

3. 1. NMDA受容体における各種アミノ酸効果測定のための実験方法

(a) 卵母細胞の摘出とメッセンジャーRNAのインジェクション

Xenopus は動物材料会社から購入後、プラスチックのタンクに飼育した。*Xenopus* の生存習性によって、餌の与えることや、水の交換、温度の調節などを行った。卵母細胞摘出手術では、*Xenopus* に麻酔をかけた後、腹部を切開し卵母細胞の塊を摘出した。摘出した卵母細胞は卵母細胞層(follicle cell layer)により包まれている。この卵母細胞層は、種々の内在性受容体を含み、また、伝達物質の拡散障壁を拡大させるので、この層の除去が必要である。除去の為に酵素処理やピンセットによる皮むきが行われた。そして卵母細胞層を除いた卵母細胞に受容体をコードするメッセンジャーRNAを注入した。卵母細胞内にある蛋白合成能力を利用して細胞膜上に目的蛋白質(NMDA受容体)を発現させた。2~3日後、受容体が細胞膜上に発現した。そして、発現後、二電極電位固定法を用いて受容体チャネルを通る電流を測定した。

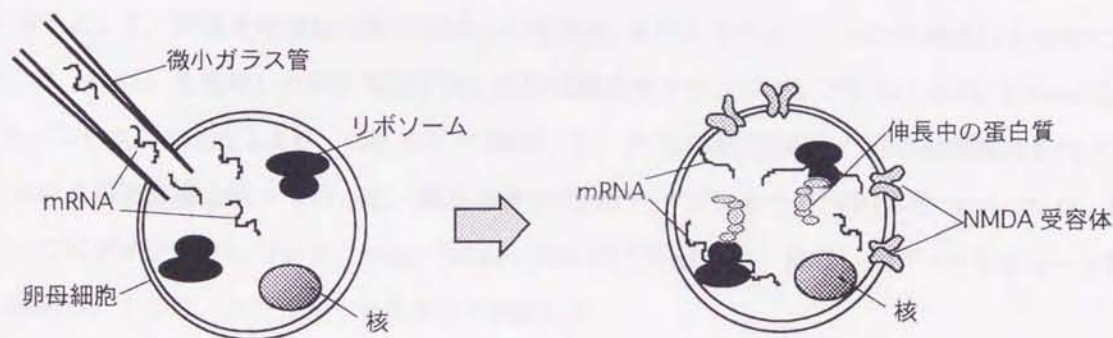


図16: メッセンジャーRNA注入による蛋白発現の模式図

微量注入装置を使い、卵母細胞層が除去された卵母細胞にメッセンジャーRNAを注入する。細胞内に注入されたメッセンジャーRNAをリボソームが読みとる。読みとった遺伝情報を基にリボソームがNMDA受容体蛋白を産生する。その後、NMDA受容体は膜を貫通するように組み込まれる。

(b) 二電極電位固定法による測定

二電極電位固定法の原理

二電極電位固定法とは二本のガラス管電極を細胞の膜内に刺して、細胞内の電位を固定し、細胞膜を通るイオン電流を測定する方法である。二本のガラス管電極の内一本が細胞内の電位を測定し、他方が細胞内電位を固定するための電流を流す。発現した受容体の結合部位に神経伝達物質が結合すると、受容体のイオンチャネルが開き、そこを電流が流れる。イオンの流れは細胞内のイオン濃度を変化させる。イオン濃度の変化は電位の変化としてクランプアンプに入力される。クランプアンプは設定された固定電位と入力された電位の差を補償するための電流を流し、細胞内電位を固定する。この補償電流を測定する。

測定方法

卵母細胞を記録用のチェンバーに置き、NMDA受容体の応答電流は Mg^{2+} により阻害されるので、 Mg^{2+} を含まないリンガー液 [119.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, and 8.0 mM Tris

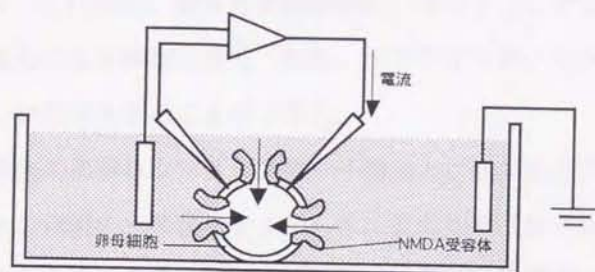


図17：二電極電位固定法の模式図

(pH 7.4)]で灌流した(4 mL/min). 測定を20~22度において行った. プレアンプのプロープのアース端子として, 銀塩化銀電極を寒天橋(Agar bridge)を介してチェンバーの中を流れる溶液に接続した. 3 M KCl を充填した微小電極を刺した卵母細胞をクランプアンプ(CEZ1200, Nihon Kohden Co., Tokyo, Japan)により, -60 mV に固定した. アミノ酸の投与を7 秒の時間遅れを持つ三方栓からなる灌流装置を使って行った. 電気信号をPCMデータプロセッサ(VR10-B Instrutech Co.)を介してビデオテープレコーダ(Sony, Tokyo, Japan)で記録した. 記録したデータをチャート記録紙に印刷し, さらに, コンピュータを使って解析した.

3. 2. 各種アミノ酸効果の実験結果

各アミノ酸による効果の比較を, 10 μ M L-グルタミン酸と10 μ M グリシンとの同時投与の応答電流の大きさに対して行った. ϵ 1と ζ 1との組み合わせにおける比較では, アラニン, システイン, セリンが応答電流を示し, D型のアミノ酸に対する応答電流がL型による電流よりも大きい(図18). ϵ 2と ζ 1では, アラニン, システイン, セリンが応答電流を示し, システインとセリンのD型のアミノ酸に対する応答電流がL型による電流よりも大きい, アラニンではL型がわずかに大きかった(図19). ϵ 3と ζ 1では, アラニン, システイン, セリンが比較的大きな応答電流を示し, システインとセリンのD型のアミノ酸に対する応答電流がL型による電流よりも大きい, アラニンではほぼ同様の大きさであった(図20).

3. 2. 考察

結果より各種アミノ酸のうちアラニン, システイン, セリンが応答に貢献することがあきらかになった. さらにそれぞれのD型のアミノ酸の応答電流がL型の物よりも大きい傾向にあった. Keithらは,

いくつかのアミノ酸がストリキニーネ非感受性のグリシン結合を抑制することをあらわし、それらの効果の順位が、グリシン > D-セリン >> L-セリン > β -アラニンであることもあきらかにした (Keith ら 1989). McBain らの電気生理学的測定結果によると、NMDA 受容体のグリシン結合部位を介する活性の順位は、グリシン > D-セリン > D-アラニン > β -fluoro-アラニン > L-セリン > L-アラニンである (McBain ら 1989). 我々の実験結果は、グリシン、アラニン、セリンが NMDA 受容体の増強的調節要素であることを確認させた。また、システインがグリシンに比較できる程度の電流増強を行ったという新しい知見を得ることもできた。

それぞれの分子構造式を他の応答しないアミノ酸分子構造と比較するとグリシン同様に比較的単純であり似ているが、セリンの側鎖の水素部分をメチル基に変えただけのトレオニンではほとんど応答しないことは興味深い。これらの分子構造情報は、受容体の結合部位構造や結合の仕方の予測に貢献するだろう。原著論文では、 $\epsilon 1$ と $\gamma 1$ との組み合わせにおける、アラニン、システイン、セリンの電流増強効果を詳しく解析し、各アミノ酸の分子構造と増強効果の関係をコンピュータによる計算からあきらかにした。

NMDA $\epsilon 1 + \zeta 1$

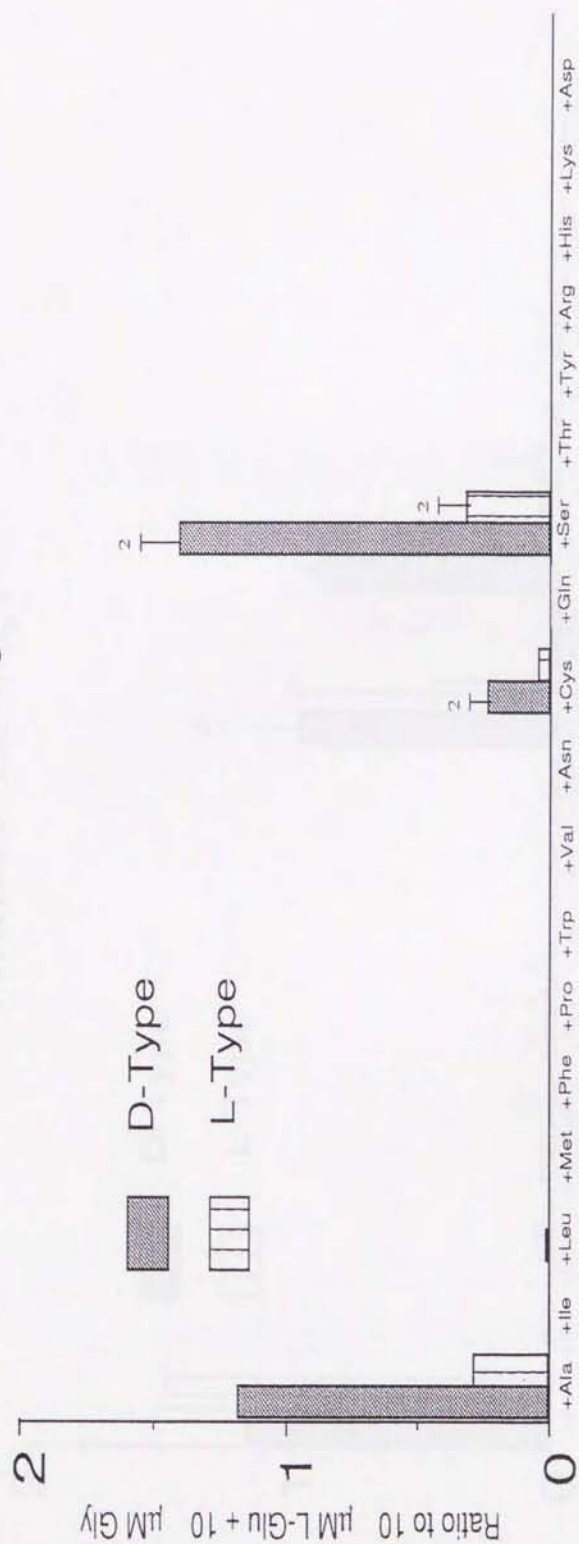


図 18: $\epsilon 1$ と $\zeta 1$ との組み合わせにおける, 各アミノ酸による効果の比較を, 10 μM L-グルタミン酸と10 μM グリシンとの同時投与の応答電流の大ききさに対して行った. グラフは平均値, バーは標準偏差をあらわす.

NMDA $\epsilon 2 + \zeta 1$

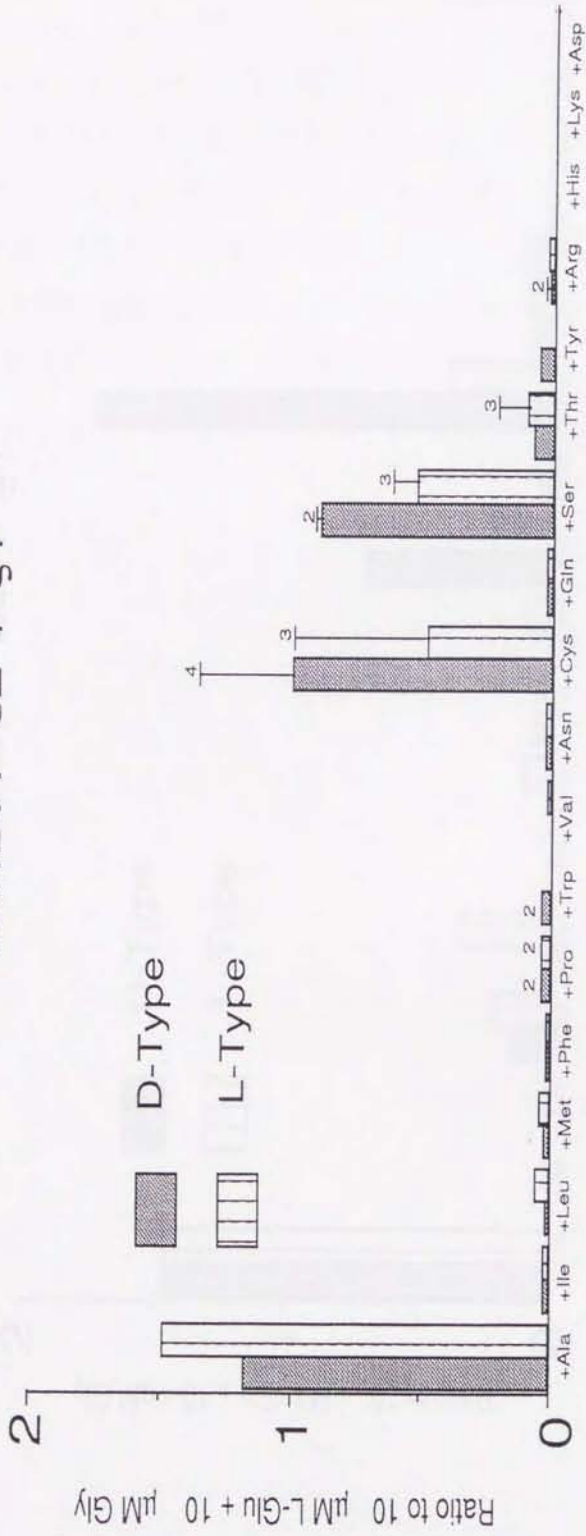


図 19: $\epsilon 2$ と $\zeta 1$ との組み合わせにおける, 各アミノ酸による効果の比較を, 10 μM L-グルタミン酸と10 μM グリシンの同時投与の応答電流の大きさに対して行った. グラフは平均値, バーは標準偏差をあらわす.

NMDA $\epsilon 3 + \zeta 1$

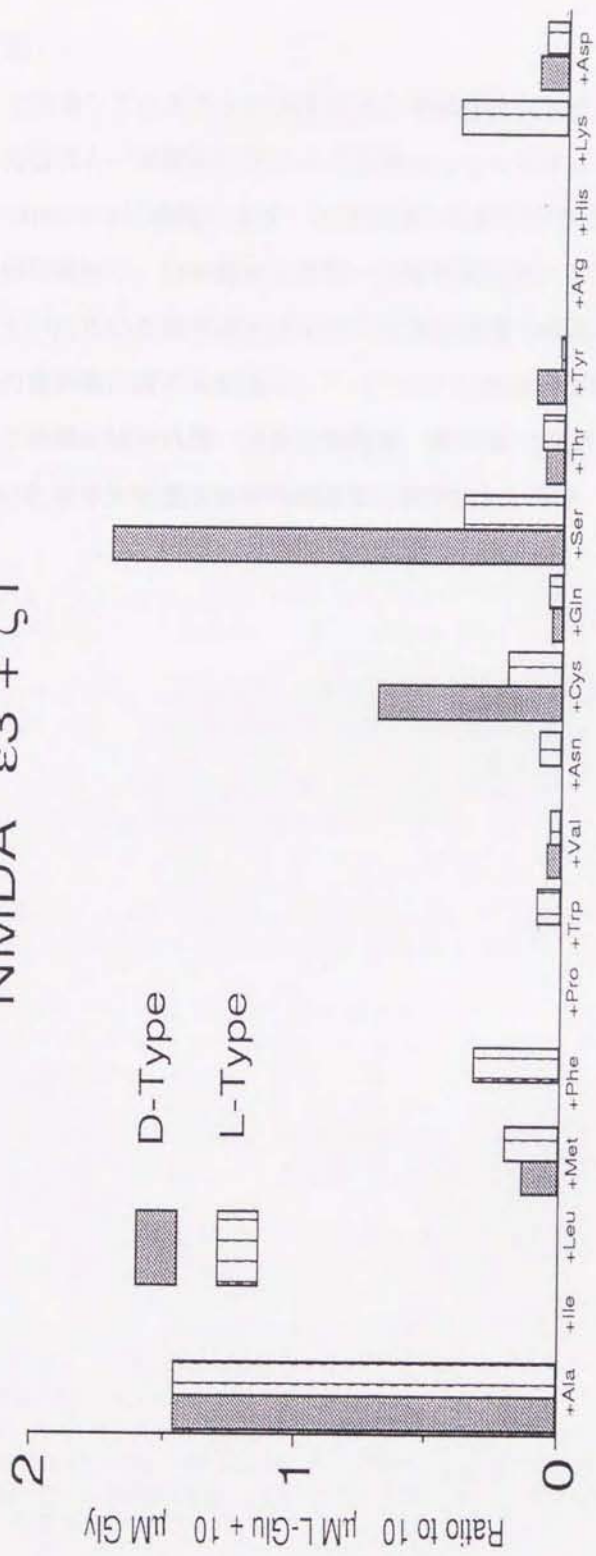


図 20: $\epsilon 3$ と $\zeta 1$ の組み合わせにおける, 各アミノ酸による効果の比較を, $10 \mu\text{M}$ L-グルタミン酸と $10 \mu\text{M}$ グリシンとの同時投与の応答電流の大きさに対して行った. グラフは平均値, バーは標準偏差をあらわす.

謝辞

ご指導して下さった岩手大学工学部福祉システム工学科の新貝鉦蔵教授に感謝します。また、試料の提供と一年間の留学中のご指導をして下さったBrown 大学のDr. John Marshall (Associate Professor)に感謝します。助言を頂いた岩手大学工学部福祉システム工学科の小栗栖太郎助教授、坂田和実助手、岩手医科大学第一生理学講座佐々木和彦教授、 Ca^{2+} イオンメーターによる測定に協力していただいた岩手医科大学第二生理学講座中谷重行助教授に感謝いたします。 Ca^{2+} とwillardiineとの複合体に関する討論をしていただいた岩手大学教育学部菊池洋一助教授、岩手大学工学部応用分子工学龍川雄治教授、熊谷直昭教授、成田榮一教授に感謝いたします。論文原稿にコメントしていただいた岩手大学農学部平秀晴教授に感謝いたします。

参考文献

- Assaf SY and Chung SH. Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. *Nature* 1984; 308: 734-736.
- Bock JB and Scheller RH. Protein transport. A fusion of new ideas. *Nature*. 1997; 387: 133-135.
- Burnashev N, Villarroel A, and Burnashev B. Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *Journal of Physiology* 1996; 496.1: 165-173.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA, and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.* 1995; 485, 403-418.
- Chouinard ML, Gaitan D, Wood PL. Presence of the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor agonist, D-serine, in human temporal cortex: comparison of normal, Parkinson, and Alzheimer tissues. *J. Neurochem.* 1993; 61: 1561-1564.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, and Traynelis FS. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 1999; 51 : 7-61.
- Egebjerg J, Heinemann SF. Ca^{2+} permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1993; 90(2): 755-759.
- Egebjerg J, Bettler B, Borgmeyer HI, and Heinemann S. Cloning of cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 1991; 351 : 745-748.
- Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology.* 1988; 27: 1183-1185.
- Fukushima T, Marshall J, Sakata T, and Shingai R. Calcium inhibits willardiine-induced responses in kainate receptor GluR6(Q)/KA-2. *NeuroReport* 2001; 12: 163-167.
- Gasic GP, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 1992; 54: 507-536.
- Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, et. al. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 1993; 61: 348-351.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K. Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J. Neurochem.* 1993; 60: 783-786.
- Hay JC and Scheller RH. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 505-512.
- Herbe A, Burnashev N, Werner P, Burnashev B, Wisden W, and Seeborg HP. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 1992; 8: 775-785.

Hess P, Lasman JB and Tsien RW. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.* 1986; 88: 293-319.

Huettner JE., Stack E and Wilding TJ. Antagonism of neuronal kainate receptors by lanthanum and gadolinium. *Neuropharmacol.* 1998; 37: 1239-1247.

Iino M, Ozawa S, Tsuzuki K. Permeation of Calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal. *J. Physiology* 1990; 424: 151-165.

Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.* 1987; 325: 529-531.

Kamboj K. Sunjeev, Geoffrey T. Swanson and Stuart G. Cull-Candy. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium permeable AMPA and kainate receptors. *Journal of Physiology* 1995; 486: 297-303.

Keith RA, Mangano TJ, Meiners BA, Stumpo RJ, Klika AB, Patel J, Salama AI. HA-966 acts at a modulatory glycine site to inhibit N-methyl-D-aspartate-evoked neurotransmitter release. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 166: 393-400.

Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1988; 241: 835-837.

Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T. Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain. Res.* 1995; 681: 117-125.

Kuryatov A. Laube B. Betz H. Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron.* 1994; 12: 1291-1300.

Laube B. Hirai H. Sturgess M. Betz H. Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron.* 1997; 18: 493-503.

Marshall J, Mollloy R, Moss GWJ, Howe JR and Hughes TE. The jellyfish green fluorescent protein: A new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 1995; 14: 211-215.

Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J. Neurochem.* 1995; 65: 454-458.

Matthews G. Vesicle fiesta at the synapse. *Nature* 2000; 406: 835-836.

Mayer A, Scheglmann D, Dove S, Glatz A, Wickner W and Haas-A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11: 807-817.

Mayer ML and Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J. Physiol.* 1987; 394: 501-527.

McBain CJ, Kleckner NW, Wyrick S, Dingledine R. Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes.

Mol-Pharmacol. 1989; 36: 556-565.

Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 1992; 357: 70-74.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 1992; 256: 1217-1221.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 1991; 354: 31-37.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992; 258: 597-603.

Nichols BJ, Ungermann C, Pelham HR, Wickner WT and Haas A. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature*. 1997; 387: 199-202.

Partin KM, Bowie D, and Mayer ML. Structural determinants of allosteric regulation in alternatively spliced AMPA receptors. *Neuron*. 1995; 14: 833-843.

Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML and Buonanno A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus Kainate Receptors by Cyclothiazide and Concanavalin A. 1993; *Neuron* 11, 1069-1082.

Patneau DK, Mayer ML, Jane DE, Watkins JC. Activation and desensitization of AMPA/kainate receptors by novel derivatives of willardiine. *J Neurosci*. 1992; 12: 595-606.

Pevsne J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK and Scheller RH. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron*. 1994; 13: 353-361.

Reichling DB and MacDermott AB. Lanthanum actions on excitatory amino acid-gated currents and voltage-gated calcium currents in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol*. 1991; 441: 199-218.

Sakata K, Fukushima T, Minje L, Ogurusu T, Taira H, Mishina M, and Shingai R. Modulation of L-glutamate response by L- and D-forms of amino acids in recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochemistry* 1999; 38, 10099-10106

Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92: 3948-3952.

Shingai R, Yanagi K, Fukushima T, Sakata K, Ogurusu T. Functional expression of GABA ρ 3 receptors in *Xenopus* Oocytes. 1996; *Neuroscience Research* 26: 387-390.

Sollner T and Rothman JE. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse. *Trends. Neurosci*. 1994; 17: 344-348.

Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH and Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 1993; 75: 409-418.

Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T,

Sakmann B, and Seeburg PH. Flip and Flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*. 1990; 249: 1580-1585.

Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channel. *Cell* 1991; 67: 11-19.

Swanson GT, Green T, Heinemann SF, Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Mol Pharmacol*. 1998; 53: 942-949.

Vernino S, Amdor M, Luetje WC, Patrick J, and Dani DA. Calcium modulation and high Calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 1992; 8, 127-134.

Weast CR, Astle JM, Beyer HW. *CRS Handbook of chemistry and Physics*, 69 th edition, 1988; p, F-164. CRC Presss, Inc., Boca Ranton, FL, USA.

Wisden W, Seeburg PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol*. 1993; 3: 291-298.

Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 1999; 96: 721-725

Yoneda Y, Ogita K. Neurochemical aspects of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Neurosci. Res*. 1991; 10: 1-33.

Zorumski CF; Thio LL; Clifford DB. Effects of bromowillardiine and willardiine on non-N-methyl-D-aspartate receptors in postnatal rat hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*. 1991; 40: 45-51.

石塚徹, 阿部輝雄. 神経伝達物質の放出に関する蛋白質シナーフィン. *蛋白質 核酸 酵素*. 2000; 45 (3): 449 - 455

柳原延章, 豊平由美子, 上園保仁, 上野普 泉太. 副腎髄質クロマフィン細胞におけるCa²⁺情報伝達機序. *蛋白質 核酸 酵素*. 1998; 43 (12): 404 - 355

付録1. 調製溶液類

PBS (Phosphate-buffered saline)

10×PBS :

80g NaCl

2g KCl

29g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

上記の試薬をMQ(Milli-Q Labo小型超純水製造装置) 水で1000mlにfill up

蒸気圧滅菌

4°Cで保存

1×PBS :

10×PBSを滅菌済みのMQ水で10倍に希釈

4°Cで保存

1%EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

2gのEDTAをMQ水で200mlにfill up

蒸気圧滅菌

4°Cで保存

PBS/EDTA

10×PBS 10ml

1%EDTA 2ml

MQ水 88ml

蒸気圧滅菌

4°Cで保存

0.1% Trypsin/PBS/EDTA

10×PBS 10ml

1%EDTA 2ml

MQ水 88ml

上記の液を200mlビーカーにてstir

121℃、20minの蒸気圧滅菌

室温にて冷却

100mgのTrypsinを加えstir

クリーンベンチ内で0.22 μ mのフィルターによる濾過滅菌

0℃で保存

NCS (Newborn Calf Serum : 仔牛血清)

血清の非働化(heat inactivate)

プロテアーゼ (蛋白質分解酵素) を失活させる

血清を37℃のウォーターバスで、解凍

56℃のオーブンで30分

2、3本の滅菌済みの瓶に分注

10%炭酸水素ナトリウム液

MQ水100mlを蒸気圧滅菌

10gNaHCO₃を蒸気圧滅菌済みのMQ水で100mlにfill up

クリーンベンチ内で0.22 μ mのフィルターによる濾過滅菌

5mlずつ分注し、-20℃で保存

3% グルタミン溶液

3gのGlnを蒸気圧滅菌済みの1×PBSで100mlでfill up

クリーンベンチ内で0.22 μ mのフィルターによる濾過滅菌

5mlずつ分注し、-20℃で保存

5%NCS-ダルベッコ変法イーグル培地

4.75gの粉末のDME培地を500mlの水に溶かし、15分間高圧蒸気滅菌をした。これに、10%炭酸水素ナトリウム10ml,3%グルタミン10ml,ペニシリン・ストレプトマイシン溶液1mlを加え4℃で保存した。

500mlから190mlに培地を分注し、NSC10mlを加え、4℃で保存した。

付録2：シナプス前終末からの伝達物質放出機構

本文では主に、シナプスの情報を受け取る側（シナプス後膜）の機構について記述したが、この付録2では情報を送る側（シナプス前膜）の機構の概要を記述する。軸策を伝わって、活動電位がシナプス前終末に到達することにより、伝達物質がシナプス間隙に放出される。伝達物質放出に関わる蛋白は、SNARE (soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor)と総称される (Sollnerら 1993)。シナプス小胞側にある蛋白を総称してv-SNARE (vesicle-SNAP receptor)と呼ぶ。その中には細胞膜側の Syntaxin や SNAP-25 (soluble NSF attachment protein mw 分子量 33~36 K: NSFに会合する蛋白)と結合するSynaptobrevin (VAMP), 放出時の引き金としてのCa²⁺センサーと想定されている Synaptotagmin, Rab3A と結合するラプフェリンがある。Synaptobrevin が、Ca²⁺センサーとして想定されている所以は、PKCのCa²⁺結合部位として知られているC2ドメインと相同性の高い領域を細胞質側に2個有しているからである。また、この蛋白は一回膜貫通蛋白である。そして、細胞膜側にある蛋白を総称してt-SNARE (target-SNAP receptor)と呼ぶ。その中には、Synaptobrevin (別称: VAMP)と結合するSyntaxin, SNAP-25がある。さらに、t-SNARE と v-SNARE 結合を仲介する蛋白として、NSF (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein: ATPase (分子量 76K): エネルギー供給係), SNAP-25 がある。

その分子機構の全貌はいまだに解明されていないが、下記のような過程からなると考えられている (石塚と阿部 2000)。

- (1) シナプス小胞内へ伝達物質を輸送し、濃縮する。
- (2) シナプス小胞を放出部位へ搬送する。(トランスロケーション)
キネシンがシナプス小胞を微小管に沿って輸送する。アクチン繊維は、シナプス小胞のactive zone への輸送 (reserve から pool releasable pool への小胞の移動) に関与していると推定される。シンデリンがF(Fibrous: 繊維)-アクチンを切断する。シナプシンがアクチンと小胞を結合する。
- (3) シナプス小胞を形質膜に係留する(ドッキング)
NSFとSNAP(やRab3A)がドッキングを仲介する。小胞側のSynaptobrevin と 細胞膜側のSyntaxin や SNAP-25 が絡み合う。
- (4) シナプス小胞と形質膜を融合直前の状態まで反応を進行させる(反融合, プライミング)。
ATPからADPの加水分解からエネルギーを得てSNFとSNAP(やRab3A)が離れる。
- (5) 活動電位による脱分極により、電位依存性Ca²⁺チャネルが開口し、細胞外から細胞内へCa²⁺が流入する。流入したCa²⁺がSynaptotagminと反応する。これが融合の引き金になる。(フュージョン)
- (6) シナプス小胞膜とシナプス前終末形質膜の融合により、内容物をシナプス間隙に放出する(エ

キソサイトーシス)

(7) いったん融合した小胞膜を取り込み、新たな小胞を形成する (エンドサイトーシス)。
ダイナミンが仲介する。

(8) エンドサイトーシスした小胞を分泌可能なシナプス小胞に再生する。

これら(1)~(8)がサイクルとして繰り返されることにより、シナプス前終末は、入力に対して次々と伝達物質を放出することができる。図 18, 19 に伝達物質放出の過程の模式図をあらわす。

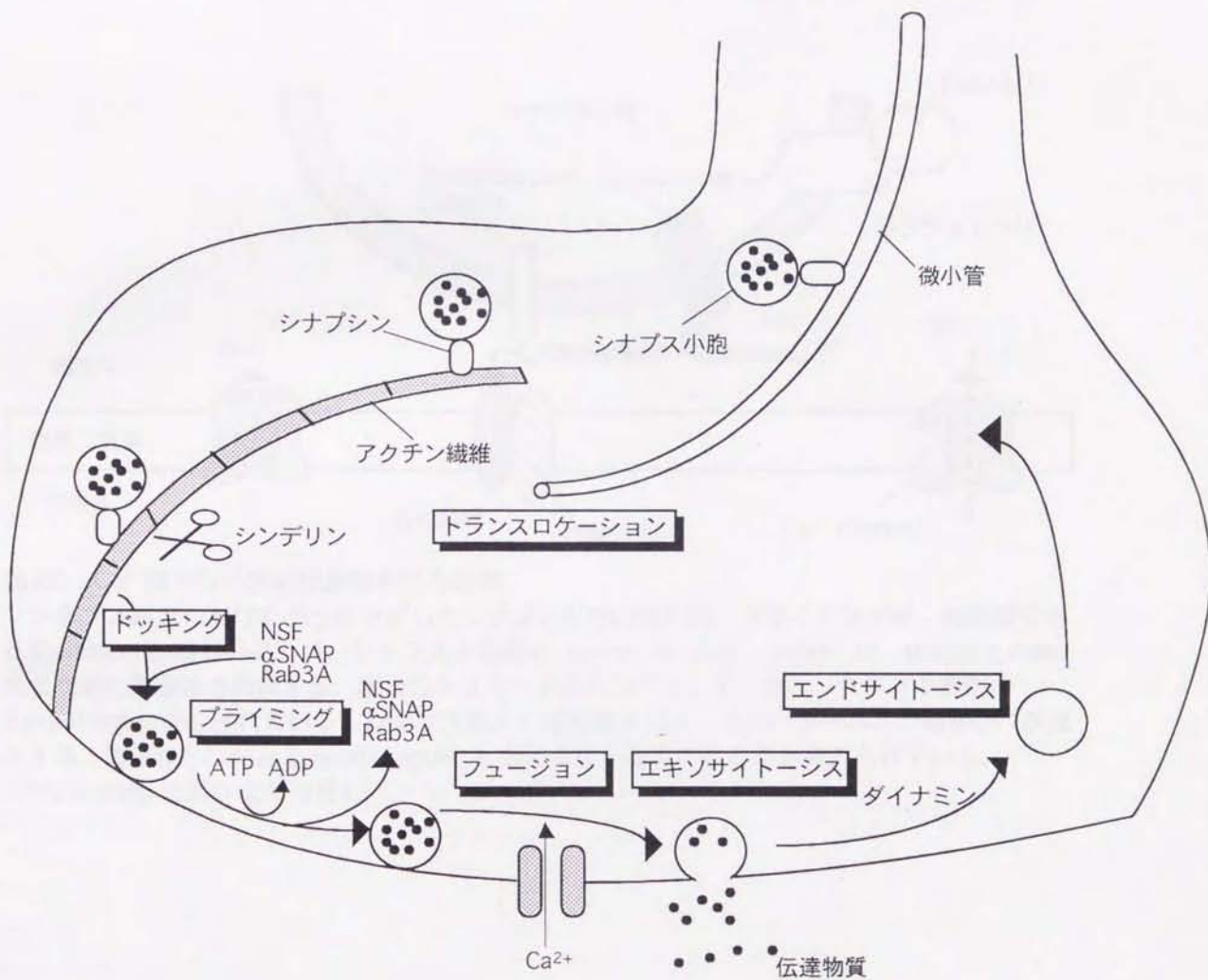


図 19 : 伝達物質放出とそれぞれの過程における調節蛋白質の関与

SNARE仮説を中心とした伝達物質放出過程を模式的に示した。詳細は本文を参照。しかしながら、これらはまだ仮説の域を出ていない。(柳原ら 1998より改変)

図 19 の予想過程は SNARE 仮説(Sollnerら 1993)を中心に構成したが、その SNARE 仮説では説明できない状況が出始めてきた。例えば、NSF と SNAP の作用点について、SNARE 仮説では膜の融合が起こる直前で作用することが予想されている。しかし、最近の報告によるとむしろ、小胞の結合前の過程や膜の融合後の過程で機能していることが示唆されている(図 20 B, C) (Mayerら 1996, Bock と Scheller 1997, Nicholsら 1997, Hay と Scheller 1997)。多くの点で、SNARE仮説の修正が必要であるが、シナプス小胞とシナプス前膜との結合と融合の過程には、Syntaxin, SNAP-25, Synaptobrevin / VAMP が中心的に機能していることはほぼ間違いない。

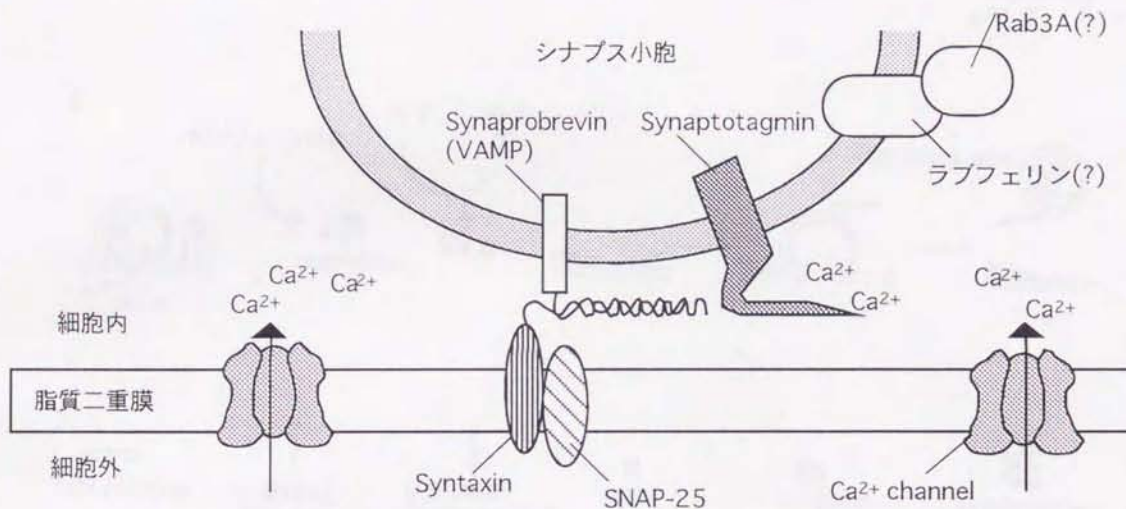


図 20 : Ca²⁺依存性の神経伝達物質放出機構

シナプス終末におけるドッキングしたシナプス小胞の拡大図。プライミング中、細胞膜にあるSyntaxin と SNAP-25 が、シナプス小胞側の Synaptobrevin / VAMP が、細胞膜との融合のために複合体を形成する。融合のトリガーであるCa²⁺センサーは、シナプス小胞側の Synaptotagminとされている。シナプス終末の電位変化によってCa²⁺チャネルが開きCa²⁺が流入する。流入したCa²⁺と Synaptotagmin とが反応し、融合がおこると考えられている。

(Matthews 2000 より改変)

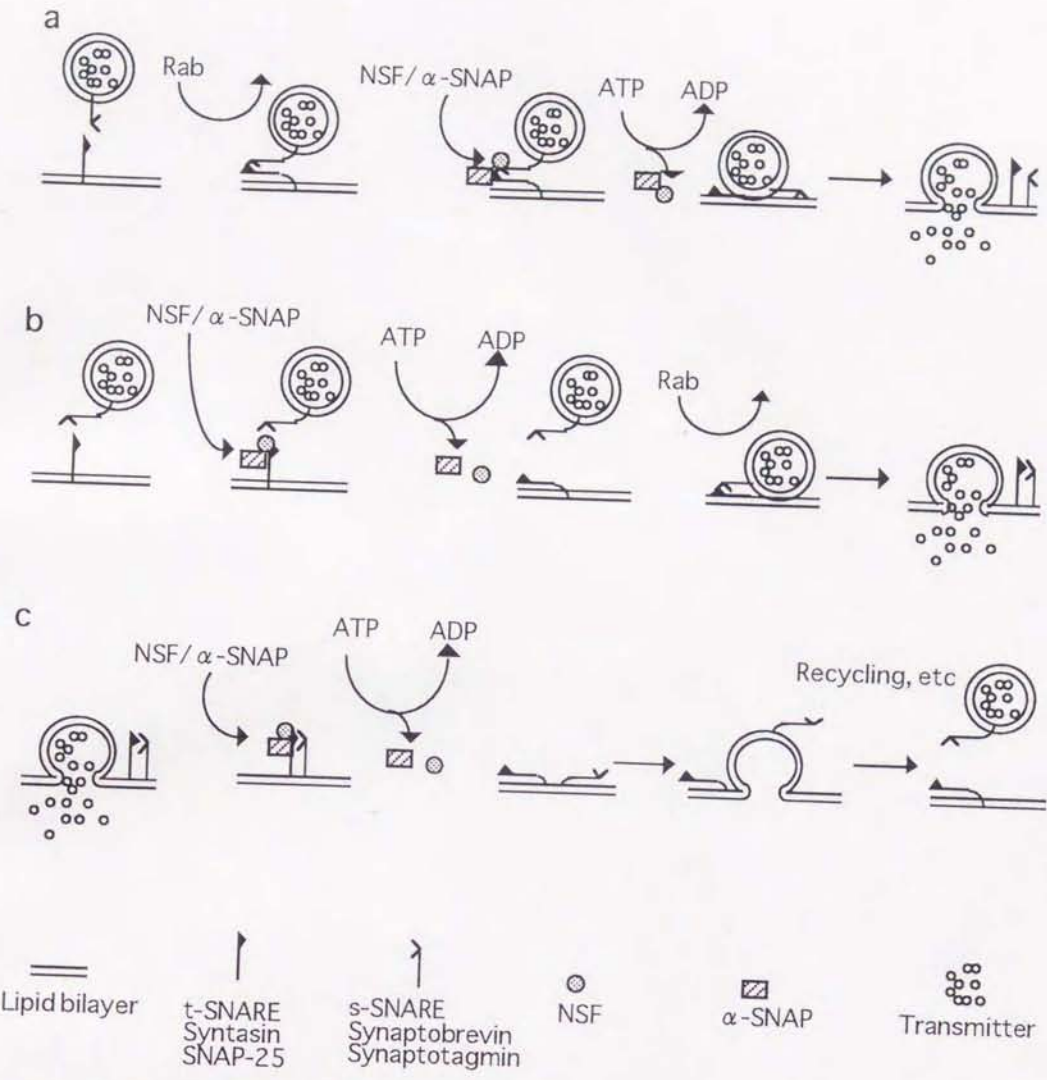


図 21：伝達物質放出過程における Rab, NSF, SNAP の作用点
 (a) SNARE 仮説では, SNARE 複合体に α -SNAP と NSF が結合する. NSF の弱い ATPase 活性により ATP が加水分解され, そのエネルギーによって SNARE 複合体が解離し, 膜融合がおこると考えられた. (b) 酵母の同型液胞同士の融合実験では, NSF と α -SNAP は SNARE 蛋白質を活性化し, SNARE 複合体を形成できる状態にすると考えられている. (c) NSF と α -SNAP は膜融合後に作用し, SNARE 複合体を解離させ, 次の膜融合に備えて SNARE 蛋白質を活性化する. (Bock と Scheller 1997 から改変)