

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500322

研究課題名（和文） 神経伝達物質放出機構における SNARE 制御タンパク質トモシンの役割と作用機構

研究課題名（英文） Roles and modes of action of tomosyn in neurotransmitter release

研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIAKI)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80359848

研究成果の概要：

神経細胞が次の神経細胞に情報を伝えるシナプス伝達の主たる過程は、神経伝達物質の放出により行われている。従って、神経伝達物質の放出の過程を解明していくことは、シナプスの可塑性ひいては記憶形成の過程を理解する上で重要である。これまで、私共は、神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。トモシンが t-SNAREs とトモシン複合体を形成し、小胞融合に必須な SNARE 複合体の形成を抑制することにより、神経伝達物質の放出を制御している。このトモシンの生体での機能を明らかにするために、トモシンノックアウトマウスを作成し、トモシンの生理的作用について解析した。その結果、トモシンが、SNARE 複合体の多量体化の促進と SNARE 複合体形成の抑制の二つの作用を介して、強力に神経伝達物質の放出を抑制することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質の放出機構、SNARE 複合体、トモシン

## 1. 研究開始当初の背景

私共は、神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしていた(Fujita *et al.* Neuron 1998)。トモシンが C 末端側の

v-SNARE 相同領域を介して、t-SNARE とトモシン複合体を形成し、小胞融合に必須な SNARE 複合体の形成を抑制することにより、神経伝達物質の放出を制御していた。トモシンの活性調節は、ROCK によるシンタキシンのリン酸化によりトモシン複合体形成が促進

され (Sakisaka *et al.* Journal of Cell Biology 2004)、逆に PKA によるトモシンのリン酸化によりトモシン複合体形成が抑制されることを明らかにしていた (Baba *et al.* Journal of Cell Biology 2005)。モデル神経細胞である培養ラット上頸交感神経細胞において、トモシンは PKA により活性調節を受けることにより、SNARE 系を介してアセチルコリン放出を制御していることを明らかにしていた。このようにトモシンは、SNARE 複合体の形成を抑制することにより、神経伝達物質の放出に抑制的に働くと考えられていた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、トモシンは、神経伝達物質の放出に抑制的に働くと考えられていたが、ラット上頸交感神経細胞において、トモシンを RNAi 法により knockdown すると神経伝達物質の放出を抑制するという予想と逆の結果を得た。そこで、トモシンの生体での機能を明らかにするために、トモシンノックアウトマウスを作成し、解析した。

## 3. 研究の方法

トモシンの生体での機能を明らかにするために、トモシンの生理的作用について以下の解析をした。

- 1) トモシンノックアウトマウスを作成し、海馬苔状線維シナプスの神経伝達を電気生理的に調べた。
- 2) トモシンノックアウトマウスの海馬苔状線維シナプスの長期記憶形成を電気生理的に調べた。

3) トモシンノックアウトマウス的大脑での SNARE 複合体量を測定した。

4) トモシンの WD40 リピードドメインの SNARE 複合体形成に与える効果を生化学的に検討した。

5) 培養ラット上頸交感神経細胞を用いて、WD40 リピードドメインのアセチルコリン放出に与える効果を検討した。

## 4. 研究成果

トモシンの生体での機能を明らかにするために、トモシンの生理的作用について解析し、以下の結果を得た。

- 1) トモシンノックアウトマウスでは、神経伝達物質の放出が促進した。
- 2) トモシンノックアウトマウスでは、短期記憶に異常が認められた。
- 3) トモシンノックアウトマウスでは、SNARE 複合体量が減少した。
- 4) トモシンの N 末端側の WD40 リピードドメインが t-SNAREs と結合し、トモシンは SNARE 複合体の形成と多量体化を促進した。
- 5) 培養ラット上頸交感神経細胞において、WD40 リピードドメインがアセチルコリン放出を抑制した。

以上の結果から、N 末端側の WD40 リピードドメインによる SNARE 複合体の多量体化を促進と C 末端側の v-SNARE 相同領域による SNARE 複合体形成の抑制の二つの作用により、トモシンが強力に神経伝達物質の放出を抑制することを明らかにした。

このように2年間の研究で、トモシンの作用機構について、当初の計画以上の成果をあげることが出来た。

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6件)

1. Yamamoto, Y., Mochida, S., Kurooka, T., and Sakisaka, T. 4番目

Reciprocal intramolecular interactions of tomosyn control its inhibitory activity on the SNARE complex formation.

(J. Biol. Chem. in press, 2009) 査読有

2. Togashi, H., Sakisaka, T., and Takai, Y.

Cell Adhesion Molecules in the Central Nervous System

(Cell Adhesion & Migration, in press, 2009) 査読有

3. Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., 他8名 1・2番目

Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release

(J. Cell Biol. 183 巻, 323-337, 2008) 査読有

4. Sakisaka, T., and Takai, Y.

A cell-free assay for endocytosis of E-cadherin.

(Methods Mol Biol. 440 巻, 77-87, 2008) 査読有

5. Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., 他2名 1番目

The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors.

(Curr. Opin. Cell Biol. 19 巻5号, 593-602, 2007) 査読有

6. Hisata, S., Sakisaka, T., Baba, T., 他4名 2番目

Rap1-PDZ-GEF interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth.

(J. Cell Biol. 178 巻5号, 843-860, 2007)

[学会発表] (計2件)

①Toshiaki Sakisaka, Yoshimi Takai

Vesicle transport-dependent Rap1 activation and its implication in neurite outgrowth

BMB2008

平成20年12月9日

神戸国際展示場

②匂坂 敏朗、高井 義美

小胞輸送による Rap1 の活性化機構と軸索形成への関与

第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会

平成19年5月30日

福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIAKI)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80359848

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし