

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	シナプス伝達における伝達物質量制御メカニズムの包括的解明
研究機関・部局・職名	同志社大学・脳科学研究科・教授
氏名	高森 茂雄

## 【研究目的】

脳高次機能は、複雑な神経回路を形成した脳内において、神経細胞がシナプスを介して相互にシグナルを伝えることで実現される。1950年代にKatzらがカエルの神経-筋接合部を用いた研究から、シナプス伝達はシナプス前終末からの一定の大きさを持った量子(=Quanta)の放出によって喚起されることが示唆された。一方で、神経伝達物質の輸送体が同定された現在においても、Quantaがどのように規定され、また如何なる修飾を受けるかに関する知見は乏しい。

本研究計画は、脳内分泌小胞の代表格であるシナプス小胞と有芯顆粒に焦点を当て、これら分泌小胞内に充填される神経伝達物質量を規定する仕組みを明らかにし、シナプス伝達の修飾機構の一端を明らかにすることを目的とした。具体的には、研究期間内に以下のプロジェクトを遂行する計画を立案した。

## 【1】 グルタミン酸 Quanta の塩素イオンによる制御機構の構造生物学的解明

グルタミン酸のシナプス小胞再充填過程は塩素イオンによって制御されていることが知られているが、その作用機構は未解明である。当研究者は、シナプス小胞におけるグルタミン酸輸送体である VGLUT が塩素イオン透過性を有し、それを基にグルタミン酸/塩素イオン対向輸送モデルを報告した(*Nature Neurosci*, 2009)。一方で、最近 VGLUT の塩素イオン透過性に異を唱える実験結果が報告された(Juge et al., *Neuron*, 2010)。本項目では、まず VGLUT を人工脂質膜に再構成する実験を進展させ、VGLUT が持つ塩素イオン透過性に検証と、輸送機構の解明を構造生物学的見地から行う。また、人工脂質膜再構成系の *in vitro* 実験の結果を神経細胞に外挿することにより、*in vivo* において塩素イオンがグルタミン酸 Quanta に与える影響の生理学的意義を明らかにする。

## 【2】 他の神経伝達物質の Quanta を規定する因子の探索

哺乳類脳内の主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸は、溶液中で負に荷電しているため、VGLUT によるグルタミン酸輸送が、陰イオンである塩素イオンによって制御されていることは合理的であり、生物物理学的に説明がつく。しかしながら、主要な抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸は中性であり、モノアミン類は正に荷電しているため、グルタミン酸とは異なる様式で Quanta が制御されている可能性が考えられる。本項目では、 $\gamma$ -アミノ酪酸・モノアミン類を輸送する

VGAT・VMAT の組換えタンパク質をリポソームに再構成する実験系を構築し、グルタミン酸以外の神経伝達物質に関して、如何に Quanta が制御されているかを包括的に解明する。

### 【3】有芯顆粒の分子解剖学的解析に基づく Quanta 規定因子の探索

有芯顆粒(LDCV)には、シナプス小胞とは異なる膜融合関連分子や輸送体・チャネルタンパク質が存在している可能性が示唆されているが、LDCV の分子研究はモデル細胞である PC12 株化細胞や副腎由来のクロマフィン顆粒細胞等に限定されており、これまで脳内 LDCV を直接研究対象とするアプローチは取られてこなかった。本項目では、LDCV 特異的タンパク質に対する特異抗体を用いた免疫分離法による LDCV の高度精製法を確立し、網羅的プロテオーム解析を行い、LDCV の構成分子の全容を明らかにすると共に、シナプス小胞とは異なる Quanta 規定因子（陽イオンチャネル等）の探索を行う。

以上の研究を遂行することにより、分泌小胞内に充填される神経伝達物質量を規定する仕組みを詳細に明らかにする。これらの研究から得られる基礎知見は、シナプス伝達の人為的制御に関わる新しいターゲットの発見に繋がる可能性あり、将来的にシナプス伝達異常を伴う神経疾患治療に、向けた新たな戦略を提供することが期待できる。

### 【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

### 【所見】

#### ① 総合所見

研究開始後に、主要研究テーマの基礎となる仮説が正しくない可能性が分かったことから、上記項目（1）の研究を新規 pH プローブの利用による培養神経細胞におけるシナプス小胞内プロトン計測技術の開発研究に軌道修正し、グルタミン酸再充填過程に関して従来の定説と異なる新知見を得た。また、項目（2）のグルタミン酸を含む小胞と GABA を含む小胞に関する研究において、pH や小胞内腔の緩衝能が大きく異なることを見出した。以上の2点は成果として評価できるが、項目（3）の有芯顆粒の分子解剖学的解析については実験そのものが着手されなかったように見える。また、研究成果の論文発表が現時点ではインパクトの低い雑誌における短報一報だけで、後は投稿準備中となっており、優れた成果が得られたとは言えない。

**② 目的の達成状況**

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題の当初の目的は、(1) グルタミン酸 Quanta の塩素イオンによる制御機構の構造生物学的解明、(2) 他の神経伝達物質の Quanta を規定する因子の構造生物学的解明、(3) 有芯顆粒の分子解剖学的解析に基づく有芯顆粒における Quanta 規定因子の探索、であった。(1)については、前提条件である「グルタミン酸 Quanta の塩素イオンによる制御」仮説が正しくない可能性が考えられたことから、新規 pH プローブを利用した培養神経細胞におけるシナプス小胞内プロトン計測技術の開発研究に軌道修正し、グルタミン酸再充填過程に関して従来の定説と異なる新知見を得た。また(2)については、グルタミン酸を含む小胞と GABA を含む小胞では、pH や小胞内腔の緩衝能が大きく異なることを見出した。(3)については、実験そのものが着手されていない。以上、所期の目的は一部のみ達成されたと判断する。

**③ 研究の成果**

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

主要成果については投稿準備中となっており正確な評価は困難であるが、グルタミン酸および GABA の小胞充填機構について、新知見を得たことには先進性が認められる。

現時点では、明確にブレークスルーと呼べるような知見は得られていないと思われる。

上述のように当初計画していなかった成果も得られている。

**④ 研究成果の効果**

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が (見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が (見込まれる ・ 見込まれない)

シナプス小胞への伝達物質充填機構の解明は、関連分野の進展への大きな寄与となり得る。そして、この点については、一定の研究成果が得られると考える。本研究の成果が短期間に社会的・経済的に明らかな貢献をすることは期待できない。しかしながら、本研究の成果は、将来的に一部の神経疾患の病因解明とそれへの対応策の開発につながる可能性がある。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究開始初期の段階で研究の軌道修正を行い一定の成果を得た点は評価できる。予算規模を考えると構造生物学的アプローチを行う人員などマンパワーが不十分であったと感じる。

現時点で、前述したように、論文発表が短報一篇のみで成果に乏しい印象は否めない。一般向けの講演等で、国民との対話に努めた点は評価できる。