

**【目的】** シナプス伝達には、通常の活動電位依存的な誘発性伝達とは別に、自発性伝達と呼ばれ、神経細胞の発火とは無関係に生じる応答も存在する。近年、自発性伝達が神経回路の形成や維持に重要な役割を果たしていることが分かっているが、その独自の分子機構にはいまだ不明な点が多い。本研究では、神経筋接合部において自発性伝達を選択的に欠損する完全麻痺ゼブラフィッシュをモデルとして、自発性伝達を特異的に制御する分子実体を同定することを目指す。そのために、ゼブラフィッシュの運動神経終末からの伝達物質放出を直接かつ簡便に計測する手法を確立することを第一に行う。さらに、完全麻痺を示す変異体ゼブラフィッシュを解析対象として、自発性シナプス伝達の欠損に関わる分子群の同定を目指す。そのために本研究課題では、酵素反応によるタンパク質標識技術を利用して、プレシナプスに局限した網羅的プロテオーム解析を目指し、必要となるトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュを作製する。

**【方法】** 1. 蛍光イメージングによるシナプス伝達の評価系の確立: 神経筋接合部の小胞動態を解析する実験系として、蛍光イメージングによって直接的にシナプス小胞の開口放出を可視化する系を確立する。そのために pH に感受性をもつ蛍光タンパク質 (pHluorin) とハロタグと呼ばれるタンパク質をシナプス小胞分子に融合することで、それぞれシナプス小胞内部に局在化するようにした Tg 動物を作製する。pHluorin は小胞動態のライブ観察を可能にし、ハロタグはスナップショットながら高感度の観察を可能にする (下図)。2. 神経筋接合部でプロテオミクスを行うための Tg フィッシュの作製: 最近、特定のタンパク質に組換えペルオキシダーゼ (APEX2 など) を融合して発現させ、酵素と基質の反応を利用して、そのタンパク質のごく近傍にある他のタンパク質を選択的に標識する技術が細胞内で実用化された。これにより、あるタンパク質と相互作用するタンパク質群や、特定のオルガネラに存在するタンパク質群に的を絞ってプロテオミクスが可能となっている。本研究では運動ニューロンのシナプス終末に局在する小胞型アセチルコリン輸送体 (VAcHT) などを標的に APEX2 との融合タンパク質を発現するような Tg フィッシュを作製する (下図)。

**【結果】** シナプス小胞の動態をイメージングする分子プローブとして、小胞型 GABA 輸送体 (VGAT) の C 末端に pHluorin とハロタグをタンデムに融合したタンパク質が有用であることを確認し、このタンパク質とレポーター蛍光タンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製に成功した。この Tg フィッシュの pHluorin の蛍光ライブイメージングを行うことで、ゼブラフィッシュ神経筋接合部でのエンドサイトーシスのキネティクスを初めて解析することに成功した。またハロリガンド化した蛍光色素によるシナプス小胞のラベリング実験を行うことで、自発的放出に動員されるシナプス小胞は脱分極刺激によって放出される全シナプス小胞の 10~15%に限られていることが明らかになった。

また、APEX2 を VAcHT の C 末端に融合したタンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製にも成功した。この Tg フィッシュにおいて、APEX2 の酵素活性を利用して近傍タンパク質のビオチン化を行い、蛍光標識したストレプトアビジンによって検出したところ、神経筋接合部が特異的にラベルされることが確認できた。

