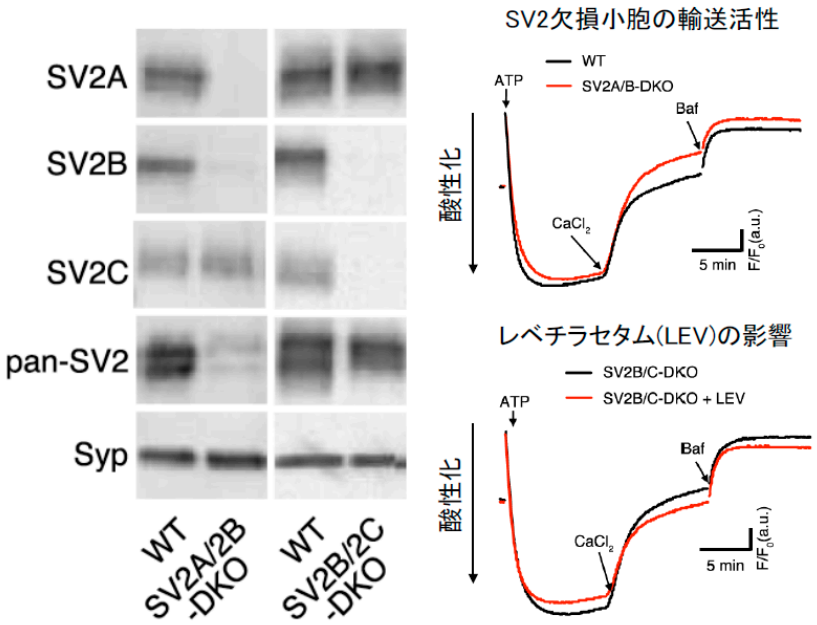
52　抗てんかん薬標的分子SV2Aの機能解明	高森　茂雄

【目的】てんかんは異常な神経活動のために意識障害や痙攣などのてんかん発作を繰り返す神経疾患で、発症率は全人口の 1%を占めると言われている。抗てんかん薬として近年脚光を浴びているレベチラセタム（別名イーケプラ）は、神経終末のシナプス小胞膜に存在する SV2A という輸送体様の膜タンパク質に結合し作用する。一方、SV2A は 1980 年代後半に同定されたにも関わらず、その分子機能と脳機能における役割は明らかになっていないことから、レベチラセタムの作用機序は不明な点が多いまま臨床現場で使用されている。本研究では、従来 SV2A の機能として提唱されてきた「Ca^{2+}輸送仮説」と「ガラクトース輸送体仮説」の双方を、SV2 遺伝子改変マウスを用いて検証し、抗てんかん薬標的分子である SV2A の分子機能解明を目的とした。

【方法】SV2 がシナプス小胞上の Ca^{2+}輸送体である可能性を検証するために、げっ歯類脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、小胞内酸性化測定による Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性の性状解析法と $^{45}Ca^{2+}$同位体を用いた輸送活性測定法を確立した。次に、CRISPR/Cas9 法を用いて SV2A とそのイソ型の遺伝子欠損マウスを作製し、それらの遺伝子改変マウス脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、SV2 欠損やレベチラセタムによる SV2A 阻害がシナプス小胞の Ca^{2+}輸送活性に与える影響を調べた。

【結果】ラット脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、Ca^{2+}がシナプス小胞の酸性化に与える影響を精査した所、高親和性（Km～400 nM）の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送体活性を認めた。次に、SV2A／SV2B–ダブル欠損マウスの脳（総 SV2 発現が微量なマウス）で同様の測定を行なった所、野生型脳と同程度の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性が検出された。また、SV2B／SV2C–ダブル欠損マウスの脳（脳内に SV2A のみ発現する脳）由来のシナプス小胞における Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性は、レベチラセタムで阻害されなかった。$^{45}Ca^{2+}$同位体を用いた輸送活性測定法においても、SV2 欠損と Ca^{2+}輸送活性の連関は認められず、今回行なった薬理学的な実験等の結果を総合的に判断すると、シナプス小胞膜上の Ca^{2+}輸送体は、主に形質膜型 Ca^{2+}-ATPase（PMCA）が寄与していることが示唆された。

SV2 欠損および SV2A 標的薬レベチラセタムのシナプス小胞膜 Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性への影響



52. 抗てんかん薬標的分子 SV2A の機能解明

高森　茂雄

同志社大学 大学院脳科学研究科 神経膜分子機能部門

Key words：シナプス小胞タンパク質，てんかん，SV2A，トランスポーター，レベチラセタム

緒　言

てんかんは脳細胞のネットワークに起きる異常な神経活動のために意識障害や痙攣などのてんかん発作を繰り返す神経疾患で、発症率は全人口の 1%を占めるといわれる。抗てんかん薬として近年脚光を浴びているレベチラセタム（別名イーケプラ）は、脳の一部から興奮が始まる「部分発作」と、脳全体で始まる「全般発作」の両方に有効な薬であり、欧米では 2000 年頃、本邦では 10 年遅れて 2010 年頃に実際に臨床現場でてんかん発作の患者に適用されている。一方で、レベチラセタムがシナプス小胞に存在する SV2A タンパク質に特異的に結合することが明らかにされたのは、欧米で臨床応用が開始された後の 2004 年のことであり［1］、10 年以上たった現在に至ってもレベチラセタムの作用機序の詳細は全くわかっていない。また、臨床薬全般に言えることであるが、レベチラセタムも例外ではなく、皮膚や各臓器の炎症や消化系の副作用のみならず、頭痛・めまい・傾眠・抑鬱・自殺念慮などの精神症状など、重篤な副作用を惹起することが知られている。レベチラセタムの SV2A への作用機序が解明されれば、より安全かつ有効な抗てんかん薬創成への新しい戦略を開拓できるだろう。

レベチラセタムの SV2A への作用機序がいまだに解明されていない理由は、一重に SV2A の分子機能とその脳機能における役割自体がそもそも明らかになっていないからである。SV2A は、1980 年代後半に「Synaptic Vesicle Protein 2」としてシビレエイの電気器官のシナプス小胞膜に局在するタンパク質として同定され、哺乳類では SV2A、SV2B、SV2C の 3 種類が同定されている［2］。アミノ酸配列からのタンパク質構造予測によると、SV2 ファミリーは 12 回膜貫通型の膜タンパク質であり、何らかの生体分子を輸送するトランスポーターであると推測されている。興味深いことに、SV2A、SV2B、SV2C の遺伝子欠損マウスのフェノタイプ解析から、SV2 の分子機能として小胞膜上の Ca^{2+}輸送体であることが提唱された［3, 4］。さらに、SV2B、SV2C 欠損マウスは寿命や繁殖能力において野生型マウスとなんら変りないが、SV2A 欠損マウスは生後まもなく重度のてんかん発作を発症し、2〜3 週齢で死に至ることが判明したことからも SV2A のてんかんとの関わりが強く示唆された。一方、2014 年になって、酵母を用いた実験結果から、ヒト SV2A が単糖であるガラクトースを輸送する可能性が提唱された［5］。しかしながら、SV2A のガラクトース輸送活性の神経細胞における役割や、その脳機能における生理学的な意義については、全く解明されていないのが現状である。

研究代表者は、これまで神経シグナル伝達に中心的な役割を果たすシナプス小胞の機能タンパク質の解析を精力的に行い、特に神経伝達物質輸送体やプロトンポンプ、イオンチャネルの同定と性状解析において顕著な成果を上げてきた［6〜8］。この 30 年余りの研究成果により、シナプス小胞を構成する多くの膜タンパク質の機能が明らかになってきたが、主要なシナプス小胞タンパク質である SV2 の分子機能は依然として不明である。一方で、上述のように SV2A が脳内シナプス伝達に重要な役割を果たしていることは疑いの余地がない。本研究では、機能未同定の抗てんかん薬標的分子 SV2 の分子機能を解明し、てんかん発症との関係や抗てんかん薬レベチラセタムの作用機序の解明に向けた研究を遂行し、より安全かつ効能の優れた抗てんかん薬創成の新たな戦略を提供することを目的とした。

本研究では、これまでに SV2 がシナプス小胞の Ca^{2+}輸送体である可能性を精査した結果、シナプス小胞膜上 Ca^{2+}輸送活性の大部分は SV2 ではなく、形質膜型 Ca^{2+}-ATPase（PMCA）が司っていることを明らかにした。また、PMCA の一つである PMCA1 が、シナプス終末においては、形質膜よりもむしろシナプス小胞に局在することも明らかにした。これらの研究成果は原著論文としてまとめ Scientific Reports 誌に発表した［9］。

方法および結果

1. シナプス小胞膜上の高親和性 Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体は中性条件で駆動する

従来の羊脳から得られたシナプス小胞膜画分を用いた生化学的実験から、シナプス小胞膜上には低親和性（Km＞200 μM）の Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体の存在が示唆されており、pH 8.5 のアルカリ条件で駆動するとされていた。同様の Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体が中性条件でも駆動するか否かを検証するために、Ca^{2+}キレート剤として BAPTA を用いて、ラット脳から得られたシナプス小胞膜画分を用いて酸性化アッセイにおける Ca^{2+}の効果を精査した。その結果、中性条件においても確かに Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体活性が確認され、しかも Ca^{2+}に対する親和性が Km～400 nM と非常に高いことが明らかになった（図 1）。

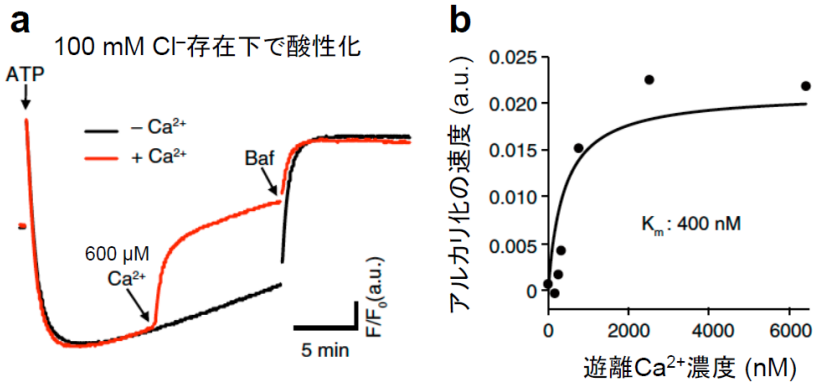


図 1. 高親和性 Ca^{2+}/H^{+}交換輸送活性によりシナプス小胞のアルカリ化が起こる

a) ラット脳から精製したシナプス小胞膜画分に 100 mM Cl^{-}存在化で ATP を加えてプロトンポンプを活性化させると、小胞内腔の酸性化に伴うアクリジンオレンジの蛍光減弱が見られる。そこに 600 μM の $CaCl_2$を添加すると脱酸性化（アルカリ化）が見られる。この結果は、シナプス小胞膜上の Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体の存在を示唆している。Baf はプロトンポンプの阻害剤である Bafilomycin A_1で、添加により小胞の酸性化を消失させる。

b) シナプス小胞膜 Ca^{2+}/H^{+}交換輸送体の Ca^{2+}感受性を調べたところ、Km 値は約 400 nM であった。

2. SV2 はシナプス小胞上の Ca^{2+}/H^{+}交換輸送活性を持たない

緒言で記したように、SV2 遺伝子欠損マウスのフェノタイプ解析の結果から、SV2 がシナプス小胞膜上の高親和性 Ca^{2+}輸送体であるとする仮説が長らく受け入れられてきたが、確固たる実証はなされていない。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いて高効率に 2 遺伝子欠損マウスを作製する方法を利用して、SV2A／2B ダブル欠損マウスと SV2B／2C ダブル欠損マウスを作製し、それぞれからシナプス小胞膜画分を得た。SV2 イソ型特異的抗体と全ての SV2 イソ型を認識する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なった結果、脳内の主要な SV2 は SV2A であり、特に SV2C は微量にしか発現していないことがわかった（図 2a）。そこで第一に SV2A／SV2B ダブル欠損マウス由来のシナプス小胞膜画分で Ca^{2+}/H^{+}交換輸送活性を調べた所、野生型で見られる活性と同程度の活性が見られた（図 2b）。また、SV2B／SV2C ダブル欠損マウス由来のシナプス小胞膜画分（SV2A のみ発現している小胞）における Ca^{2+}/H^{+}交換輸送活性が SV2A の阻害剤であるレベチラセタムで減弱するか否かを調べた所、全く効果がないことが判明した（図 2c）。これらの結果から、SV2 はシナプス小胞膜画分で見られる Ca^{2+}/H^{+}交換輸送活性に殆ど寄与していないことが示唆された。

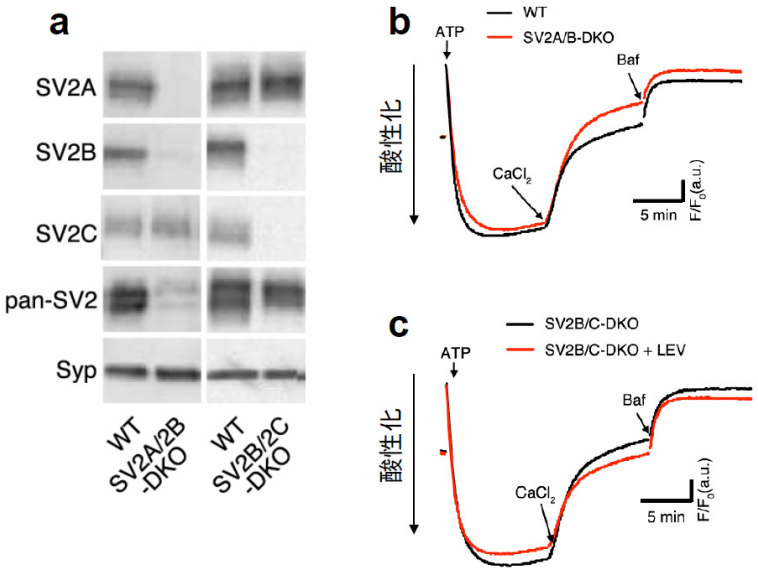


図 2. SV2 欠損マウス由来のシナプス小胞膜における Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性

a) SV2A／SV2B ダブル欠損マウス（DKO）と SV2B／2C–DKO マウスのウェスタンブロット結果。全ての SV2 イソ型を認識する抗体（pan-SV2）バンドを野生型（WT）と比較すると、SV2A が脳内の主要な SV2 であり、SV2C の発現はごく僅かであることがわかる。

b) SV2A／SV2B–DKO マウス由来のシナプス小胞には野生型と同等の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性が認められた。

c) レベチラセタムの標的分子である SV2A が残存する SV2B／SV2C–DKO マウス由来のシナプス小胞画分で見られる Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性は、レベチラセタムで阻害されない。

3. 形質膜型 Ca^{2+}-ATPase がシナプス小胞上の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性を司る

過去のシナプス小胞膜上の ATPase の性状解析では、プロトンポンプである V-type ATPase 以外に、P-type ATPase の存在が明らかになっていた。そこで、P-type ATPase の阻害剤を用いて、シナプス小胞膜の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性に与える影響を調べたところ、筋小胞体 Ca^{2+}-ATPase（SERCA）の阻害剤である cyclopiazonic acid（CPA）では阻害されないが、形質膜型 Ca^{2+}-ATPase（PMCA）の阻害剤である vanadate では強力に阻害されることがわかった。また、放射性同位体 $^{45}Ca^{2+}$の輸送活性においても、PMCA の阻害剤である vanadate と eosin が強力な阻害効果を有することが判明した。一方、SV2-DKO マウス由来のシナプス小胞における $^{45}Ca^{2+}$輸送活性は野生型と有意な差が見られなかった。したがって、我々が性状解析したシナプス小胞における高親和性の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送体活性は PMCA によって行われていることが強く示唆された。

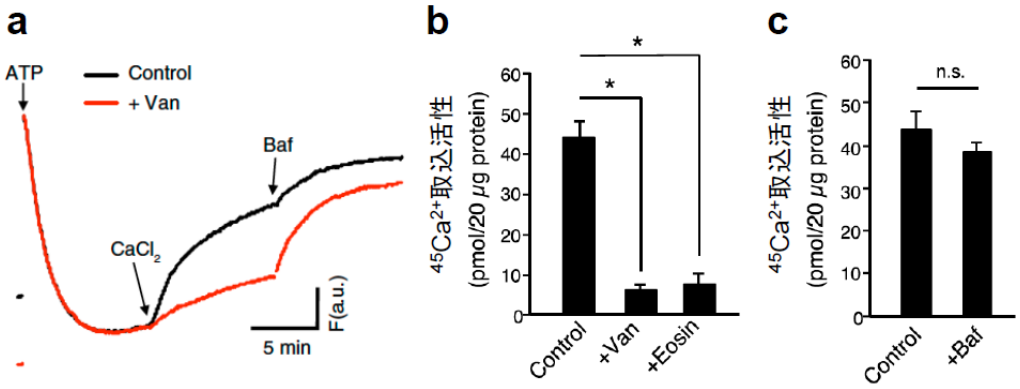


図 3. シナプス小胞膜における Ca^{2+}／H^{+}交換輸送活性は PMCA 阻害薬で減弱する

a) Ca^{2+}添加による小胞脱酸性化は 500 μM vanadate（Van）によって阻害される。

b) シナプス小胞への$^{45}Ca^{2+}$の取込活性は、500 μM vanadate（Van）、10 μM eosin によって強力に阻害される。エラーバーは標準誤差。* $p < 0.0025$、unpaired Student's t-test。

c) シナプス小胞への$^{45}Ca^{2+}$の取込活性は、V-type ATPase 阻害薬である Bafilomycin A_1（Baf、500 nM）によって阻害されない。エラーバーは標準誤差。n.s.は $p > 0.1$、unpaired Student's t-test。

4. PMCA1 はシナプス終末でシナプス小胞膜に多く存在する

PMCA はその名の通り形質膜に存在する Ca^{2+}-ATPase である。PMCA がシナプス終末でシナプス小胞膜上に存在するか否かを検証するために、PMCA のサブタイプの一つである PMCA1 の細胞外部分に pH 感受性緑色蛍光タンパク質（pHluorin）の遺伝子を組み込んだベクター（PMCA1-SEP）を作製し、マウス海馬由来の神経初代培養に遺伝子導入した。対照として、シナプス小胞膜タンパク質の代表格である Synaptophysin の小胞内腔部分に pHluorin を融合したもの（SypHy）とシナプス終末形質膜上に存在する Syntaxin 1A の細胞外部分に pHluorin を融合したもの（Syntaxin1a-SEP）を用いた（図 4a）。培養 12～14 日目にそれぞれの蛍光強度を元に細胞膜表面と細胞内酸性オルガネラにどの程度分配されているかを調べた所、興味深いことに PMCA1-SEP は SypHy と同様に 80%近くが細胞内酸性オルガネラに存在することがわかった（図 4b）。また、電気刺激を与えてシナプス小胞のエキソサイトーシスを惹起すると、PMCA1-SEP は SypHy と同様に刺激依存的なエキソサイトーシスと同調する形でリサイクリングすることが明らかになった（図 4c）。PMCA1-SEP の刺激に対する反応は、エキソサイトーシスの阻害剤であるテタヌス毒素処理で消失することから、PMCA1-SEP は機能的なシナプス小胞膜上に存在することがわかった。

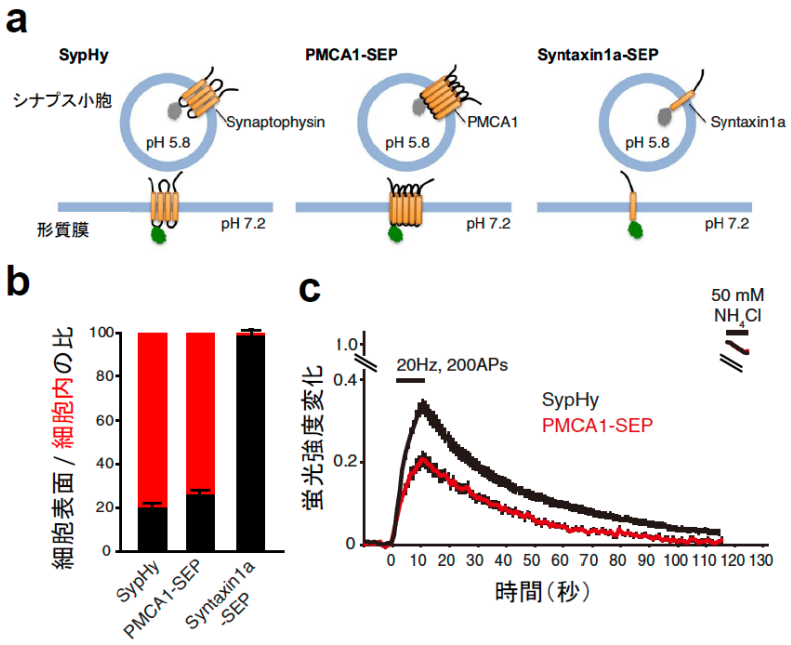


図 4. PMCA1-pHluorin はシナプス小胞と共にリサイクリングする

a) 用いた pHluorin 融合タンパク質の模式図。pHluorin（SEP）は酸性化で暗く中性条件下で強い蛍光を発する。SypHy はシナプス小胞に存在するタンパク質、Syntaxin1a-SEP は形質膜に存在するタンパク質として対照実験に用いた。

b) PMCA1-pHluorin（PMCA1-SEP）は 70%以上が酸性の内膜に存在する。

c) PMCA1-SEP の活動依存的な振る舞い。刺激依存的な PMCA1-SEP のリサイクリングが見える。

考　察

本研究では、シナプス小胞膜上に存在する高親和性の Ca^{2+}／H^{+}交換輸送体の生化学的な性状解析からスタートし、その交換体活性が SV2 の機能である可能性を精査した。遺伝子欠損マウスのフェノタイプ解析から、長きに亘って SV2 の輸送基質が Ca^{2+}である可能性が示唆されてきたが、今回の我々の実験結果はその可能性を支持しないだけでなく、形質膜上に存在するとされてきた PMCA こそがその分子実体であることを示している。それでは、SV2 は如何なる分子機能を有しているのであろうか？最近になって、細胞表面に存在する SV2A は単糖であるガラクトースとプロトンを共役輸送している可能性が報告された［5］。我々は、SV2A がガラクトース輸送能を持っている結果として、脳内の糖含有分子群の発現が制御される可能性を考えて研究を継続している。現在の所、SV2A／SV2B ダブルノックアウトマウス脳において、ガラクトシルセラミド（GalCer）の発現量が有意に低下するという実験結果を得ている。今後は、SV2 のガラクトース輸送活性の生化学的な検証を行うと共に、その結果神経細胞あるいは周囲のグリア細胞に如何なる変化を及ぼし、てんかん発症と関連するのかを明らかにするのが課題となるだろう。

共同研究者・謝辞

本研究に用いた SV2 遺伝子欠損マウスは、全て共同研究者である理化学研究所生命機能科学研究センター高速ゲノム変異マウス作製支援ユニットの隅山健太氏によって作製された。ここの感謝の意を表したい。

文 献

1) Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 29;101(26):9861-6. Epub 2004 Jun 21. PMID: 15210974

2) Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sánchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux O, Leprince P, Franzen R, Rogister B. Puzzling Out Synaptic Vesicle 2 Family Members Functions. Front Mol Neurosci. 2017 May 22;10:148. doi: 10.3389/fnmol.2017.00148. eCollection 2017. PMID: 28588450

3) Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. SV2A and SV2B function as redundant Ca 2 + regulators in neurotransmitter release. Neuron. 1999 Dec;24(4):1003-16. PMID: 10624962

4) Wan QF, Zhou ZY, Thakur P, Vila A, Sherry DM, Janz R, Heidelberger R. SV2 acts via presynaptic calcium to regulate neurotransmitter release. Neuron. 2010 Jun 24;66(6):884-95. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.010. PMID: 20620874

5) Madeo M, Kovács AD, Pearce DA. The human synaptic vesicle protein, SV2A, functions as a galactose transporter in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2014 Nov 28;289(48):33066-71. doi: 10.1074/jbc.C114.584516. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25326386

6) Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):189-94. PMID: 11001057

7) Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell. 2006 Nov 17;127(4):831-46. PMID: 17110340

8) Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. Nat Neurosci. 2009 Feb;12(2):156-62. doi: 10.1038/nn.2248. Epub 2009 Jan 25. PMID: 19169251

9) Ono Y, Mori Y, Egashira Y, Sumiyama K, Takamori S. Expression of plasma membrane calcium ATPases confers Ca^{2+}/H^{+} exchange in rodent synaptic vesicles. Sci Rep. 2019 Mar 12;9(1):4289. doi: 10.1038/s41598-019-40557-y. PMID: 30862855