

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463066

研究課題名(和文) 未知のタンパク質TMEM135がシナプス小胞の機能制御に果たす役割の検討

研究課題名(英文) The study of TMEM135 function in synaptic vesicles

研究代表者

樋口 仁 (Higuchi, Hitoshi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30423320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：世界規模の遺伝子解析により、ヒト、マウスなどの遺伝子の塩基配列が決定された。その結果、未だに機能が明らかとされていない遺伝子およびタンパク質が存在しているが明らかとなっている。本研究は未だにその機能が明らかとなっていないTmem135遺伝子が神経細胞間の神経伝達に大きな役割を担っているシナプス小胞における機能を検討した。その結果TMEM135タンパク質は海馬神経細胞に存在していることが明らかとなった。またシナプス小胞におけるグルタミン酸の取り込み能に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The gene decoding projects in the world identified all genome sequence of human, mouse et al., and they indicated that there were still a lot of unknown genes and proteins. In this study, I evaluated the function of Tmem135(transmembrane135) that was one of unknown gene, in synaptic vesicles. In results, TMEM135 was expressed in hippocampus neurons, and it was suggested the possibility that TMEM135 was contributed to the glutamate uptake of the synaptic vesicles.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：Transmembrane135 中枢細胞 シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

日本を含め、数多くの国々が今後超高齢化社会を迎えようとしている。老化はそれに伴い様々な疾患および生体の機能低下を引き起こす。中でもアルツハイマーなどに代表されるような神経系疾患、加齢に伴う神経の機能障害は、自律した生活を送ることを困難にさせるが、このような神経疾患および老化に伴う神経の機能障害に対する治療は未だになく、その治療法の開発は早急に取り組まなくてはならない課題である。

この老化に伴う神経の機能障害を理解するためには、まずそのメカニズムを知る必要がある。しかしながら老化のメカニズムは未知の部分が多く、未だ明らかにされていない多くの遺伝子が老化に伴う機能障害に関わっていることも予測される。

世界的なゲノムプロジェクトの進展により、ヒト、マウスなど様々な生物種でゲノム塩基配列が決定された。その結果、未だに膨大な数の機能未知の遺伝子およびタンパク質が存在していることが明らかとされている。申請者は留学先であった米国ウイソコンシン州立大学マディソン校, Department of Medical Genetics にて様々な遺伝子変異マウスを用いて、これら機能未知の遺伝子の機能解析および疾患への関わりについての研究を行った。これら遺伝子変異マウスのなかで特に興味深いマウスに

Transmembrane135(Tmem135)の変異マウスがあげられる。本遺伝子の転写物である TMEM135 は膜タンパクの1つとされているが、その機能は明らかとされていない。しかし、本遺伝子変異マウスは視覚や聴覚に神経変性を伴う加齢変化が野生型のマウスより早期に認められ、また線虫の研究においては本遺伝子をノックアウトすることにより寿命が短くなると報告がされているなど、本遺伝子が加齢に関わる重要な遺伝子の1つであると考えられている。

申請者の研究協力者である米国ウイソコンシン州立大学マディソン校の Dr.Ikeda の研究グループは、この TMEM135 が網膜の photoreceptor cell の神経終末に存在していることを、免疫組織染色を用いて明らかにしている。更に Teme135 が同じ photoreceptor cell の神経終末に存在している小胞グルタミン酸トランスポーター1(VGLUT1)などシナプス小胞に存在するタンパク質と共存している可能性を示唆するデータが得られている。

2. 研究の目的

これまでの予備研究から TMEM135 が神経、特にシナプス小胞において何らかの機能を持ち、老化のプロセスに関与している可能性が考えられる。そこで本研究課題は TMEM135 のシナプス小胞における機能を明らかにし、本遺伝子と老化に伴う神経変性との関わりを調べることが目的であり、以下の2点を明らかにすることを具体的な目的とした。

(1)培養神経細胞における TMEM135 タンパク質局在の免疫組織学的検討

特異的な抗体を用いた免疫組織染色の手法を用い、海馬神経細胞に TMEM135 が存在しているかを明らかにする。また TMEM135 と VGLUT1 および小胞 GABA トランスポーター (VGAT) との二重染色により、TMEM135 とこれらシナプス小胞タンパク質との共存を検討して TMEM135 がシナプス小胞に存在するかを検討する。

(2) Tmem135 変異マウスシナプス小胞におけるグルタミン酸取り込み能の検討

Tmem135 変異マウスと野生型マウスの脳よりシナプス小胞を単離し、各シナプス小胞におけるグルタミン酸の取り込み能を比較する。これにより TMEM135 がシナプス小胞において神経伝達物質の取り込みを調整しているタンパク質であるか否かを検証し、その機能を探る。

3. 研究の方法

(1)培養神経細胞における TMEM135 タンパク質局在の免疫組織学的検討

市販の Primary Mouse Hippocampus Neuron(Gibco)を購入し、Lab-Tek® Chamber Slides(Thermo Fisher Scientific)内で付属の商品マニュアルに従い海馬神経細胞を培養した。培養13日後、パラホルムアルデヒドにて細胞の固定を行い、一次抗体を以下の組み合わせで、4℃下で一晩作用させた。

一次抗体の組み合わせ

1	Anti-TMEM135(Rabbit, Sigma-Aldorich), Anti-Microtubule-associated protein 2 (MAP2)(Mouse, Abcam)
2	Anti-MAP2 (Rabbit, Abcam) Anti-VGLUT1(Mouse, Synaptic Systems)
3	Anti-TMEM135(Rabbit) Anti-VGLUT1(Mouse)

翌日、二次抗体として Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa Antibodies Fluor 488(Life Technologies)および Donkey Anti-Mouse IgG Antibodies Fluor 568(Life Technologies)を作用させ、さらに核酸を染色するため NucBlue®(Life Technologies)を作用させた。ProLong® Gold(Life Technologies)を封入剤に用い、カバーガラスにて覆いスライドを作製した。作製したスライドは岡山大学共同実験施設に設置している共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM780) にて観察を行った。

(2) Tmem135 変異マウスシナプス小胞におけるグルタミン酸取り込み能の検討

7~10ヶ月令の Tmem135 変異マウスおよび野生型マウスをイソフルランにて麻酔後断頭を行い、脳を摘出した。過去の文献に準じて脳をホモジナイズした後、遠心分離によりシナプス小胞を単離した。³Hにてラベルしたグルタミン酸 (glutamic acid, L-[3,4-³H], PerkinElmer) 含有 RIPA buffer に単離したシナプス小胞を添加し、37°Cで2分、5分、8分、10分でそれぞれインキュベートした後、ガラスフィルター(Whatman® Glass microfiber filters, Grade GF/C, GE Healthcare)にて吸引濾過を行った。その後ガラスフィルターをアッセイチューブに入れ、クリアゾルII (ナカライテクノ)を加えた後、シンチレーションカウンター (AccuFLEX LSC7200 日立アロカメディカル) にて、シナプス小胞に取り込まれたグルタミン酸の量を測定し、Tmem135 変異マウスと野生型マウスのシナプス小胞におけるグルタミン酸の取り込み能を比較した。

4. 研究成果

(1) 培養神経細胞における TMEM135 タンパク質局在の免疫組織学的検討

TMEM135 が培養海馬神経細胞に発現していることが免疫組織染色により確認された。またその発現は神経細胞マーカーである MAP2 と極めて類似していた。(図 1)

しかしながら当初の仮説とは異なり、TMEM135 と VGLUT1 および VGAT との共在は海馬神経細胞においては観察されなかった。(図 2~4)

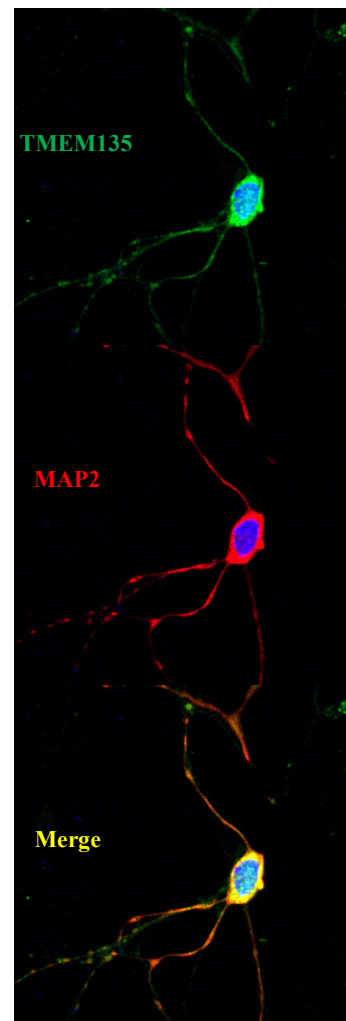


図 1 海馬神経細胞における TMEM135 の発現
海馬神経細胞に TMEM135 の発現が観られる。またその発現は、MAP2 と類似していた。TMEM135: 緑、MAP2: 赤

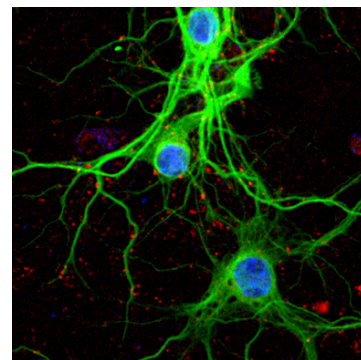


図 2 海馬神経細胞における VGLUT1 の発現
海馬神経細胞の周囲に VGLUT1 の発現が観られる。MAP2: 緑、VGLUT1: 赤

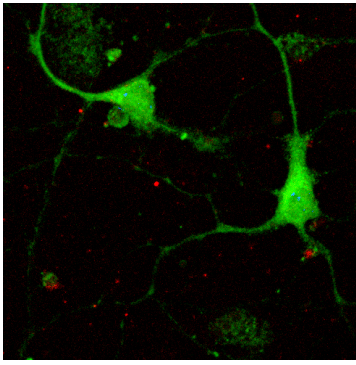


図3 海馬神経細胞における TMEM135 と VGLUT1 の共在の検討
TMEM135 と VGLUT1 の明らかな共在は観られない。TMEM135:緑、VGLUT1:赤

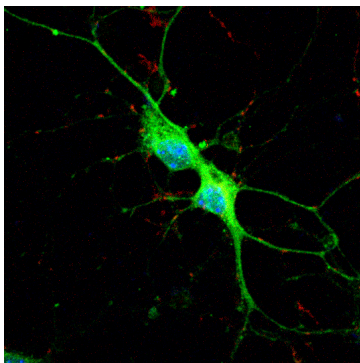


図4 海馬神経細胞における TMEM135 と VGAT の共在の検討
TMEM135 と VGAT の明らかな共在は観られない。TMEM135:緑、VGAT:赤

(2) Tmem135 変異マウスシナプス小胞におけるグルタミン酸取り込み能の検討

Tmem135 変異マウスと野生型マウスから単離したシナプス小胞と H^{3+} にてラベルしたグルタミン酸を 10 分反応させ、シナプス小胞のグルタミン酸の取り込み能を比較したところ、Tmem135 変異マウスではグルタミン酸の取り込み能の低下が観られた (Tmem135 変異マウス: 36.5 ± 4.0 pmol / mg protein / 10min, 野生型マウス: 39.9 ± 7.9 pmol / mg protein / 10min) (図5)。

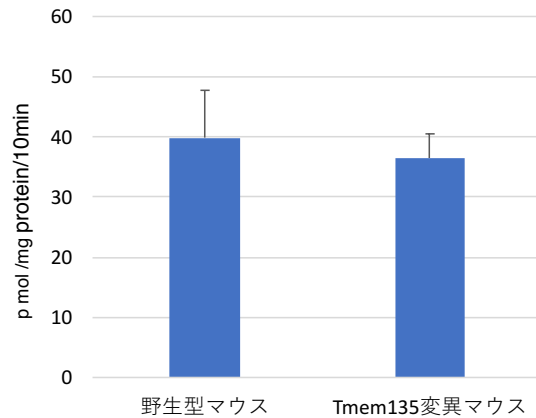


図5 シナプス小胞におけるグルタミン酸再取り込み能の比較。
Tmem135 変異マウスで取り込み能の低下が観られた。

さらにシナプス小胞におけるグルタミン酸取り込みの能のキネティクス変化を検討するため、シナプス小胞と H^{3+} にてラベルしたグルタミン酸の反応時間を変化させて、グルタミン酸取り込みの能の検討を行った。その結果 Tmem135 変異マウスでグルタミン酸の取り込み能の低下傾向にあったが、キネティクスに大きな違いは観られなかった(図6)。

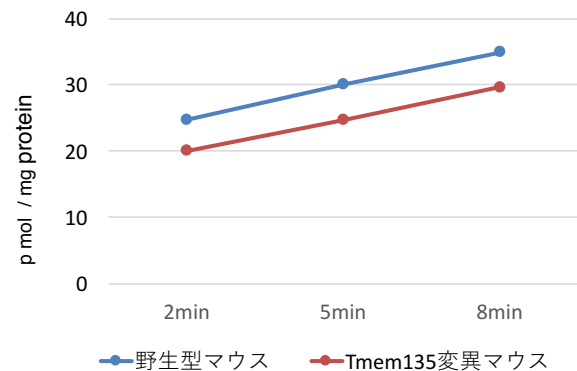


図6 シナプス小胞におけるグルタミン酸取り込み能のキネティクス変化の検討。
Tmem135 変異マウスと野生型マウスでキネティクス(傾き)に違いは観られない。

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 1 件)

- ① Wei-Hua Lee, Hitoshi Higuchi, Sakae Ikeda, Erica L Macke, Tetsuya Takimoto, Bikash R Pattnaik, Che Liu, Li-Fang Chu, Sandra M Siepka, Kathleen J Krentz, C Dustin Rubinstein, Robert F Kalejta, James

A Thomson, Robert F Mullins, Joseph S Takahashi, Lawrence H Pinto, Akihiro Ikeda: Mouse Tmem135 mutation reveals a mechanism involving mitochondrial dynamics that leads to age-dependent retinal pathologies, eLife 2016; 5:e19264. DOI: 10.7554/eLife.19264, 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① Wei-Hua Lee, Hitoshi Higuchi, Erica Macke, Che Liu, Li-Fang Chu, John B. Troy, Robert F. Mullins, Joseph Takahashi, Lawrence Pinto, Akihiro Ikeda: The role of Tmem135 in retinal aging and mitochondrial dynamics, The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2015, 2015年5月3日～5月7日 Denver, Colorado, USA

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/shimasui/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 仁 (HIGUCHI Hitoshi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30423320

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

十川 千春 (SOGAWA Chiharu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10253022

(4) 研究協力者

IKEDA Akihiro

University of Wisconsin-Madison, Department of Medical Genetics・Professor

田尻 絢子 (TAJIRI Ayako)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生