

(続紙 1)

京都大学	博士 (工 学)	氏名	瓜 生 幸 嗣
論文題目	Biochemical and biophysical characterization of Ca^{2+} channel complexes in neurotransmission (神経伝達に関わる Ca^{2+} チャネル複合体の生化学・生物物理学的解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>Ca^{2+}はセカンドメッセンジャーとして、その細胞内濃度上昇が、神経伝達物質放出、細胞興奮性、軸索伸長など、様々な応答の引き金となる。本論文は序論、本論4章、結論から構成され、神経伝達における、Ca^{2+}チャネルの役割と、機能・発現制御機構の解明を目指して、未知であった Ca^{2+}チャネル分子とシナプス小胞の距離制御機構の解明 (第1章、第2章)、新規相互作用分子の発見による Ca^{2+}チャネル制御機構の解明 (第3章)、及び、網膜の ON 双極細胞の後シナプス部で細胞興奮性を惹起する Ca^{2+}チャネルの分子実体同定と制御機構解析に取り組んでいる (第4章)。</p> <p>序論では、細胞内における Ca^{2+}イオンの重要性、Ca^{2+}チャネルの説明と先行研究の現状、及び本研究の意義などがまとめられている</p> <p>第1章では、神経前シナプスの伝達物質放出部位のアクティブゾーンにおいて Rab3-interacting molecule 1α (RIM1α)と電位依存性 Ca^{2+}チャネルの β サブユニットが相互作用することを証明している。RIM1α と β サブユニットの相互作用は、もう一方のシナプス小胞上の Rab3 タンパク質と RIM1α の相互作用と協調的に働いて、電位依存性 Ca^{2+}チャネルにシナプス小胞をつなぎとめることを明らかにしている。また、この相互作用によって、電位依存性 Ca^{2+}チャネルの不活性化が阻害され、Ca^{2+}流入が持続することを明らかにしている。これら二つの機能を通して、RIM1α-β サブユニット複合体は、神経伝達物質放出の効率を増強させていることが示唆されている。</p> <p>第2章では、RIM1α の C 末端に対応する配列だけを持つ γ-RIM (RIM3γ、 RIM4γ)の機能を解析している。γ-RIM を含む全ての RIM タンパク質(RIM1α、RIM2α、RIM3γ、RIM4γ)が β サブユニットと結合し、Ca^{2+}チャネルの電位依存性不活性化を抑制することを明らかにしている。また、この共通の機能によって、RIM タンパク質は、PC12 細胞のアセチルコリン放出を促進する事をも明らかにしている。一方で、シナプス小胞と結合するのに必要な Rab3 結合部位や他の構造上のモチーフを持たないことから、γ-RIM はドミナントネガティブ的作用を示し、神経伝達物質を含む小胞の膜直下への集</p>			

積を阻害する点において α -RIM と異なることを示している。実際、培養小脳顆粒細胞において、 γ -RIM の shRNA による発現阻害は、 α -RIM のそれほどにはグルタミン酸放出を抑制しないことを明らかにしている。 γ -RIM は α -RIM 同様に中枢神経系に広く分布するが、これらの結果は、RIM タンパク質群による Ca^{2+} 流入の持続は神経細胞に普遍的な性質であるが、一方、 Ca^{2+} チャネル近傍へのシナプス小胞の局在制御は α -RIM による促進と γ -RIM による抑制の競合によって制御されていることを示唆している。

第3章では、前シナプス膜と小胞膜の融合を担仲介するタンパク質である SNARE タンパク質群と相互作用し、神経伝達物質放出を制御する Munc18 タンパク質が、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの β サブユニットと相互作用することを明らかにしている。Munc18 は、4 種類ある β サブユニットの β_{1a} 、 β_3 、 β_{4b} に特異的に結合し、 β_3 、 β_{4b} と結合した場合には、チャネルの不活性化を促進することを明らかにしている。これが、RIM タンパク質とは逆の制御であることから、前シナプス膜にシナプス小胞膜が融合する一連の過程において、 β サブユニットの相互作用パートナーが切り替わる Ca^{2+} チャネル複合体の動的な面を示唆している。

第4章では、網膜の ON 双極細胞に存在し、視細胞から放出されるグルタミン酸によって制御されるカチオンチャネルの分子実体、及び制御のメカニズムを明らかにしている。組み換え発現系を用いた電気生理実験によって、受容体刺激に対する応答、イオン透過性、シングルチャネルとしての性質などから、transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーに属する TRPM1 がその分子実体であることを証明している。また、グルタミン酸受容体からのシグナルによって活性状態になった $G\alpha$ サブユニットが、直接的にチャネルの活性を抑制するという制御メカニズムも発見している。

結論では本論文で得られた成果について要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、神経細胞における、電位依存性 Ca^{2+} チャネルとシナプス小胞の距離制御機構の解明、新規相互作用分子の発見による新たな電位依存性 Ca^{2+} チャネル制御機構の解明、及び、細胞興奮性を惹起する Ca^{2+} チャネルの分子実体同定及び、制御機構解析を遂行した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

神経前シナプスのアクティブゾーンにおいて、シナプス小胞と電位依存性 Ca^{2+} チャネルの間の空間上の関係は厳密な制御を受けると考えられているが、分子メカニズムは未知であった。**Rab3-interacting molecule (RIM)**ファミリーのタンパク質と Ca^{2+} チャネルの β サブユニットが結合することを発見し、 β サブユニット結合領域のみを持つ γ -RIM と、シナプス小胞と結合する領域を併せ持つ α -RIM の競合によって、小胞と電位依存性 Ca^{2+} チャネルの空間的な関係が調節されることを明らかにしている。

プレシナプスの電位依存性 Ca^{2+} チャネルの相互作用タンパク質による活性制御は伝達物質放出に重要である。**RIM** タンパク質が、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの不活性化を抑制することを示している。また、新規相互作用分子である **Munc18** が、逆に、不活性化を促進することを明らかにしている。

網膜の ON 双極細胞に存在し、視細胞から放出されるグルタミン酸によって制御されるカチオンチャネルの分子実体は未知であった。組み換え発現系を用いた電気生理実験によって、その分子実体を同定し、受容体からのシグナルによる制御メカニズムも明らかにしている。

以上、本論文では、神経伝達物質放出を引き起こす Ca^{2+} チャネル分子複合体の新規構成タンパク質の同定・機能解析、及び、細胞興奮性を惹起する Ca^{2+} チャネルの制御機構解析が行われている。得られた成果は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 8 月 10 日、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。