸送はどのタンパク質によって機能しているかを検証した。まず、シナプス小胞上の Ca²⁺輸送体タンパク質の候補とされている SV2 について検証を行った。SV2 欠損マウスの脳由来のシナプス小胞分画では、野生型と同様に Ca²⁺/H⁺交換輸送体が作動していることを Acridine orange によって確認した。この結果から、SV2 は Ca²⁺/H⁺交換輸送をしていないことが明らかになった。

次に、SERCA、或いは PMCA がシナプス小胞上で Ca²⁺/H⁺交換輸送をしているかどうかを検証した。SERCA と PMCA のそれぞれの阻害剤を用いて、Acridine orange を用いた小胞酸性化測定を行った。その結果、PMCA 阻害剤によって、Ca²⁺/H⁺交換輸送が阻害された。一方、SERCA 阻害剤には Ca²⁺/H⁺交換輸送の阻害効果は見られなかった。これらの実験から PMCA がシナプス小胞上において Ca²⁺/H⁺交換輸送を行っていることが示された。

そして、PMCA がシナプス小胞への Ca²⁺輸送にどれだけ寄与しているかを放射性同位体標識した Ca²⁺の取り込み実験によって検証を行った。その結果、PMCA 阻害剤によって、シナプス小胞への Ca²⁺の取り込みはほぼ全て阻害された。一方、SERCA 阻害剤による Ca²⁺の取り込み阻害の効果は見られなかった。また、SV2 欠損マウスの脳由来のシナプス小胞分画を標本として、シナプス小胞への Ca²⁺の取り込み実験も行ったが、野生型のシナプス小胞への Ca²⁺の取り込み量との差は観られなかった。これらの実験から、シナプス小胞への Ca²⁺の取り込みは PMCA が担っていることが明らかになった。

以上の Acridine orange を用いた小胞酸性化測定、放射性同位体標識した Ca²⁺の取り込み実験から、シナプス小胞での Ca²⁺/H⁺交換輸送は PMCA が担っており、かつ、シナプス小胞への Ca²⁺の取り込みの大部分も PMCA が担っていることが示された。

更に、これまでの研究では PMCA は形質膜上に存在し、Ca²⁺の細胞外への排出を担うことで、細胞質 Ca²⁺濃度の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられてきた。そこで、PMCA が生きている細胞内のシナプス小胞に存在しているかどうかの確認をするために、PMCA1 の細胞外領域 (小胞に存在した場合は内腔領域) に pH 感受性の緑色蛍光タンパク質を融合させた PMCA1-pHluorin をマウス海馬の培養細胞に発現させた。PMCA1 がシナプス小胞に存在しているならば、シナプス小胞の酸性化に伴い、PMCA1-pHluorin の蛍光強度の低下が観察できる。これを利用して、細胞膜表面と細胞内区画に存在する PMCA1-pHluorin の割合を算出した結果、全体の約 75% の PMCA1-pHluorin が細胞内区画に存在することを明らかにした。更に、細胞内区画の PMCA1-pHluorin が神経細胞の活動に伴って、シナプス小胞のリサイクリングと同様にリサイクリングされることが明らかになった。

本研究では、以上のことから、PMCA が細胞膜だけでなく、シナプス小胞膜にも存在し、Ca²⁺/H⁺交換輸送体として働いていること、PMCA がシナプス小胞内に Ca²⁺を取り込んでシナプス前終末の細胞質 Ca²⁺濃度の制御に関与していること、シナプス小胞へ神経伝達物質を充填するときに必要なシナプス小胞の H⁺濃度勾配の制御に PMCA が関与していることの3つが示唆された。