

D. 考察

上記の(1)、(4)の結果から、適切な実験系を構築することにより光計測が妥当な定量性を有し得ることが示された。

(2)の結果は現状ではアセフェートによるCA3-CA1 シナプスでの異常がないという結果を示している。これまでの文献上に示されているシナプス機能と認知機能の対応から考えると、アセフェートと遅発的に示されている行動異常と、今回の結果との間には乖離があり、より詳細な検討を必要としている。

(3)で示したドーモイ酸の腹注によるLTPの現象は、これまでに示されている行動異常とほぼ平行な関係にあり、*ex vivo* 標本の状態でドーモイ酸による遅発認知機能の異常を捉えられたということを示している。今後は、この機能異常の機構をより詳細に調べる。これは認知機能に異常があるモデル動物としても極めて興味深いものである。

さらに(5)(6)の光学系を組み合わせることでより詳細な神経機構の解明が期待される。

E. 結論

本年はドーモイ酸投与マウスの認知機能異常の検出に一定の成果を得た。また、アセフェート投与による異常に関しては、ネガティブデータながらCA3-CA1 シナプスの関与があまりないとの結果を得た。さらに、共焦点顕微鏡を加えた新規光学系の調節はさらにすすみ、神経回路の機能検定への応用がより具体的に計画できるようになってきている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Allen, R. D., Tominaga, T. and Naitoh, Y.

(2008) The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa In: Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals. CRC Press, David H. Evans ed. USA pp. 69 - 106.

富永貴志 「細胞内小器官 収縮胞の動きと機能」、動物の「動き」の秘密にせまる：運動系の比較生物学 (吉村健二郎編) 動物の多様な生き方 共立出版社 (2009)

2) 雑誌

Tominaga T, and Tominaga Y. (2010) GABA(A) receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices. *Pflugers Arch* 460: 875-889.

Tominaga T and Tominaga Y. (2011) Practice for the optical recording method of neuronal circuit analysis. *Seibutsu Butsuri 生物物理* 51(2), 092-095

Tominaga, Y., Ichikawa, M., Tominaga, T. (2009) Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA_A-mediated feed-forward inhibition in signal propagation. *Neurosci Res* 64: 152-161.

Koganezawa, N., Taguchi, A., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K., Witter, M.P., and Iijima, T. (2008). Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. *Neurosci Res* 61, 172-181.

2. 学会発表

Kajiwarara R, Tominaga T. and Takashima I. Enhancement of neural activities in the olfactory network induced by repetitive inputs to the olfactory nerve

as revealed by voltage-sensitive dye imaging. Program No. 479.15. 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.

Tominaga T, and Tominaga Y. A new type of confocal microscope for a fast voltage-sensitive dye (VSD) and Ca²⁺ imaging. Program No. 816.16. 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.

Tominaga T and Tominaga Y. A new microscope to interface with neuronal tissue by simultaneous optical VSD imaging readout and spatially and temporally patterned photostimulation. In: 第33回日本神経科学大会 / Neuro2010. Kobe: 2010

Tominaga T and Tominaga Y. A new VSD imaging microscope for neural circuit analysis with a random-access-photo-stimulator using a digital-mirror (DMD) device. In: 48th Annual meeting of Japanese Biophysical society. 2010. Sendai.

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Simultaneous optical VSD-imaging of un-caging stimulation induced neuronal activity with a newly developed patterned stimulation microscope 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago: Society for Neuroscience, 2009. Online.

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Specific mode of inhibitory activity enables preferential transmission of theta oscillatory activity in area CA1 of rat hippocampal slices, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), July 27-August 1,

Kyoto, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Modulation of feed-forward inhibition on CA1 pyramidal cells by patterned synaptic input probed with voltage-sensitive dye imaging in rat hippocampal slices. 32nd Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, September 16-18, Nagoya, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Layer dependent recruitment of feed-forward inhibition revealed by fast VSD-imaging in area CA1 of rat hippocampal slice preparation. Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, October 30-November 1, Tokushima, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2008) The impact of GABA_A-mediated inhibition in signal propagation of rat hippocampal slices examined with membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells with voltage-sensitive dye optical imaging. Program No. 136.7. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

Taguchi, A., Koganezawa, N., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K.-I., Witter, MP, Iijima, T. (2008) Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. Program No. 738.12. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

富永貴志、富永洋子. (2008) テタヌス様ガンマバンド刺激によって海馬スライス標本の CA1 野で引き起こされる神経回路網応答, 第46回日本生物物理学会年会, 福岡

富永貴志、富永洋子. (2008) 海馬スライス標本 CA1 野の神経興奮伝達におけるフ

ードフォワード抑制の大きさの細胞内分布を膜電位感受性色素により計測した,
第 31 回日本神経科学大会 / Neuroscience2008、東京

田口綾香、小金澤紀子、富永貴志、大原慎也、筒井健一郎、Menno Witter、飯島敏夫。(2008) 感覚入力と情動性入力の海馬への情報伝達における嗅内皮質深層の役割

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

「新規超高速共焦点光学系」

富永貴志・市川道教 (出願予定)

分担研究報告書

神経伝達物質輸送活性計測による中枢作動性物質の
シナプス伝達機能毒性解析に関する研究

研究分担者 高森 茂雄
同志社大学 教授

【研究要旨】

GABA 分解酵素阻害効果をもつバルプロ酸は、抗てんかん薬として臨床的に有用な薬である一方で、妊婦の服用では、生まれた子供に催奇形性・頭部各所の形態異常を誘発するなど、強い副作用も確認されている。また、実験動物への投与により、自閉症様の症状を呈することが知られている。本研究では、バルプロ酸暴露のシナプス形成と神経回路の興奮性-抑制性バランスに対する影響を検討した結果、大脳皮質神経初代培養細胞のバルプロ酸暴露が抑制性シナプスの形成を選択的に阻害することが判明した。この効果は、バルプロ酸が有するヒストン脱アセチル化酵素阻害活性によって惹起されることがわかった。

A. 研究目的

我々の脳内には、数百〜数千億個の神経細胞が存在し、それらが複雑かつ秩序だったネットワークを形成し、細胞接合部であるシナプスを介してシグナルを伝達することにより、脳高次機能を発現する。神経回路網形成や局所的なシナプス活動の機能修飾が脳の機能発現に影響し、その破綻は精神疾患や神経変性疾患を惹起することが考えられるが、なかでも最近、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランスの破綻が、精神疾患の発現機序の一つとして注目を浴びている。

本研究では、中枢神経作動薬の一つであり、興奮性 - 抑制性バランス (Excitatory-Inhibitory balance, E/I バランス) の制御に基づく抗てんかん薬として臨

床的に用いられているバルプロ酸をモデル化学物質として取り上げ、E/I バランスの破綻の発生機序を解明することを目的としている。E/I バランス破綻を引き起こすターゲット分子が新たに見つかれば、化合物の神経毒性評価に有用なマーカー分子の開発への道が拓くことが期待出来る。

B. 研究方法

GABA (γ -アミノ酪酸) は、哺乳類脳における主要な抑制性神経伝達物質である。抗てんかん薬として臨床的に用いられているバルプロ酸は、GABA 分解酵素阻害作用を持つことで、脳内抑制性神経伝達を増強し、てんかんを抑制すると言われているが、一方で、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害効果も持ち、

様々な遺伝子の発現増強を引き起こすことが知られており、投与量の制御が必須である。本研究では、バルプロ酸の過剰投与が、遅発性の脳機能障害を誘発するという作業仮説に基づき、E/I バランス破綻の指標として、小胞型グルタミン酸トランスポーター Vesicular glutamate transporter (VGLUT) 1 及び 2 と小胞型 GABA トランスポーター-VGAT の海馬での発現量の変化を定量的ウェスタンブロットと免疫抗体染色によって評価した。

1. 妊娠中期 (妊娠 12-14 日) マウスに一日一回 300mg/kg の用量を経口投与し、産仔の生後発達期(生後 0, 3, 7, 14 日齢)および成体(8 週齢)の海馬全体をサンプリングした。海馬から界面活性剤である Triton X-100 の 1%溶液を用いてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法に供した。E/I バランスの指標として VGLUT1/VGLUT2/VGAT、シナプス小胞のマーカールとして Synaptophysin を用いて、それらの海馬における発現量をバルプロ酸投与群と対照群において定量、比較した。

2. 生後 1 日目のラット大脳皮質由来の神経初代培養細胞に、DIV(days *in vitro*) 1~4 までの 3 日間、バルプロ酸 (0.3 mM, 1.0 mM) を加えた。DIV4 に培地を交換した後、DIV4 と DIV14 に全タンパク質を回収し、ウェスタンブロット法により、VGLUT1/VGLUT2/VGAT 及び Synaptophysin の定量を行った。また、上記タンパク質の発現量変化のメカニズムを調べる為に、免疫蛍光染色法を行った。

(倫理面への配慮)

薬物経口投与時の苦痛を最小限に留めるため、材質の柔らかいフレキシブルゾルデを用いた。

C. 研究結果

1. 妊娠期バルプロ酸投与の産仔脳E/I バランスに対する影響

妊娠中期 (妊娠 12-14 日の 3 日間) 母親にバルプロ酸を経口投与し、産仔脳のシナプス形成期におけるマーカー分子の発現に及ぼす影響を調べたところ、VGLUT1/VGAT/Synaptophysin の発現量は対照群とバルプロ酸投与群で差異は見られないが、VGLUT2 に関しては生後 7 日目と 14 日目に若干の発現増加が見られた。

また、同様の投与スケジュールにおいて、生後 8 週齢における各マーカー分子の定量を行ったところ、VGLUT1 と Synaptophysin の発現量が若干低下していることが分かった(それぞれ $P < 0.02$, $P < 0.04$; $n=6$)。VGLUT2 と VGAT の発現量は差異が見られなかった(それぞれ $P > 0.2$, $P > 0.4$; $n=6$)。

2. 幼若大脳皮質神経細胞のバルプロ酸暴露の神経発達およびE/Iバランスに対する影響

出産後 1 日目の大脳皮質を切除し、大脳皮質神経初代培養細胞を作成した。培養初期 (培養後 (DIV) 1~4) に、0.3 mM 及び 1.0 mM のバルプロ酸を添加すると、DIV14 における VGAT の含量が対照群に比べて有意に減少していた。同様の処置では、興奮性シナプスマーカーである VGLUT1 や、シナプス小胞マーカーである Synaptophysin, Synapsin の発現量は変化しない。また、樹状突起のマーカーや幼若神経細胞のマーカーの発現量も変化しない。そこで、バルプロ酸暴露による VGAT 発現低下が、抑制性神経細胞の死滅による細胞数の減少によるのか、個々の抑制性細胞が発現する VGAT 量の低下によるのか、それとも抑制性シナプスの形成不全に起因するの

かを区別する為に、免疫蛍光染色法を行った。その結果、バルプロ酸暴露は興奮性シナプスの形成にはほとんど影響しないが、抑制性シナプスにおいては、顕著な軸索の伸長不全に伴う抑制性シナプスの減少を誘発していることが明らかになった。上記の様に、バルプロ酸は GABA 転移酵素阻害に加えて、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害する活性を持つことが知られている。そこで、HDAC 阻害剤であるトリスタチン A (TSA) (30nM) 暴露の影響を検討した結果、バルプロ酸と同様の VGAT 発現低下と抑制性シナプス形成の阻害が見られた。

D. 考察

大脳皮質神経初代培養へのバルプロ酸暴露による VGAT の発現量低下はこれまで報告はなく、また、その作用機序は不明であった。本研究から得られた結果から、バルプロ酸は抑制性神経に選択的に働き、抑制性神経の軸索伸長やそれに引き続くシナプス形成を抑制していることが考えられた。抗てんかん薬としてのバルプロ酸の作用は、GABA 転移酵素の阻害による抑制性神経伝達の亢進であると考えられているが、一方で本研究の成果から、幼若期のバルプロ酸暴露は、抑制性神経伝達の低下を惹起することが考えられた。また、この効果はバルプロ酸が持つ HDAC 活性阻害で起こることが明らかになり、バルプロ酸の持つ異なる薬理活性が、抑制性神経伝達に対して相反する作用をもたらす可能性が示唆された。

E. 結論

抗てんかん薬として臨床現場で用いられているバルプロ酸が、投与量によっては抑制

性神経回路の形成不全を伴う大脳皮質における E/I バランスの破綻を誘発する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

高森茂雄. 塩化物イオンによる小胞型グルタミン酸輸送の制御, 医学のあゆみ, in press.

高森茂雄. シナプス小胞. 「トランスポートソームー膜輸送研究の源流から未来へ向けて」 (仮称), in press.

Takamori S. Synaptic vesicles. New Encyclopedia of Neuroscience 9, 801-808, 2009 (L.R. Squire, Editor). Oxford: **Academic Press**.

高森茂雄 SNARE 蛋白質が媒介するシナプス小胞エキソサイトーシスの分子メカニズム 大野博司・吉森保編 **蛋白質核酸酵素** 増刊「メンブレントラフィックの奔流」, 共立出版, 東京, 2008, 2078-2083 .

高森茂雄, 塩原靖幸 小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の機能 **Clinical Neuroscience**, 中外医学社, 東京, 2008, 1087-1090.

2) 雑誌

Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y, Takamori S, Ebihara S, Uematsu M, Mishina M, Miyazaki J, Yokoyama M, Konishi S, Inoue

K, Fukuda A, Fukumoto M, Nakamura K, Obata K, Yanagawa Y. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Mol Brain*, 3:40, 2010.

Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neuroscience* 12, 156-62, 2009.

Martens H, Weston MC, Boulland JL, Gronborg M, Groshe J, Kacza J, Hoffmann A, Matteoli M, Takamori S, Harkany T, Chaudhry FA, Rosenmund C, Erck C, Jahn R, Hartig W. Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses. *The Journal of Neuroscience* 28, 13125-31, 2008.

2. 学会発表

Takamori S. Regulation of glutamate uptake into synaptic vesicles by chloride. Kyoto University GCOE symposium. 'Biomembrane and channels' 2010. 12. 10, Kyoto, Japan.

Takamori S. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride. Symposium on 'The chloride ion and cell signaling in neurobiology'. The 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry 2010. 2010. 10. 20, Phuket, Thailand.

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. A lecture in Chicago University. 2010. 8. 23, Chicago, IL, USA.

Takamori S. A chloride conductance in the vesicular glutamate transporters. Gordon Research Conference on Membrane Transport Proteins. 2010. 2010. 8. 18, Biddeford, ME, USA.

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. Symposium on 'Vesicle dynamics at presynaptic terminals'. 2010. 2010. 5. 19, Morioka.

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. A plenary lecture on Kyushu Brain Days. 2009. 11. 8., Fukuoka.

Takamori S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? Symposium on the MESO-CONTROL of the cells, by the cells, for the cells. 2009. 1. 27, Kyoto

高森茂雄 グルタミン酸のシナプス小胞への取込機構 生理研研究会 「新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える」 2008. 9. 19, 岡崎.

Takamori S. Mechanisms of glutamate transport into synaptic vesicles. Symposium on Molecular Physiology of Synaptic Function, Neuro2008, 2008. 7. 11, Tokyo.

G. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定
も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高森 茂雄	第4章 トランスポートソーム、グルタミン酸性シナプス小胞のトランスポートソーム	金井好克ら	「トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ-」	株式会社 京都廣川書店	京都	2011	335 - 343
Juliandi B., Abematsu M., Nakashima K.	Epigenetics, Stem cells and Cellular differentiation	Tollefsbol T.O.	Handbook of epigenetics : The new molecular and medical genetics	Elsevier	オランダ	2010	315 - 328
北嶋 聡	「情動・認知 に関する化学物質」	社団法人 日本食品 衛生協会	「健康と化学物質-化学物質と幼児行動-」	社団法人 日本食品 衛生協会	東京	2009	CD -ROM
北嶋 聡	食品, 食品添加物, 食品汚染物質, 飼料添加物	上野光一 ら	新版トキシコロジー	朝倉書店	東京	2009	118 - 126
Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-E steban C., Izpisua Belmonte J.C.	Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-media ted dedifferentiation of committed mesoderm progenitors.	Rajasekhar, V.K. & Vemuri, M.C.	Regulatory networks in stem cells	Humana Press	New York	2009	37 -53

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Yamada	Strain differences of selective attention in mice:Effect of Kamin blocking on classical fear conditioning.	Behav Brain Res	213	126 - 129	2010
S. Watanabe, S. Endo, E. Oshima, H. Higashi, K. Yamada, K. Tohyama, T Yamashita, Y. Hirabayashi	Glycosphingolipid sythesis in cerebellar purkinje neurons: roles in myelin formation and axonal homeostasis.	Glia	58	1197 - 1207	2010
Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G., Oefner R., Yeo G., Nakashima K. & Gage F.H.	L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2.	Nature	468	443 - 446	2010
Abematsu M., Tsujimura K., Yamano M., Saito M., Kohno K., Kohyama J., Namihira M., Komiya S. & Nakashima K	Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury.	J Clin Invest	120	3255 - 3266	2010
Kohyama J., Sanosaka T., Tokunaga A., Takatsuka E., Tsujimura K., Okano H. & Nakashima K	BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity	J Cell Biol	189	159 - 170	2010
Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D.C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortiguela R., Marques-Torreon M.A., Nakashima K., Colak D., Gotz M., Farinas I. & Gage F.H.	Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus.	Cell Stem Cell	7	78 - 89	2010

Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K	Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation.	Curr Opin Neurobiol	20	408 - 415	2010
Juliandi B., Abematsu M. & Nakashima K	Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation.	Dev Growth Differ	52	493 - 504	2010
Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A, Saga Y	The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.	Development	137 (9)	1515 - 1522	2010
Nogi T, Yasui N, Mihara E, Matsunaga Y, Noda M, Yamashita N, Toyofuku T, Uchiyama S, Goshima Y, Kumanogoh A, Takagi J	Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor.	Nature	467	1123 - 1127	2010
Ishii H, Kubo T, Kumanogoh A, Yamashita T	Th1 cells promote neurite outgrowth from cortical neurons via a mechanism dependent on semaphorins.	Biochem Biophys Res Commun	402	168 - 172	2010
Takegahara N, Kang S, Nojima S, Takamatsu H, Okuno T, Kikutani H, Toyofuku T, Kumanogoh A	Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements.	FASEB J	24	4782 - 4792	2010
Kumanogoh A, Kikutani H	Semaphorins and their receptors: novel features of neural guidance molecules.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	86	611 - 620	2010

Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A	Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II.	Nat Immunol	11	594 - 600	2010
Yukawa K, Tanaka T, Kishino M, Yoshida K, Takeuchi N, Ito T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A	Deletion of Sema4D gene reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice.	Int J Mol Med	26	39 - 44	2010
Tominaga T, and Tominaga Y	GABA(A) receptor-mediated modulation of neuronal activity propagation upon tetanic stimulation in rat hippocampal slices.	Pflugers Arch	460	875 - 889	2010
Tominaga T and Tominaga Y	Practice for the optical recording method of neuronal circuit analysis.	Seibutsu Butsuri 生物物理	51 (2)	092 - 095	2011
Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y, Takamori S, Ebihara S, Uematsu M, Mishina M, Miyazaki J, Yokoyama M, Konishi S, Inoue K, Fukuda A, Fukumoto M, Nakamura K, Obata K, Yanagawa Y	The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice.	Mol Brain	3	40	2010

Sano Y, Ornathanalai VG, Yamada K, Homma C, Suzuki H, Suzuki T, Murphy NP, Itohara S.	X11-Like Protein Deficiency Is Associated with Impaired Conflict Resolution in Mice.	The Journal of Neuroscience	29 (18)	5884 - 5896	2009
Homma C, Yamada K	Physical properties of bedding materials determine the marble burying behavior of mice (C57BL/6J)	TOBSJ	3	34 - 39	2009
Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, Ogura H, Yamada K, Chatton B, Ishii S.	Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene.	EMBO J	29	184 - 195	2009
Sakatani S, Yamada K, Homma C, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hirase H.	Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice	PLoS One	4 (12)	e8309	2009
Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J	Brain structure impairment and Behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams	J Toxicol Sci	34 SP2	279 - 286	2009
Sekiyama K, Hashimoto O, Ushiro Y, Adachi C, Kikusui T, Tanemura K, Hasegawa Y	Abnormalities in aggression and anxiety in Tg mice overexpressing activin E	Biochem Biophys Res Commun	385 (3)	319 - 323	2009
Asano H., Aonuma M., Sanosaka T., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K	Astrocyte Differentiation of Neural Precursor Cells is Enhanced by Retinoic Acid Through a Change in Epigenetic Modification	Stem Cells	27	2744 - 2752	2009

Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F.H	Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis	Nat Neurosci	12	1097 - 1105	2009
Tsujimura K., Abematsu M., Kohyama J., Namihira M., Nakashima K	Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2	Exp Neurol	219	104 - 111	2009
Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, Toyofuku T, Nakagawa Y, Sujin Kang, Friedel RH, Sakoda S, Kikutani K and Kumanogoh A	Roles of Sema4D-Plexin-B1 interactions in the CNS for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis	J. Immunol	184	1499 - 1506	2010
Nawabi H, Briancon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzid K, Castellani V.	A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates.	Gen Dev	24	396 - 410	2010
Takegahara N, Kumanogoh A	Involvement of semaphorins in neurological diseases.	Clinical Exp. Neuroimmunol	1	33 - 45	2010
Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Iso H, Li L, Kohsaka A, Waki H, Miyajima M, Maeda M, Kikutani H, Kumanogoh A	Sema4D/CD100 deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior.	Can J Neurol Sci	36	349 - 355	2009
Mizui M, Kumanogoh A, Kikutani H.	Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules.	J Clin Immunol	29	1 - 11	2009

Tominaga, Y., Ichikawa, M., Tominaga, T	Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABAA-mediated feed-forward inhibition in signal propagation.	Neurosci Res	64	152 - 161	2009
Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S	A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles	Nature Neuroscience	12	156 - 162	2009
M. Sakurai, M. Sekiguchi, K. Zushida, K. Yamada, S. Nagamine, T. Kubota, K. Wada	Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a pontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene	European Journal of Neuroscience	27	691 - 701	2008
T. Kato, K. Yamada et al	Behavioral and gene expression analysis of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder	Neuroscience Research	61	143 - 158	2008
S. Endo, F. Shutoh, T.L. Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N. Hartell, K. Yamaguchi, S. Itohara, A. Narin, P. Greengard, S. Nagao, M. Ito	Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion	PNAS	106	3525 - 3530	2009

Nakashima K.	Residual Neural Precursor Cells				
Kohyama J., Kojima T., Takatsuka E., Yamashita T., Namiki J., Hsieh J., Gage F.H., Namihira M., Okano H., Sawamoto K., Nakashima K	Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain	Proc Natl Acad Sci USA	105	1801 2 - 1801 7	2008
Sanosaka T., Namihira M., Asano H., Kohyama J., Aisaki K., Igarashi K., Kanno J., Nakashima K	Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells	Neuroscience	155	780 - 788	2008
Hatada I., Namihira M., Morita S., Kimura M., Horii T., Nakashima K	Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation	PLoS ONE	3	e318 9	2008
Martens H, Weston MC, Boulland JL, Gronborg M, Groshe J, Kacza J, Hoffmann A, Matteoli M, Takamori S, Harkany T, Chaudhry FA, Rosenmund C, Erck C, Jahn R, Hartig W	Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses	The Journal of Neuroscience	28	1312 5 - 1313 1	2008
Koganezawa, N., Taguchi, A., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K., Witter, M.P., and Iijima, T.	Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus	Neurosci Res	61	172 - 181	2008

トランスポートソームの世界

— 膜輸送研究の源流から未来へ —

金井好克／竹島 浩／森 泰生／久保義弘
編著

文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究
「生体膜トランスポートソームの分子構造と生理機能」
(平成 17 年度～平成 21 年度)



京都廣川書店
KYOTO HIROKAWA

濃度の増加や Ca^{2+} シグナルの亢進を引き起こすものと考えられた。興味深いことに、現在開発されている NCX 阻害薬は、この Ca^{2+} 流入モードを選択的に阻害することが知られている¹⁾。そこで、NCX 阻害薬は生理的な Ca^{2+} 汲み出し機能に影響を与えず、病態時の Ca^{2+} 流入を阻害する理想的な薬物になる可能性を秘めている。NCX 阻害薬は、 Ca^{2+} 拮抗薬に続く新たな Ca^{2+} 調節薬として今後の臨床応用が期待される。

(4-2-5 岩本隆宏, 喜多紗斗美)

参考文献

- 1) Iwamoto T. *Future Cardiol.* **1**, 519-529, 2005.
- 2) Reuter H. *et al. J. Physiol.* **195**, 451-470, 1968.
- 3) Blaustein M.P. *et al. J. Physiol.* **200**, 497-527, 1969.
- 4) Nicoll D.A. *et al. Science* **250**, 562-565, 1990.
- 5) Mohler P.J. *et al. PLoS Biol.* **3**, e423, 2005.
- 6) Mohler P.J. *et al. Nature* **42**, 634-639, 2003.
- 7) Hilgemann D.W. *et al. Ann. N.Y. Acad. Sci.* **779**, 136-158, 1996.
- 8) Weber C.R. *et al. J. Gen. Physiol.* **117**, 119-131, 2001.
- 9) Pan Y. *et al. Am. J. Physiol.* **279**, C393-C402, 2000.
- 10) Hamlyn J.M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6259-6263, 1991.
- 11) Iwamoto T. *et al. Nat. Med.* **10**, 1193-1199, 2004.
- 12) Dostanic-Larson I. *et al. Am. J. Physiol.* **290**, R524-R528, 2006.
- 13) Blaustein M.P. *et al. Hypertension* **53**, 291-298, 2009.
- 14) Zhang J. *et al. J. Physiol.* **569**, 243-356, 2005.

4-2-6 グルタミン酸性シナプス小胞のトランスポートソーム

(1) はじめに

神経間あるいは神経-効果器間のシグナル伝達は、シナプスと呼ばれる微小な細胞接着部位で行われる。神経終末には、シナプス小胞と呼ばれる直径約 40 nm のオルガネラが多数存在し、内腔に神経伝達物質が濃縮されている。神経終末に活動電位が到達し、電位依存性カルシウムチャンネルが開くと、流入したカルシウムイオンによって小胞膜と形質膜の膜融合 (= エキソサイトーシス) が促され、神経伝達物質が細胞外に放出される。放出された神経伝達物質が隣接した細胞の受容体に結合することで、様々なシグナルが伝搬される。膜融合により、形質膜に挿入されたシナプス小胞は、エンドサイトーシスにより再び神経終末で合成され、神経伝達物質が再充填されることで、次の刺激に備える。従って、シナプス伝達が様々な強度の刺激に対応して維持されるためには、新たに合成されたシナプス小胞に神経伝達物質を再充填するシステムが必須であり、この過程を司るのが「小胞型神経伝達物質トランスポーター」である。本稿では、哺乳類中枢神経系で最も主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸を小胞内に輸送する小胞型グル

タミン酸トランスポーター (VGLUT: Vesicular Glutamate Transporter) に焦点を絞り、トランスポーターの特性と生理学的意義、VGLUTを取り囲む「トランスポートソーム」に関する最近の知見を概説する。

(2) グルタミン酸のシナプス小胞への取込活性

グルタミン酸は、生体内の全ての細胞内に比較的高濃度で存在する酸性アミノ酸である。それにも関わらず、哺乳類脳神経系においては、最も主要な興奮性神経伝達物質としてシグナル伝達を司り、知覚・認知・学習、記憶といった脳高次機能を支えている。特定の神経細胞のみがグルタミン酸をエキソサイトーシスによって放出する為には、シナプス小胞内腔にグルタミン酸を濃縮するための特別なシステムを備えていなければならない。脳から精製したシナプス小胞へのグルタミン酸取込活性は、1980年代になってトリチウム標識されたグルタミン酸を用いた生化学

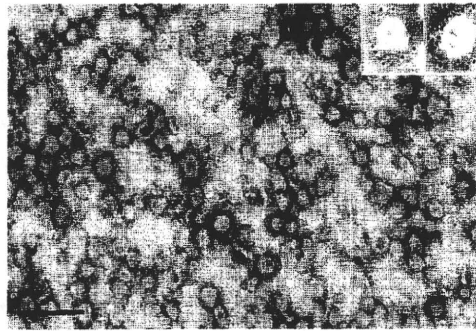


図 4-2-6a ラット脳から精製したシナプス小胞の電子顕微鏡像 (Scale bar, 100 nm).

V-ATPase 依存的なグルタミン酸取込活性を保持している。

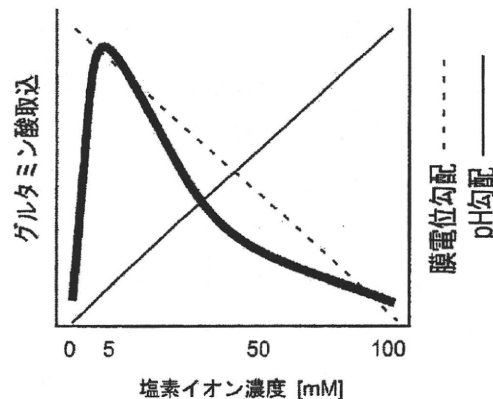


図 4-2-6b グルタミン酸輸送の Cl⁻ 依存性

脳から精製されたシナプス小胞へのグルタミン酸輸送は、Cl⁻濃度に対して二層性の依存性を示す。また、V-ATPaseによって形成されるプロトン電気化学勾配は、小胞膜のCl⁻チャンネルによって、電氣的勾配(膜電位勾配, 点線)と化学的勾配(pH勾配, 実線)の成分が変化する。

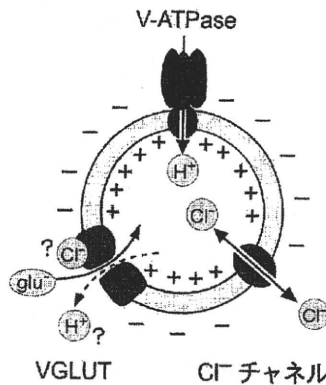


図 4-2-6c グルタミン酸取込に関わる 3 つの成分

シナプス小胞へのグルタミン酸輸送は、プロトンポンプ (V-ATPase)、トランスポーター (VGLUT)、Cl⁻チャネルの 3 つの活性によって制御されている。

的取込アッセイによって初めて検出された¹⁾ (図 4-2-6a). シナプス小胞画分を用いた一連の生化学的な輸送活性測定から、グルタミン酸のシナプス小胞への取込は、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) が形成するプロトン電気化学勾配に依存した二次輸送であること、グルタミン酸に特異的な輸送であることに加えて、Cl⁻に対して特徴的な二層性の依存性を示すことが判明した²⁾ (図 4-2-6b). また、シナプス小胞膜が Cl⁻を透過する性質を持っていることが、pH 勾配感受性蛍光色素を用いた実験から明らかになった。これらの実験を総合的に評価すると、シナプス小胞のグルタミン酸輸送系には、V-ATPase・小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT)・Cl⁻チャネルの 3 つのコンポーネントが必須であることが提唱された (図 4-2-6c).

(3) 小胞型グルタミン酸トランスポーターの分子同定

長らく探し求められていた VGLUT の分子実体は、2000 年になって明らかになった。意外なことに、VGLUT の正体は、Na⁺濃度勾配を駆動力として無機リン酸を細胞内に輸送する遺伝子 (BNPI; Brain-specific Na⁺-dependent inorganic Phosphate Transporter I) として既にクローニングされていた別の遺伝子産物であった³⁾。当時の遺伝子データベースを用いたホモロジー検索から、BNPI と最も相同性の高い遺伝子はウサギ腎臓に発現する形質膜型リン酸トランスポーターであり、事実、BNPI の mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると Na⁺依存的なリン酸輸送活性が顕著に上昇した³⁾。ところが、BNPI タンパク質の脳内局在を詳しく調べると、形質膜よりもむしろシナプス小胞膜に局在しており、しかもグルタミン酸作動性ニューロンの神経終末に限定して発現していることが明らかになった^{4,5)}。また、線虫における BNPI 相同遺伝子 EAT-4 の機能解析から、EAT-4 変異体はグルタミン酸シナプス伝達の欠陥を呈するものの、グルタミン酸受容体の機能は損なわれていないことがわかった⁶⁾。これらのヒントを元に、筆者らと UCSF の Robert Edwards のグループは、BNPI がシナプス小胞上でグルタミン酸の取込に関わる可能性を様々な観点から検討した結果、BNPI は小胞上でグルタミン酸トランスポーターとし