

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640036

研究課題名(和文) 神経伝達物質放出におけるin situ可視化無細胞アッセイ系の開発

研究課題名(英文) Development of an in situ visible cell-free assay system for neurotransmitter release

研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA, TOSHIAKI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80359843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達の主たる過程は神経伝達物質の放出によって行われている。神経伝達物質は、シナプス小胞が幾つもの連続した素過程を経て、シナプス前膜に膜融合することで神経終末から放出される。この素過程と膜融合に至るまでの過程で、シナプス前膜の膜構造変化が起こることが知られている。そこで、膜構造変化を起こす膜変形タンパク質を探索し、新しい膜変形タンパク質Arl6IP1とTMCC3を発見した。Arl6IP1の結合分子としてTMEM33を同定した。TMEM33はArl6IP1の膜変形活性を抑制した。TMCC3は膜変形タンパク質reticulonと結合し、膜を積層化することを明らかにした。

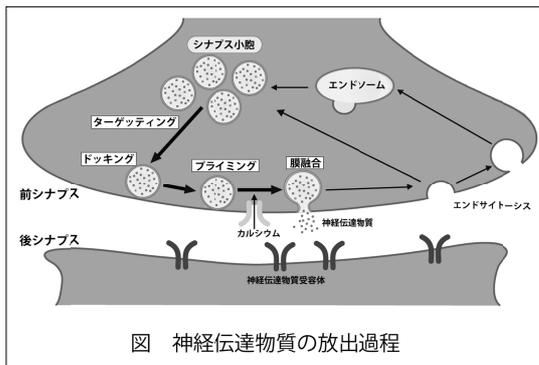
研究成果の概要(英文)：The main process of synaptic transmission from one neuron to another neuron is mediated by neurotransmitter release. The entry of Ca²⁺ into nerve terminals initiates the series of molecular events that culminates with fusion of the synaptic vesicle and release of neurotransmitter into the synaptic cleft. The presynaptic membrane curvature change has been shown to be involved in the synaptic vesicle fusion. Here we identify membrane-shaping proteins, Arl6IP1 and TMCC3. We also identify an Arl6IP1-interacting protein TMEM33. TMEM33 suppresses the membrane-shaping activity of Arl6IP1. On the other hand, TMCC3 has membrane-laminating activity through interacting with membrane-shaping proteins, reticulon family proteins.

研究分野：神経科学

キーワード：神経伝達物質 シナプス小胞 膜融合

1. 研究開始当初の背景

神経伝達の主たる過程は神経伝達物質の放出によって行われている。神経伝達物質は、シナプス小胞が幾つもの連続した素過程を経て、シナプス前膜に超高速(サブミリ秒単位)で膜融合することで神経終末から放出される(図)。



各素過程は、シナプス小胞の融合に対して促進的、または抑制的に働いていると考えられており、これらが順序正しく整然と行われることで、神経伝達物質の放出量が厳密にコントロールされている。一方、神経伝達物質の過剰な放出や不足が生じると様々な神経疾患が引き起こされる。例えば、てんかん発作は繰り返し起こる急激で過剰かつ無秩序な神経伝達物質放出により引き起こされ、統合失調症や鬱病では、神経伝達物質の放出バランスの障害が生じていることが知られている。このような疾患の原因の1つとして、神経伝達物質放出機構の素過程そのものあるいは素過程の順序の異常が考えられる。近年、これらの疾患の原因候補遺伝子が多数同定されてきているが、原因分子と素過程との機能関係は不明である。その大きな理由として、各素過程を構成する因子および素過程の順序を制御する分子機構の理解が完全ではない上、素過程を十分に解析、評価できるアッセイ系が確立されていないことがある。

2. 研究の目的

神経伝達物質の過剰放出や不足は、てんかん、統合失調症、鬱等の様々な神経疾患を引き起こす。神経伝達物質の放出量は、シナプス小胞が連続した素過程(融合小胞の選別、ターゲティング、ドッキング、プライミング、膜融合)を経て、シナプス前膜に超高速で融合することで厳密に管理されている。私共は最近、全く新しい素過程、膜融合を止める新規素過程(クロージング)

が存在することを発見した。私共の新たな素過程の発見から、これまで考えられていた5つの素過程の役割を新たな視点から見直す必要がある。そこで、膜構造という視点から素過程を捉えなおすために、超高速膜融合に至る全素過程を *in situ* で可視化、*live* で検出可能なアッセイ系 (*in situ* 可視化無細胞アッセイ系) を世界に先駆けて開発する。長年不明であった素過程と超高速膜融合に至る膜構造変化との機能関係を明らかにする。さらに、種々の神経疾患を素過程あるいは素過程の順序制御の異常という観点から捉え直す。

3. 研究の方法

素過程と膜融合に至るまでの過程で、シナプス前膜の膜構造変化が起こることが知られている。そこで、膜構造変化を起こす膜変形タンパク質を探索するために、以下の解析をした。

(1) 代表的な膜変形タンパク質として reticulon ファミリーがある。Reticulon ファミリーは reticulon homology domain を持つことが知られている。そこで reticulon homology domain を有するタンパク質を、データベースを用いて探索し、Arl6IP1 を見出した。Arl6IP1 を人工 liposome に埋め込み、その膜変形効果を電子顕微鏡により観察した。

(2) Reticulon ファミリーに結合するタンパク質として、豚脳抽出液から reticulon4C をベイトとしたアフィニティー精製により、TMEM33 を同定した。HEK293細胞に TMEM33 と reticulon ファミリー (reticulon1A, 2B, 3C, 4C, Arl6IP1) のそれぞれ一つを共発現させ、免疫共沈実験を行い、TMEM33 と reticulon ファミリーの結合を検討した。HeLa 細胞に reticulon ファミリー (reticulon4C, Arl6IP1) 単独あるいは reticulon ファミリー (reticulon4C, Arl6IP1) と TMEM33 を共に発現させ、抗PDI抗体を用いた蛍光免疫染色により、小胞体の形態変化を解析し、TMEM33 による reticulon ファミリーの膜変形作用への効果を検討した。

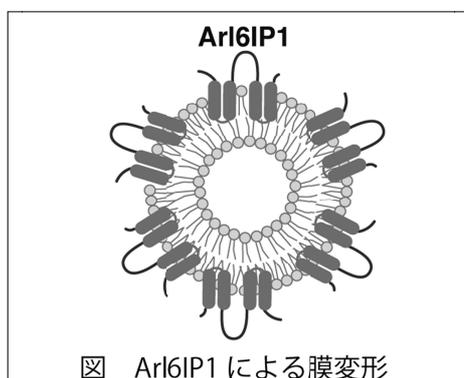
(3) HeLa 細胞に TEX28 ファミリーである TMCC1、TMCC2、TMCC3、TEX28 を発現させ、抗PDI抗体を用いた蛍光免疫染色により、小胞体の形態変化を解析した。TMCC3 を細胞質領域と膜貫通領域の二つに分け、それぞれを HeLa 細胞に発現させ、小胞体の形態変化

を解析した。HEK293細胞にTMCC3とreticulonファミリー（reticulon1A, 2B, 3C, 4C, Arl6IP1）のそれぞれ一つを共発現させ、免疫共沈実験を行い、TMCC3とreticulonファミリーの結合を検討した。

4. 研究成果

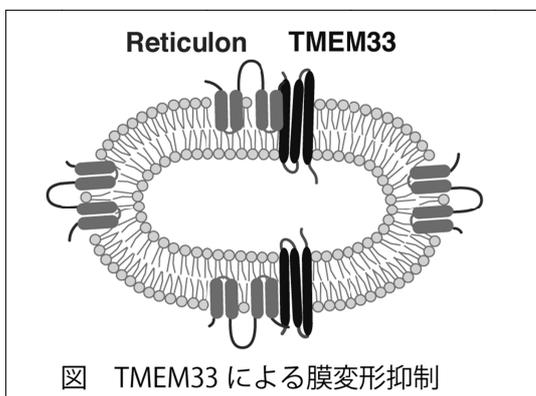
素過程と膜融合に至るまでの過程で、シナプス前膜の膜構造変化が起こることが知られている。そこで、膜構造変化を起こす膜変形タンパク質を探索し、以下の結果を得た。

1) 新しい膜変形タンパク質として、reticulon homology domainを1つ有するArl6IP1を発見した。Arl6IP1の全長タンパク質を人工liposomeに組込むと、チューブ状に変形した。Arl6IP1のヘアピン型の膜貫通領域が膜変形に重要な働きをした(図)。



これらのことから、新しい膜変形タンパク質Arl6IP1の同定(Yamamoto et al., Biochem. J. 2014)と膜変形アッセイ系の開発に成功した。また、Arl6IP1の一次構造と膜変形能から、Arl6IP1はreticulonファミリーのメンバーの一つになると考えられた。

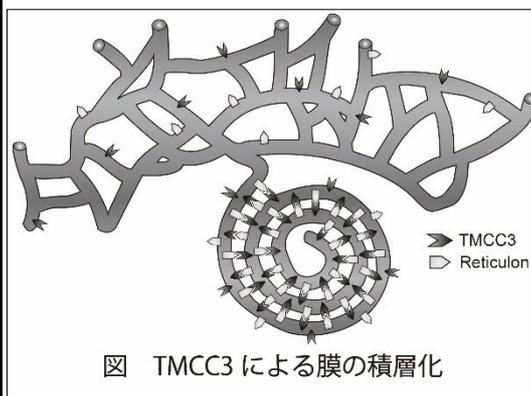
2) Reticulon4Cに結合するタンパク質としてTMEM33を発見した(Urade et al., Kobe J. Med. Sci. 2014)。TMEM33は全てのreticulonファミリー（reticulon1A, 2B, 3C, 4C,



Arl6IP1)と結合した。TMEM33がreticulonファミリー（reticulon4C, Arl6IP1）の膜変形活性を抑制した(図)。

これらのことから、reticulonファミリーに結合する分子TMEM33の同定とその機能としてreticulonファミリーの膜変形活性に与える効果を明らかにした。

3) 膜変形タンパク質としてTEX28ファミリーに属するTMCC2が報告されていたが、他のファミリーメンバーであるTMCC1, TMCC3, TEX28にも膜変形活性があることを発見した。TMCC3を細胞質領域と膜貫通領域に分け、膜変形活性を検討したところ、細胞質領域に膜変形活性を有することを明らかにした。TMCC3は、その細胞質領域を介してreticulonファミリー（reticulon1A, 2B, 3C）と結合した。TMCC3全長あるいはTMCC3細胞質領域を発現させると、膜の積層化を誘導した。TMCC3はreticulonファミリーとの結合を介して、膜の積層化を誘導するものと考えられた(図)。



膜構造変化を起こす膜変形タンパク質を探索し、新しい膜変形タンパク質Arl6IP1とTMCC3を発見した。Arl6IP1はreticulonファミリーのメンバーに属する分子であると考えられた。Reticulonファミリーの結合分子としてTMEM33を同定した。TMEM33はreticulonファミリーに結合し、reticulonファミリーの膜変形活性を抑制した。TMCC3はreticulonファミリーと結合し、膜を積層化する能力があることを明らかにした。

このように3年間の研究で、膜構造変化については、当初の計画とおりの成果をあげることができた。膜構造変化を起こす膜変形タンパク質Arl6IP1とTMCC3のSNARE系タンパク質（膜融合に必須なタンパク質）の量調節への効果を、私どもが開発したセミンタクト細胞を用いたアッセイ系を用いて検討している。今後は、セミンタクト細胞のアッセイ系を用いて得られた知見

をもとに、人工膜を用いてシナプス小胞とシナプス前膜の超高速膜融合を再構成し、神経伝達物質放出の素過程の解明とその制御法の開発を行う。

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)

Yamamoto, Y., and Sakisaka T.

The Emerging Role of Calcium-modulating Cyclophilin Ligand (CAML) in Posttranslational Insertion of Tail-anchored Proteins into the Endoplasmic Reticulum Membrane.

(J. Biochem.;157(6):419-29, 2015) 査読有

Fujiwara, Y., Goda, N., Tamashiro, T., Narita, H., Satomura, K., Tenno, T., Nakagawa, A., Oda, M., Suzuki, M., Sakisaka, T., Takai, Y., and Hiroaki, H.

Crystal structure of afadin PDZ domain-nectin-3 complex shows the structural plasticity of the ligand-binding site.

(Protein Sci. 224:376-385, 2015) 査読有

Yunus, J., Setsu, T., Kikkawa, S., Sakisaka, T., and Terashima, T.

Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the laggard mutant mouse.

(Neuroscience 275:259-271, 2014) 査読有

Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y., and Sakisaka, T.

Identification and Characterization of TMEM33 as a Reticulon-binding Protein.

(Kobe J. Med. Sci., 60: E57-E65, 2014) 査読有

Hantan, D., Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.

VAP-B Binds to Rab3GAP1 at the ER: Its Implication in Nuclear Envelope Formation through the ER-Golgi Intermediate Compartment.

(Kobe J. Med. Sci., 60: E48-E56, 2014) 査読有

Yamamoto, Y., Yoshida, A., Miyazaki, N., Iwasaki K., Sakisaka T.

Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion.

(Biochem. J. 458(1):69-79, 2014) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

匂坂敏朗、寺島俊雄

髄鞘低形成と皮質形成異常を示す新規突然変異マウス laggard

第121回日本解剖学会総会・全国学術集会

2016年3月29日

ビッグパレット福島(福島県)

山本泰憲、匂坂敏朗

小胞体の膜形態制御と翻訳後膜挿入の分子機構

第87回日本生化学会大会

2014年10月15日

国立京都国際会館(京都府)

張 霞、山本泰憲、浦出剛史、匂坂敏朗

Reticulon 結合タンパク質 TMEM33 の同定と性状解析

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日

神戸国際会議場(兵庫県)

〔図書〕(計2件)

山本泰憲、匂坂敏朗

DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『メンブレントラフィック』 Part III: 高次生体機能を支えるメンブレントラフィック 10章 神経伝達物質放出を支えるメンブレントラフィック
化学同人 印刷中 2016年

Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.

Springer Presynaptic Terminals 365(129-140)

2015年

〔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

山本 泰憲 (YAMAMOTO YASUNORI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30467659