

平成30年6月25日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04276

研究課題名(和文) PKDの活性制御機構とモノアミン分泌への関与

研究課題名(英文) Mechanism of PKD activation for monoamine release

研究代表者

白根 道子 (Shirane, Michiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90398082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミンの分泌にはトランスゴルジネットワーク(TGN)からの輸送小胞の形成機構が関与している。TGNにおける輸送小胞形成過程ではprotein kinase D (PKD)が重要な役割を果たしているが、モノアミン分泌におけるPKDの関与は知られていなかった。われわれはプロトルーディンによる輸送制御と膜構造調節への関与を明らかにしたが、さらにPKD活性制御とモノアミン分泌への関与を見いだした。TGN局在のプロトルーディン結合タンパク質としてPDZD8とTMEM55を新規に同定し、それらによるPKD活性制御と膜曲率制御について解析し、制御機構を調べた。

研究成果の概要(英文)：The question in this project is whether PKD is associated with monoamine release at the TGN. For this aim, we investigated the regulatory mechanism of PKD activation. We focused on the association of PKD on membrane curvature, and it is suggested that PKD regulates membrane dynamics at the TGN through protrudin binding protein PDZD8 and TMEM55B.

研究分野：神経科学

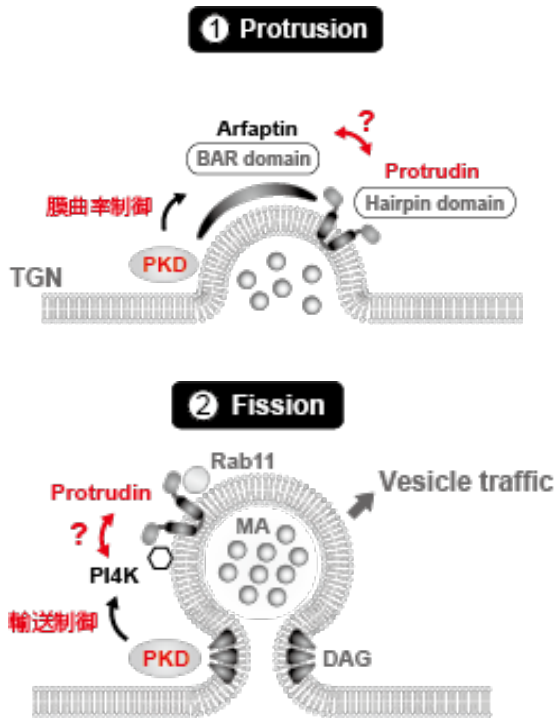
キーワード：モノアミン 細胞内情報伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスゴルジネットワーク(TGN)は、分泌タンパク質を輸送先に応じて分類し小胞に包み特定方向へ送り出す、ソーティング器官である。神経細胞などの極性細胞の機能維持には、TGNにおける分泌小胞形成の適切な制御が必須である。TGNからの小胞形成過程は2段階、すなわちTGNの膜曲率変化による突出の過程(Protrusion)と、突出部分からの小胞分離の過程(Fission)から成る。

そしてTGNにおける輸送小胞形成の過程では、protein kinase D (PKD) が重要な役割を果たしている。PKDについては、細胞膜、細胞質、ミトコンドリア、核でも各々特異的な働きが知られているが、近年特にTGNでの活性制御機構が解明されつつある。



2. 研究の目的

本研究では、TGNにおけるPKD活性制御機構とモノアミン分泌小胞の形成への関与を明らかにする。特に、TGN局在のプロトルーディン複合体による、PKD活性制御と膜曲率制御への関与と機構を解析し、それらによるモノアミン分泌調節への関連と機構を明らかにする。

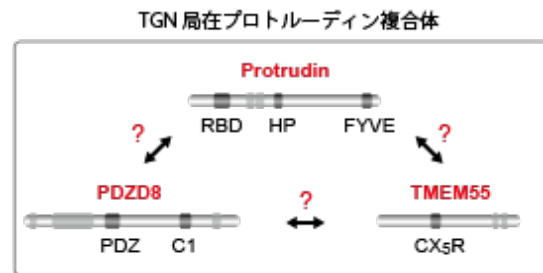
3. 研究の方法

本研究では、モノアミン分泌機構を解明するために、TGNにおけるPKD活性制御と膜曲率制御による分泌小胞形成に焦点を当てた解析を行う。特に、TGN局在のプロトルーディン結合タンパク質であるPDZD8およびTMEM55について、PKD活性化、

TGNにおける小胞形成、モノアミン分泌への関与を明らかにする。その方法として、PC12やマウス中脳初代培養などの分泌性神経細胞を用いたモノアミン分泌量の解析、分泌制御分子の複合体解析のためのプロテオミクス解析、PKD活性化機構を解析するための生化学的実験を行う。また分泌制御分子の個体レベルでの機能解析のため、プロトルーディン複合体分子の遺伝子変異マウスを作製し、PKD活性やモノアミン分泌や行動の解析を行った。

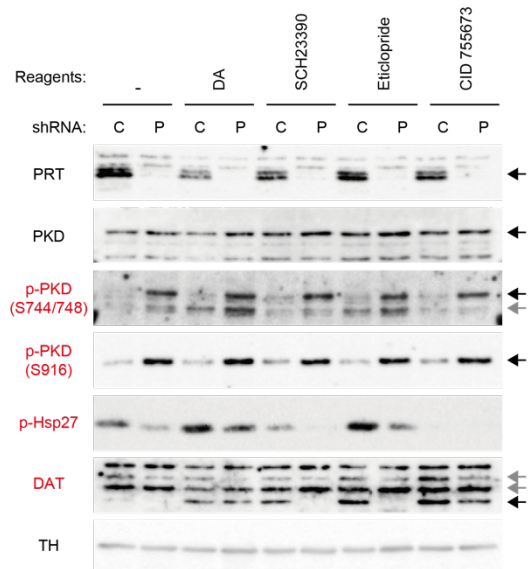
4. 研究成果

以下の解析を、プロトルーディン、PDZD8、TMEM55の過剰発現やノックダウンで調べた。

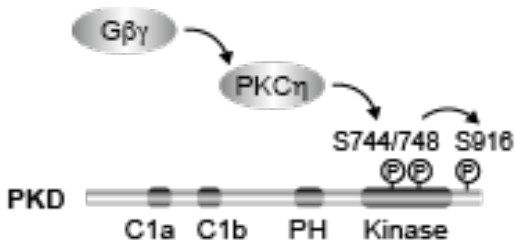
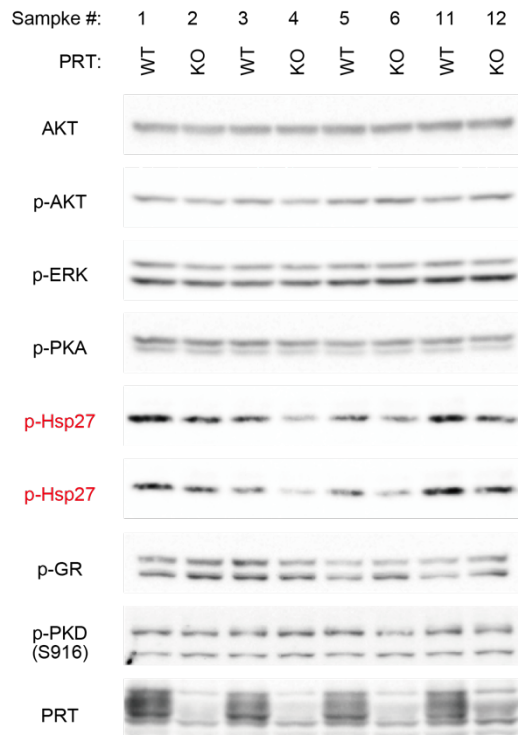


(1) PKDリン酸化とPKD活性化の解析
PKDのリン酸化部位は複数知られていた。キナーゼドメイン中のSer744/Ser748とC末端近傍のSer916について解析した。

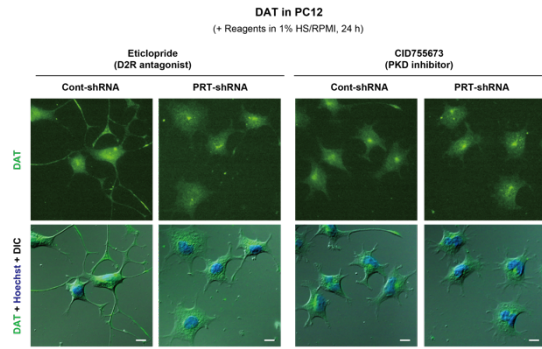
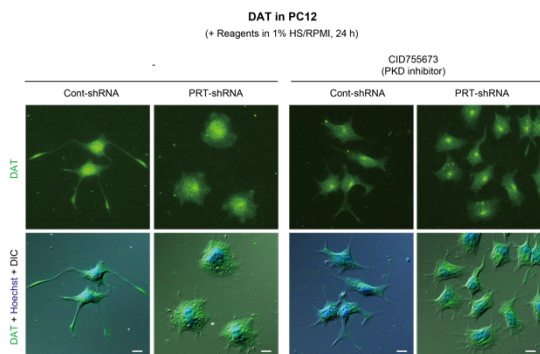
【Effects of DA agonists/antagonists on PKD phosphorylation in PC12】



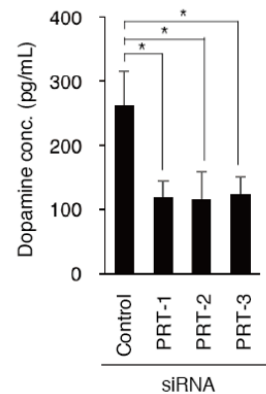
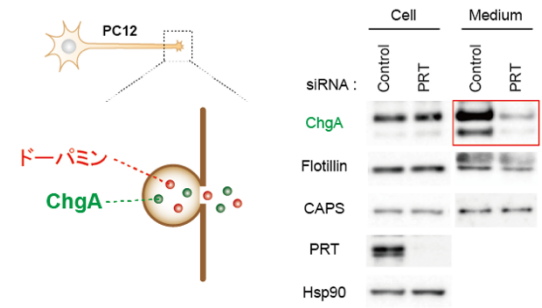
【Phosphorylation of PKD substrates in PRT-KO mice brain】



(2) TGN における分泌小胞形成の解析
TGN における分泌小胞の形成能を評価するために、イメージング解析による TGN および小胞の形態観察を行った。電子顕微鏡による TGN の形態観察や、TGN マーカータンパク質(TGN38 など)の免疫染色による蛍光顕微鏡解析を行った。



(3) 分泌物質の定量解析
PC12 細胞は、ドーパミンなどのモノアミンや、クロモグラニンなどの分泌性タンパク質を NGF 依存的に分泌する。培養上清中の分泌物質を、ELISA や Western blotting により解析した。



(4) プロトルーディン欠損マウスの解析
プロトルーディン欠損マウスにおいてマウス行動バッテリー解析を行った結果、種々の行動異常が認められ、モノアミン分泌異常との関連が示唆された。

(5) PDZD8、TMEM55 の変異マウス作製と解析
PDZD8、TMEM55 の全身ノックアウトマウスを作製した。PDZD8 KO マウスは樹立が完成し解析中である。TMEM55B KO マウスは胎生致死で本研究の目的には使用できなかった。

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4件)

① SRRM4-dependent neuron-specific alternative splicing of protrudin transcripts regulates neurite outgrowth.

Ohnishi, T., *Shirane, M., and Nakayama, K. I.

Sci. Rep., 2017, 12: 709-719

(*Corresponding author)

DOI: 10.1038/srep41130

② TMEM55B contributes to lysosomal homeostasis and amino acid-induced mTORC1 activation.

Hashimoto, Y., *Shirane, M., and Nakayama, K. I.

Genes Cells, 2018 Jun;23(6):418-434

(*Corresponding author)

DOI: 10.1111/gtc.12583

③ The autism-related protein CHD8 cooperates with C/EBP β to regulate adipogenesis.

Kita, Y., Katayama, Y., Shiraishi, T., Oka, T., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Miyata, K., Oike, Y., Shirane, M., Nishiyama, M., and Nakayama, K. I.

Cell Reports, 2018 May 15; 23(7):

1988-2000

DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.050.

④ Nuclear-cytoplasmic shuttling protein PP2A^{B56} contributes to mTORC1-dependent dephosphorylation of FOXK1.

Nakatsumi, H., Oka, T., Higa, T., Shirane, M., and Nakayama, K. I.

Genes Cells, in press

[学会発表](計4件)

① 白根道子、橋本 寛、中山 敬一
小胞体の膜構造制御と遺伝性痙性対麻痺の病態

第56回日本神経学会学術大会 教育講演(2015. 5)新潟

② 白根道子

神経変性疾患における小胞体の関与
第10回 Neuroscience NCU meeting(2017. 6)名古屋

③ 白根道子

神経の病気の謎に迫る!

名古屋市立大学×名古屋市科学館 サイエンスパートナーシップ連携イベント(2017. 9)名古屋

④ 白根道子

神経疾患の謎 ～狂牛病やアルツハイマー病はどのように発症する?～

平成29年度 名古屋市立大学 市民公開講座 (2017. 9)名古屋

[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.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/byg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白根 道子(SHIRANE, Michiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号:90398082

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

中山 敬一(NAKAYAMA, Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号:80291508

(4) 研究協力者

()