

平成22年5月24日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700334

研究課題名（和文）プレシナプスにおける Ca チャネル複合体の形成及び制御機構に関する研究

研究課題名（英文）Molecular mechanism of Ca²⁺ channel protein complexes at presynapse.

研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA SHIGEKI)

京都大学 大学院工学研究科・助教

研究者番号：90422980

研究成果の概要（和文）：シナプス前終末からの神経伝達の放出においては、活動電位依存的な細胞外からのカルシウムイオン（Ca²⁺）流入が不可欠であり、それを制御しているのが電位依存性 Ca²⁺チャネルである。我々は、Rab3 結合タンパク質として同定された RIM1 が電位依存性 Ca²⁺チャネル β サブユニットに結合して Ca²⁺チャネル活性を持続させ、その結果として神経伝達物質の放出が増大されることを報告した。RIM タンパク質には、4 種類のサブタイプ (RIM1-4) が報告されている。そこで、RIM2-4 に着目し、その生理的意義の解明を行った。様々な実験結果から、RIM2-4 も RIM1 と同様に Ca²⁺チャネル活性を制御することで神経伝達物質放出に関わっていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In presynapse, vesicles docking in close vicinity to voltage dependent Ca²⁺ channels (VDCCs) is essential for the control of neurotransmitter release triggered by depolarization-induced Ca²⁺ influx. We have recently reported that VDCC β-subunits physically interact with the presynaptic active zone scaffolding protein RIM1. This interaction cooperates with RIM1-Rab3 interaction to support neurotransmitter exocytosis by anchoring vesicles in the vicinity of VDCCs and by maintaining depolarization-triggered Ca²⁺ influx as a result of marked inhibition of voltage-dependent inactivation of VDCCs. In this research, we demonstrate that other RIM proteins (RIM2-4) also exert prominent suppression on VDCC inactivation via direct binding to β-subunits to enhance neurotransmitter release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：シナプス・カルシウムチャネル・RIM・神経伝達物質放出

1. 研究開始当初の背景

プレシナプスからの神経伝達の放出においては、活動電位依存的な細胞外からの Ca^{2+} 流入が不可欠であり、それを制御しているのが電位依存性 Ca^{2+} チャンネルである。神経伝達物質放出の厳密な制御がシナプス伝達の効率やシナプス可塑性に深く関わることから、 Ca^{2+} チャンネルのプレシナプス局在化の分子メカニズム解明に対して精力的な研究が行われてきた。しかしながら、「 Ca^{2+} チャンネルと小胞との間の距離」を決める分子実体および分子メカニズムは未解明であった。

近年、我々は、アクティブゾーン足場タンパク質 RIM1 と Ca^{2+} チャンネル β サブユニットが相互作用することを見出した。電気生理学的な手法により、この相互作用が Ca^{2+} チャンネルの不活性化を抑制し、チャンネル活性を劇的に持続させることを確認した。また、全反射顕微鏡を使った実験から、 β サブユニットと RIM1 が結合することで、PC12 細胞の形質膜直下の小胞密度が増加することを確認した。すなわち、 β サブユニットと RIM1 との結合は、シナプス小胞を Ca^{2+} チャンネルの近傍に配置し、その状態で Ca^{2+} チャンネルを活性化させることで効率的な神経伝達物質放出を引き起こすと考えられた。

2. 研究の目的

私は、RIM1 と β サブユニットの相互作用こそが、90 年代初頭からその解明が待ち望まれていた、 Ca^{2+} チャンネルと小胞の距離を決める分子メカニズムではないかと考えている。本研究計画においては、それを証明するために、RIM タンパク質と β サブユニットの結合および機能を詳細に検討することを目的とする。RIM タンパク質には、4 種類のサブタイプ (RIM1-4) が報告されている。そこで、RIM2-4 に着目し、 β サブユニットに対する効果を詳細に検討する。

3. 研究の方法

RIM2-4 については、発現分布について詳細に検討がなされていない。そこで、northern blotting, in situ ハイブリダイゼーション法等により、その分布を詳細に明らかにする。

RIM2-4 と β サブユニットとの結合に関しては、生化学的手法を用いて、それぞれの親和性を詳細に明らかにする。また、過剰発現系だけではなく、native における相互作用についても評価する。RIM2-4 と β サブユニットとの結合がもたらす機能については、電気生理学的な手法および、蛍光イメージングにより明らかにし、その結果として神経伝達物質

放出にどのような影響が出てくるかを評価する。

siRNA を用いて、RIM1-4 をノックダウンさせて、上記と同様の実験手法を用いてその詳細を明らかにする。これによって、RIM1-4 それぞれのタンパク質の役割を明らかになると期待される。

4. 研究成果

RIM2-4 の発現分布についてウェスタンブロットティングおよび in situ ハイブリダイゼーション法を用いて評価したところ、RIM1 と同様に、RIM2-4 も脳に多く発現することがわかった。また、RIM1 とは異なり、RIM2-4 に関しては、他の臓器における発現も認められた。

β サブユニットに対する親和性については、それぞれの精製タンパク質を作製し、解離定数を算出した。その結果、RIM2 は RIM1 と同様の親和性を持っていたが、RIM3 および RIM4 の親和性は RIM1 に比べて低かった。また、脳から調整した膜画分サンプルを用いた実験からも、RIM2-4 と Ca^{2+} チャンネルとの結合が確認できた。

Ca^{2+} チャンネル活性に対する各 RIM サブタイプの効果は、 Ca^{2+} イメージングおよび電気生理学的な手法を用いて評価した。BHK 細胞を用いた組み換え発現系において、RIM1 と同様に、RIM2-4 の過剰発現により Ca^{2+} チャンネル活性が劇的に持続した。また、内在的に RIM2-4 を発現する PC12 細胞においては、siRNA を用いた RIM2-4 のノックダウンにより Ca^{2+} チャンネル活性が減弱し、またその遺伝子レスキューにより Ca^{2+} チャンネル活性が回復したことから、native の細胞においても RIM2-4 は Ca^{2+} チャンネル活性を制御していることが分かった。

神経伝達物質の放出に関して PC12 細胞を用いて評価したところ、RIM2-4 を過剰発現することで上昇し、RIM2-4 をノックダウンすることで損なわれた。すなわち、RIM2-4 も RIM1 と同様に Ca^{2+} チャンネル活性を制御することで神経伝達物質放出に関わっていると言える。

以上の結果から、RIM1 だけでなく、RIM2-4 も β サブユニットに結合し、神経伝達物質放出を制御していることが明らかになった。特に、RIM1-4 すべてをノックダウンすると神経伝達物質放出がほぼ損なわれることから、RIM1-4 と β サブユニットの結合は、神経伝達物質放出に不可欠であると言える。

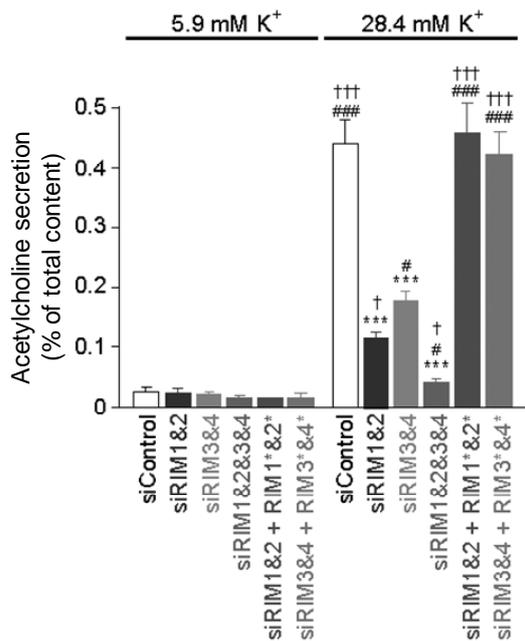


図. 神経伝達物質放出における RIM1-4 ノックダウンの効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Uriu Y, Kiyonaka S, Miki T, Yagi M, Akiyama S, Mori E, Nakao A, Beedle AM, Campbell KP, Wakamori M, Mori Y. RIM γ isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long-lasting currents but block neurotransmitter vesicle-anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* (in press).
2. Watanabe H, Yamashita T, Saitoh N, Kiyonaka S, Iwamatsu A, Campbell KP, Mori Y, Takahashi T. Involvement of Ca²⁺ channel synprint site in synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* **30**, 655-660 (2010).
3. Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano M, Mori E, Kurosaki T, Inoue R, Hikida M, Putney Jr JW, Mori Y. Ca²⁺ influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC β and ERK activation in B cells. *J. Cell Sci.* **123**, 927-938 (2010).
4. Miyagi K, Kiyonaka S (co-first), Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M, Mori Y. A pathogenic C-terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca²⁺ entry via association with TRPC3 and TRPC7. *J. Biol.*

Chem. **284**, 34400-34412 (2009).

5. Kato K, Kiyonaka S, Sawaguchi Y, Tohnishi M, Masaki T, Yasokawa N, Mizuno Y, Mori E, Inoue K, Hamachi I, Takeshima H, Mori Y. Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in lepidopterous ryanodine receptor Ca²⁺ release channel. *Biochemistry* **48**, 10342-10352 (2009).
6. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5740-5745 (2009).
7. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, Mori Y, Tymianski M, Macdonald JF. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J. Physiol.* **587**, 965-979 (2009).
8. Ohmori I, Ouchida M, Miki T, Mimaki N, Kiyonaka S, Nishiki T, Tomizawa K, Mori Y, Matsui H. A CACNB4 mutation shows that altered Ca(v)2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiol. Dis.* **32**, 349-354 (2008).
9. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K, Mori Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels* **2**, 287-298 (2008).
10. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med.* **14**, 738-747 (2008).

[学会発表] (計 7 件)

1. 清中茂樹、宮城恭子、山田和徳、三木崇史、森恵美子、加藤賢太、沼田朋大、澤口諭一、木村徹、金井好克、森泰生、多発性嚢胞腎原因遺伝子ポリシスチン2変異体は TRPC3 と複合体を形成し受容体活性化型カルシウム流入を増加させる、第 83 回日本薬理学会大会、大阪府大阪市、2010 年 3 月 17 日
2. 加藤賢太、清中茂樹、澤口諭一、遠西正範、正木隆男、八十川伯朗、水野雄介、森恵美子、井上圭亮、浜地格、竹島浩、

森泰生、フルベンジアミドによるチョウ目リアノジン受容体カルシウム放出チャネル選択的活性化機構の解明、第 82 回日本生化学会大会、兵庫県神戸市、2009 年 10 月 24 日

3. 清中茂樹、加藤賢太、西田基宏、澤口諭一、沼田朋大、佐藤主税、浜地格、森泰生、新規 TRPC3 チャネル阻害剤の開発及び作用機序の解明、第 82 回日本生化学会大会、兵庫県神戸市、2009 年 10 月 24 日
4. 清中茂樹、森泰生、新規 Ca²⁺チャネル阻害剤の作用機構解明およびその応用、バイオテクノロジー部会シンポジウム、福岡県福岡市、2009 年 9 月 14 日
5. 瓜生幸嗣、若森実、秋山智志、山崎浩史、三木崇史、清中茂樹、森恵美子、森泰生、RIM ファミリータンパク質による電位依存性カルシウムチャネルの機能修飾、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、兵庫県神戸市、2008 年 12 月 9 日
6. Takafumi Miki, Yoshitsugu Uriu, Shigeki Kiyonaka, Yasuo Mori, Functional impact of RIM family sharing C2B domain on gating of voltage-dependent Ca²⁺ channels , Washington DC USA, November 17, 2008.
7. Shigeki Kiyonaka, Yasuo Mori, RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels, FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES , Colorado USA, July 8-9, 2008.

[その他]

ホームページ :

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA SHIGEKI)

京都大学 大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 90422980

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし