

73. 膜挿入装置による神経伝達物質放出の制御機構

匂坂 敏朗

Key words : 膜挿入装置, SNARE タンパク質,
CAML-WRB 複合体, TEX28

神戸大学 大学院医学研究科
生理学・細胞生物学講座 膜動態学分野

緒言

神経細胞が次の神経細胞に情報を伝えるシナプス伝達は、神経伝達物質の放出により行われている。神経伝達物質は、シナプス小胞がSNARE タンパク質の働きによりシナプス前膜へ融合することで放出される。シナプス小胞の膜融合反応は膜融合装置である3つのSNARE タンパク質により制御されている。シナプス小胞にはv-SNAREであるVAMP2が存在し、前シナプス形質膜にはt-SNAREであるシンタキシン-1とSNAP-25が存在する。VAMP2、シンタキシン-1、SNAP-25が3者複合体・SNARE 複合体を形成し、膜融合反応が起こる。SNARE タンパク質は小胞輸送において必須の役割をしているが、SNARE タンパク質そのものも積み荷タンパク質として小胞輸送でシナプス前膜やシナプス小胞へと運ばれている。その膜輸送の開始点は、SNARE タンパク質の小胞体膜への埋め込みである。SNARE タンパク質などC末端側に膜貫通領域をもつタンパク質はテイルアンカー型タンパク質とよばれ、トランスロコンを介さずに小胞体膜へ埋め込まれることが知られている。私共は、テイルアンカー型タンパク質を小胞体膜に挿入する新しい膜挿入装置 CAML-WRB 複合体を発見している。この CAML-WRB 複合体の複合体形成機構は不明のままであった。本研究では、CAML に結合する分子を探索し、その機能について解析した。

方法および結果

テイルアンカー型タンパク質であるSNARE タンパク質は、C末端側に1つの膜貫通領域を持つ膜タンパク質である。テイルアンカー型タンパク質はシグナル配列である膜貫通領域がリボソームの外へ出てくる前に翻訳が終了するため、トランスロコンによる小胞体への膜挿入が不可能である。非トランスロコン型膜挿入装置の分子実体は不明のままであった。最近、私共は、テイルアンカー型タンパク質の膜挿入装置としてCAML-WRB 複合体を発見することに成功した¹⁾。CAMLとWRBは互いの膜貫通領域を介して小胞体膜で結合し、細胞質側でTRC40と結合することでテイルアンカー型タンパク質の小胞体膜への挿入を行う。しかし、CAML-WRB 複合体の複合体形成機構の分子メカニズムは不明であった。本研究では、CAML に結合する小胞体膜タンパク質の検索を行った。小胞体にある膜タンパク質群としてTMCC (transmembrane and coiled-coil domain) ファミリーが知られている²⁾。TMCC ファミリーは、TMCC1, 2, 3, TEX28 (testis expressed 28) の4つのメンバーで構成されている。TEX28は410アミノ酸からなり、2つのcoiled-coil領域と1つの膜貫通領域をもつ(図1A)。精巣で特に高い発現がみられ、その詳細な機能は不明であった。CAMLと共にそれぞれのTMCCファミリーメンバー(TMCC1, 2, 3, TEX28)をHEK293細胞にトランスフェクションして発現させ、CAMLを免疫沈降したところ、TEX28が有意に共沈した(図1B)。MycタグのついたTEX28を恒常的に発現するHEK293細胞を作製し、細胞染色したところ、TEX28は小胞体のマーカータンパク質であるcalnexinと共局在した(図2)。これらの結果から、CAMLは小胞体膜タンパク質であるTEX28と結合することが明らかになった。

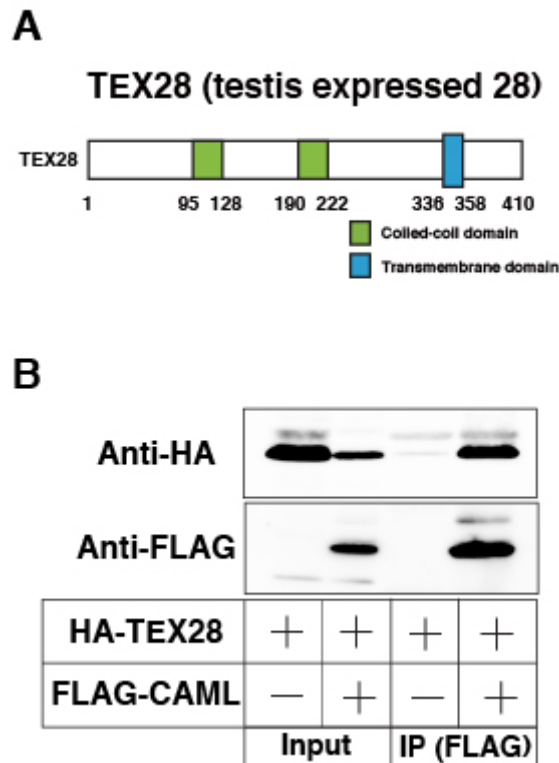


図1. CAML と TEX28 の結合.

A) TEX28 の一次構造：TEX28 は2つの coiled-coil 領域と1つの膜貫通領域を持つ。B) CAML と TEX28 の共沈：HA-TEX28 と FLAG-CAML を発現させた HEK293 細胞の TritonX-100 抽出液を FLAG 抗体で免疫沈降した。免沈産物を HA 抗体と FLAG 抗体を用いた Western blotting により調べた。

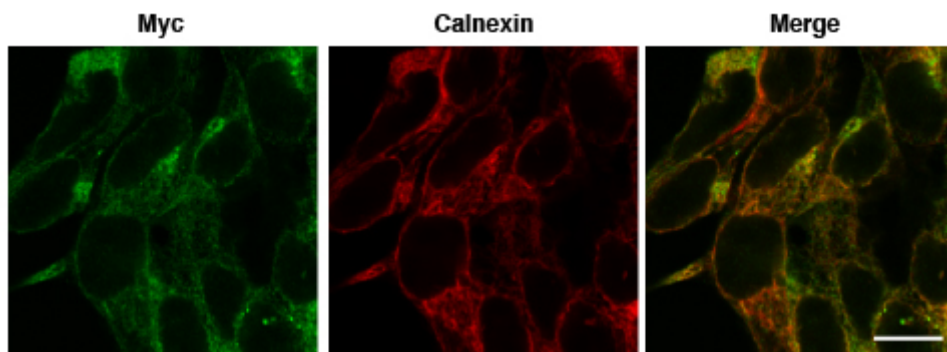


図2. TEX28 の小胞体への局在.

Myc-TEX28 を恒常的に発現する HEK293 細胞を Myc 抗体と Calnexin 抗体で二重染色した。Scale bar: 10 μ m.

TEX28 と CAML の結合を詳細に検討した。TEX28 を N 末の coiled-coil 領域を含む細胞質領域と C 末の膜貫通領域の2つのフラグメントを作製した(図3 A)。CAML と共に TEX28 のフラグメントを HEK293 細胞にトランスフェクションして発現させ、CAML を免疫沈降したところ、C 末の膜貫通領域を含むフラグメントが共沈した(図3 B)。これらの結果から、TEX28 は C 末の膜貫通領域を介して CAML に結合することが明らかになった。

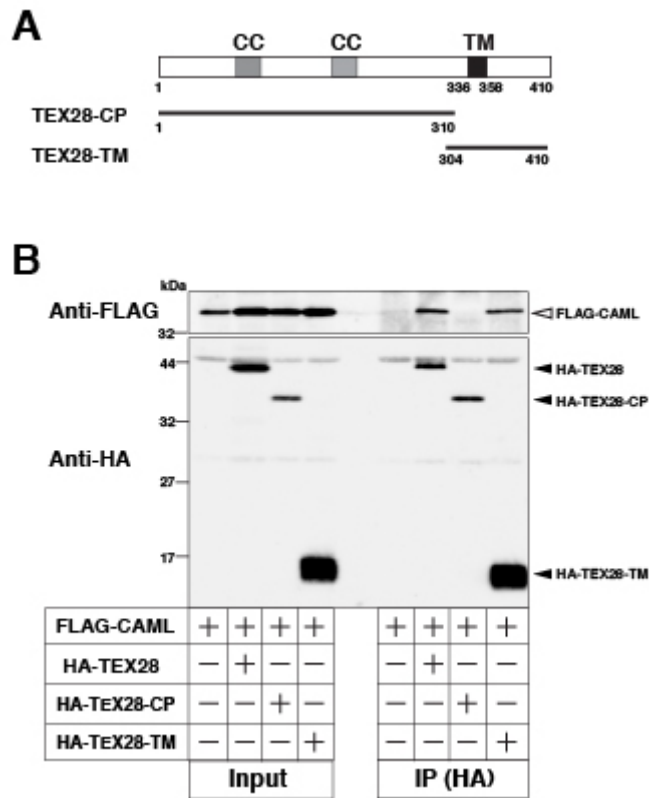


図3. TEX28 の膜貫通領域と CAML の直接結合.

A) 結合実験に使用した TEX28 のフラグメントの模式図. CP: cytoplasmic domain, TM: transmembrane domain. B) TEX28 の膜貫通領域と CAML の共沈. FLAG-CAML と HA-TEX28-CP あるいは HA-TEX28-TM を発現させた HEK293 細胞の TritonX-100 抽出液を FLAG 抗体で免疫沈降した. 免沈産物を HA 抗体と FLAG 抗体を用いた Western blotting により調べた.

CAML はその膜貫通領域を介して WRB に結合することから, WRB の CAML と TEX28 の結合に与える影響をそれぞれの全長リコンビナントタンパク質を用いて検討した. 全長リコンビナントタンパク質は, 昆虫細胞を用いて発現させ, 精製した. GST-TEX28 が結合した Glutathione Sepharose 4B beads に, MBP-CAML 精製タンパク質を一定量加え, その上に MBP-WRB 精製タンパク質の濃度を振って反応させた. MBP-WRB は MBP-CAML と GST-TEX28 の結合を用量依存的に阻害し, 代わって MBP-WRB が TEX28 に結合した (図4). 以上の結果から, CAML と WRB は競合的に TEX28 と結合することが明らかになった.

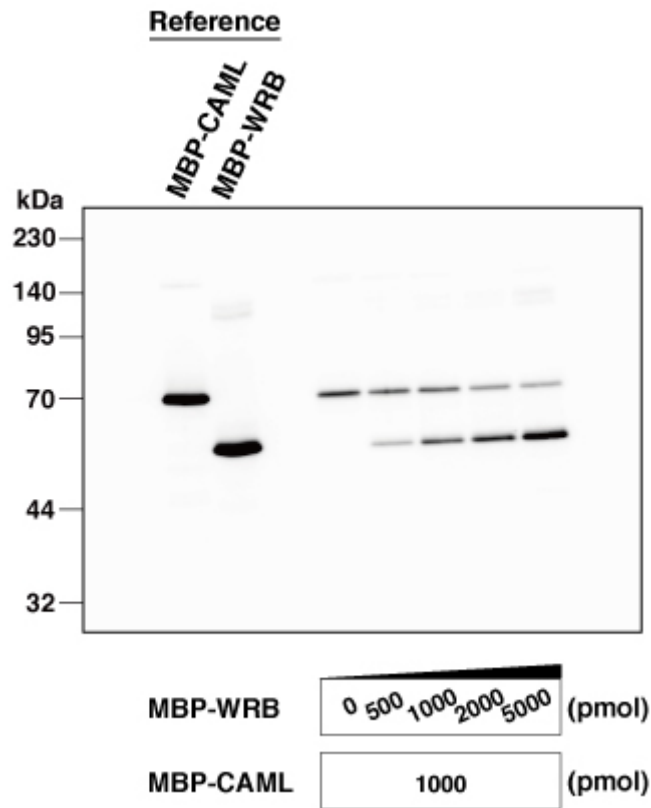


図4. CAML と WRB の TEX28 への競合的結合.

Glutathione Sepharose 4B beads に固相化した GST-TEX28 全長に、一定量の MBP-CAML 全長と様々な量の MBP-WRB 全長を混和した。その beads に結合したタンパク質を SDS sample buffer により溶出した。溶出したサンプルを SDS-PAGE し、MBP 抗体を用いた Western blotting により結合量を調べた。Reference としてタンパク質量 10 ng の MBP-CAML 全長と MBP-WRB 全長を泳動した。

考 察

今回の結果により、TEX28 が CAML に結合し、CAML-WRB 複合体の形成を調節している可能性を示した。リボソームで新生されたテイルアンカー型タンパク質は TRC40 に認識され、小胞体膜上に存在する CAML-WRB 複合体へ運ばれ、膜挿入される (図5)。TEX28 が小胞体膜上に存在すると、TEX28 は CAML あるいは WRB と複合体を形成し、CAML-WRB 複合体の形成を阻害すると考えられる。その結果、TRC40 が結合したテイルアンカー型タンパク質は小胞体へ膜挿入されない。神経細胞の小胞体に TEX28 が存在することで、SNARE タンパク質の膜挿入量を調節することが考えられる。シナプス小胞上の v-SNARE である VAMP2 や、前シナプス形質膜上の t-SNARE であるシンタキシン-1 と SNAP-25 の量を調節することにより、SNARE 複合体の形成を調節する。そして、シナプス小胞の膜融合を制御すると考えている。種々の神経細胞において、TEX28 の発現量を変えることにより、それぞれの神経細胞におけるシナプス小胞の膜融合効率を決定する。種々の神経細胞が独自のシナプス小胞の膜融合効率を持つことにより、多様な神経回路を形成し、脳高次機能の発現に寄与すると考えられる。

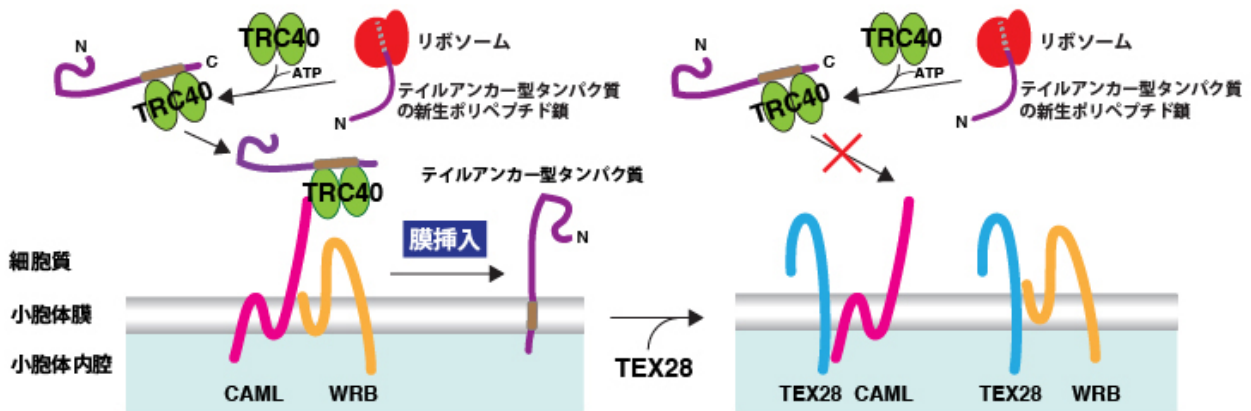


図5. TEX28によるCAML-WRB複合体形成機構のモデル。
詳しくは本文考察参照。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科膜動態学分野の山本泰憲である。

文献

- 1) Yamamoto, Y. & Sakisaka, T. : Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Mol. Cell*, **48** : 387-397, 2012.
- 2) Zhang, C., Kho, Y. S., Wang, Z., Chiang, Y. T., Ng, G. K., Shaw, P. C., Wang, Y. & Qi, R. Z. : Transmembrane and coiled-coil domain family 1 is a novel protein of the endoplasmic reticulum. *PLoS One*, **9** : e85206, 2014.