

機関番号：32621

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500342

研究課題名（和文） 開口分泌の素過程、特に顆粒供給の時空的制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the spatiotemporal regulation of vesicle recruitment for exocytosis

研究代表者

熊倉 鴻之助（KUMAKURA KONOSUKE）

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：70129790

研究成果の概要（和文）：副腎髄質クロマフィン細胞からの開口分泌では、顆粒貯蔵プールから放出可能プールへの顆粒供給が顆粒の物理的な細胞内移動と形質膜直下の顆粒の立体的分布が密接に関わり、その過程にはミオシンVが特徴的に働く可能性を明らかにした。細胞内の3次元空間での顆粒運動の直線性と運動性ならびに運動速度を解析して、モーター分子としてのミオシンVの役割、レールとしてのアクチン繊維の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Present studies in chromaffin cells revealed that vesicle recruitment for exocytosis from the reserve pool to the releasable pool is a process with the intracellular translocation of the vesicles which affect the spatial localization of vesicles. Roles of Myosin V as a motor protein, and of actin filaments as rails for this recruitment were also shown.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：分科：神経科学、細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：開口分泌、顆粒供給、細胞骨格系蛋白質、空間的顆粒分布、クロマフィン細胞

## 1. 研究開始当初の背景

（1）神経終末及び分泌細胞における開口分泌に際しては、開口部位にあらかじめ繋がれた分泌顆粒と形質膜との融合が起こるが、これにはシナプスに局在するSNARE蛋白等の結合・解離が必要と考えられている。

（2）持続した一定の分泌が維持されるためには、貯蔵プールから分泌顆粒を開口部位の放出可能プールに供給し、顆粒と形質膜の結合を活性化するプライミング機構が必須と考えられている。開口分泌の分子機構全体の理解には、これらの素過程の時間的空間的制

御機構を明らかにすることが重要であるが、顆粒供給の実態と時空的制御機構については解明が遅れていた。

（3）我々は開口分泌素過程の時空的制御機構の解明を目指して、まず平成元年度から4年度までに、膜の透過性を高めた副腎髄質クロマフィン細胞実験系を確立し、これらの素過程の解析を進めた。平成12年度～14年度の科学研究費基盤研究（B）では、微小炭素繊維電極－アンペロメトリー法による、単一細胞からの開口頻度およびキネティックスの解析、ならびに蛍光標識顆粒の実時間測定

による顆粒動態の測定解析を進めた。平成15年度～18年度までの基盤研究(A)によって、それらの解析を発展させるとともに、走査型電子顕微鏡による細胞内微細形態の解析を進め、さらに、共焦点レーザー蛍光顕微鏡(Zeiss LSM 5-Live)による顆粒運動の4次元解析に着手した。また、この基盤研究(A)では細胞内微小環境の操作手段として、遺伝子導入によって目的とする機能分子の発現を操作したPC12細胞を実験系として可能にした。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究では以下の点を目的とした。

(1) 細胞骨格系蛋白質ならびにPKCによる顆粒供給の制御機構と、SNARE複合体を補完する蛋白質分子の役割について、細胞内微細構造と立体空間における分泌顆粒の運動を主な実験指標として解析を行い、そこに関わる機能分子群と素過程の関係を明確にして、開口分泌の立体的な分子機構とその時間的空間的制御機構の理解を目指す。

(2) これまでは機能上の概念であった顆粒の貯蔵プールと放出可能な状態にある顆粒のプールを実体として理解するとともに、顆粒供給過程を、実体のある分子過程として理解する。さらに、クランプ機構の実証とSNARE複合体補完分子の役割を時間的空間的制御機構と関連づけて説明して、開口分泌機構研究に新しい局面を切り開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 分泌顆粒の細胞内動態と微細構造の測定解析

細胞内顆粒運動を実画像測定する第一の方法として、クロマフィン細胞ならびにPC12細胞にLyso Tracker Green DND-26を取り込ませて、蛍光標識された顆粒の運動を倒立蛍光顕微鏡下で測定して、顆粒の運動速度と移動軌跡を解析する。この方法で測定される顆粒運動は、対物レンズ表面から90～900 nmの細胞内空間における動態である。この空間に分布する分泌顆粒には低速、中速、高速の運動をする3つのポピュレーションが、約10%、30%、60%の割合で分布すること、このポピュレーションの変化が顆粒供給過程を反映することを既に示唆しているため、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による顆粒運動の4次元測定解析を併用する。さらに、走査型電子顕微鏡(イタリアにおける共同研究)により細胞内空間における分泌顆粒の立体的分布の特性を明確にするるとともに、細胞内微細構造との関連を明らかにする。

(2) 微小炭素繊維電極-アンペロメトリー

法による開口イベントの測定解析

直径5 μmの微小炭素繊維を作用電極として細胞表面に近接させ、+650 mVの電位を印加し、電極表面でのカテコールアミン分子の電気化学的酸化電流を4 kHzで記録することによって、単一細胞からの単一顆粒の開口分泌をシングル・イベントとして測定する。この手法では、顆粒供給過程の変化は、異なる刺激に対するイベント応答の頻度(開口頻度)変化、あるいは開口頻度の時間軸上の推移に反映される。また、開口分泌は、放出可能プール由来のイベントと、貯蔵プールからの顆粒供給に支えられたイベントに区別することが出来るので、これらの測定解析と細胞内顆粒動態の解析結果との整合性を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 顆粒供給における細胞骨格系蛋白質の役割

① ミオシンATPアーゼの阻害は、開口イベント上で明確に顆粒供給の低下をもたらした(図1)。走査型電子顕微鏡(イタリアにおける共同研究)によってこの顆粒供給の低下は、形質膜直下に局在する顆粒の立体的分布に影響を及ぼし、明らかな顆粒数の減少を伴うことが明確になった(図2)。

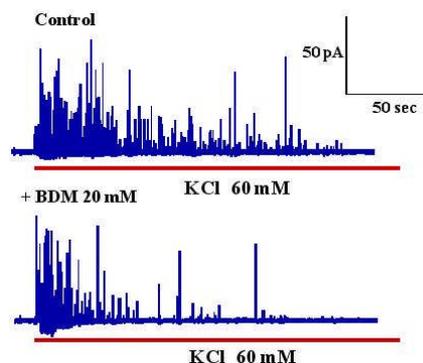


図1. ミオシンATPアーゼの阻害は、開口イベント上で明確に顆粒供給の低下をもたらした(図1)



図2-1. コントロール細胞(青い矢印は正常な顆粒供給を示す)

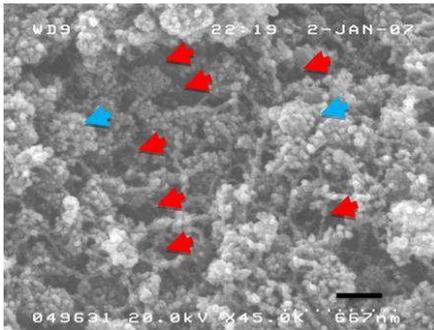


図2-2. ミオシンATPアーゼの阻害によって顆粒供給が阻害されている(赤い矢印)

また、ミオシンIIとミオシンVでは、顆粒供給と開口頻度の持続性、および顆粒の動態への関与が異なる。このことは、いわゆる貯蔵プールから放出可能な顆粒のプールへの顆粒供給が物理的な顆粒の細胞内移動に由来し、モーター分子としてその過程にはミオシンVが特徴的に働くことを示唆している。

② 開口頻度の持続性、ならびに顆粒運動と顆粒の分布は、形質膜直下に局在する顆粒の立体的分布と密接に関わる。一個の細胞を直径100%の球体ととらえて、細胞全体を外層(形質膜側)30%、中間層30%、および中心層40%の3層に分け、それぞれの範囲にある顆粒数が開口分泌の前後でどのように変化するかを解析した。MB処理細胞では、刺激後に約5%の顆粒数の減少が見られた。総顆粒数の解析から、この変化は総顆粒数自体の変化ではなく、顆粒の動きの変化を反映している。

③ 高速スキャン共焦点レーザー顕微鏡システムによるイメージング解析により、細胞内の3次元空間での顆粒動態を記録し、顆粒運動の直線性と運動性ならびに運動速度を解析して、モーター分子としてのミオシンVの役割、レールとしてのアクチン繊維の役割を明らかにした。ミオシンATPアーゼの阻害、アクチン繊維の脱重合とともに、脱分極刺激前後の顆粒の運動速度を減少させた(図3)。

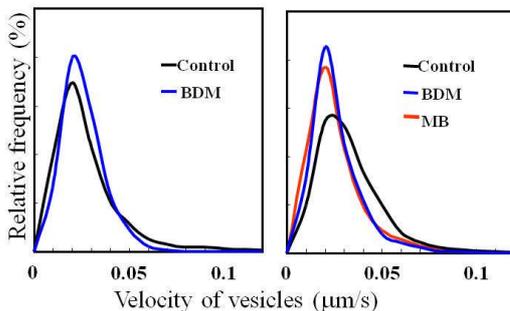
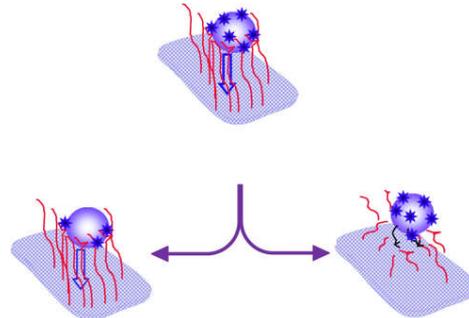


図3. ミオシンATPアーゼの阻害は、脱分極刺激前後の顆粒の運動速度を減少させた。

顆粒運動の直線性および運動性は、ミオシンATPアーゼの阻害からは有意な影響を受けなかったが、アクチン繊維の脱重合によって明らかに低下した。以上の結果は、顆粒の放出可能プールへの供給機構におけるモーター分子としてのミオシンVの役割、レールとしてのアクチン繊維の役割を示唆する(図4)。



ミオシンATPアーゼの阻害 アクチン繊維の脱重合

図4. 顆粒供給機構におけるモーター分子としてのミオシンVの役割、レールとしてのアクチン繊維の役割

## (2) PKCによる顆粒供給の制御機構

TPA処理によって顆粒供給を高めると、3層間の顆粒の移動が高まり、形質膜直下の外層で刺激前では約12%、刺激中では約6%の顆粒数の増加が見られた。我々はこれまでに、Metamorphシステムによる解析から、形質膜直下の空間に分布する顆粒数が、TPAで顆粒供給を高めると、約15%増加することを明らかにしており、この点は良く一致する。このときリン酸を受ける機能蛋白質が何か未だ特定できないが、顆粒のモータータンパク、またはレールの構造に対するリン酸化の影響も一つの可能性である。

## (3) SNARE蛋白質を補完する蛋白質の役割

① SNARE蛋白質など機能分子のノックアウト、またはノックインマウス由来の副腎髄質細胞を実験系として解析が可能となったので、これらのノックアウト、またはノックインマウス由来の分散細胞を用いて解析を進めた結果、CAMK II とシンタキシンの結合障害が開口確率を低下させることが示唆された。

② CAMK II 結合能を欠損する R151G Syntaxin 1A ノック・インマウス由来のクロマフィン細胞について、アンペロメトリー法による開口イベントの測定解析を進めた結果、CAMK II とシンタキシンの結合障害がAChによる開口確率を低下させること、およびその低下は「放出可能プール」の大きさの減少に由来する可能性が示唆された。さらに、個々の開口イベントのキネティクス解析から、この障害は開口確率を低下させるほ

かに、膜融合プロセスのキネティクスにも影響を及ぼすと示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Nobuyuki Sasakawa, Mica Ohara-Imaizumi, Mitsunori Fuuda, Hiroyuki Kabayama, Katsuhiko Mikoshiba, Konosuke Kumakura Dissociation of inositol polyphosphates from the C2B domain of synaptotagmin facilitates spontaneous release of catecholamines in adrenal chromaffin cells. A suggestive evidence of a fusion clamp by synaptotagmin. *Neuropharmacology*, 査読有, 60; 1364-1370, 2011

② Elsie C. Jimenez, Nobuyuki Sasakawa, Konosuke Kumakura Effects of Sodium Channel-Targeted Conotoxins on Catecholamine Release in Adrenal Chromaffin Cells. *Phillipine Journal of Science*, 査読有, 137;127-132, 2008

[学会発表] (計9件)

① 姜 裕貴. マウスクロマフィン細胞からの開口分泌におけるシタキシン IA-CaMKII 相互作用の役割. 第58回 日本薬理学会年会 2010年3月16-18日大阪.

② 林 光紀. ウシ副腎髄質クロマフィン細胞における分泌顆粒の細胞内局在、及び動態の4次元解析. 第58回 日本薬理学会年会 2010年3月16-18日大阪.

③ Konosuke Kumakura. Vesicle Mobility and Transmitter Release (Invited lecture). From Neurotransmitters to Neuroepigenomics. 2009年10月21日 Chicago, USA.

④ 林 光紀. 4 dimensional characteristics of the movement and location of the secretory granules in bovine adrenal chromaffin cells. 第52回 日本神経化学会大会 2009年6月21日-24日 浜川市伊香保

⑤ 田村和季. 牛副腎クロマフィン細胞のドーパミン受容体を介した生理的制御作用. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月16日-18日横浜.

⑥ Konosuke Kumakura. (Invited Lecture) Involvement of myosin in the vesicle recruitment for exocytosis: Studies with amperometry and HRSEM. Gordon Research Conferences. Salivary Glands & Exocrine Secretion. Feb. 8-13, 2009 Galveston, TX, USA

⑦ Konosuke Kumakura. Possible involvement of myosin-ATPase in the vesicle

recruitment for exocytosis in adrenal chromaffin cells: Studies with scanning electron microscopy. 第51回日本神経化学会大会 2008年9月11日-13日 富山.

⑧ Nobuyuki Sasakawa. Characterization of exocytotic events and the dynamics of secretory vesicles in single mouse chromaffin cells. 第51回日本神経化学会大会 2008年9月11日-13日 富山. 第51回日本神経化学会大会 2008年9月11日-13日 富山.

⑨ 林 光紀. ウシ副腎髄質クロマフィン細胞における分泌顆粒動態の4次元解析. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月10日 東京

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

熊倉 鴻之助 (KUMAKURA KOUNOSUKE)  
上智大学・理工学部・教授  
研究者番号: 70129790

##### (2) 研究分担者

笹川 展幸 (SASAKAWA NOBUYUKI)  
上智大学・理工学部・教授  
研究者番号: 20187107

(H20: 研究分担者 H21、H22: 連携研究者)

##### (4) 研究協力者

Alessandro Riva  
University of Cagliari School of medicine,  
Professor

林 光紀 (HAYASHI MITUNORI)  
上智大学理工学部・特別研究員

田村 和季  
上智大学・大学院理工学研究科・院生

姜 裕貴  
上智大学・大学院理工学研究科・院生