

論文題名

Localization of synaptotagmin IV at the Golgi and vesicle/organelle located in the neurites

ゴルジ体及び神経突起内の小胞又は小器官に局在するシナプトタグミンIV分子の解析

指導教官 御子柴克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

井端啓二

(目的)

我々の体を構成する細胞は数多くの膜系（細胞内小器官）より成り立っており、その間のやりとりは小胞膜輸送により行われている。小胞輸送には構成的なものと調節的なものの2種類が存在しており、その基本的輸送メカニズムにSNAREタンパク質が重要な役割を果たしている。最近SNAREタンパク質だけで構成的な膜融合を起こすことが明らかにされつつあるが、調節的な膜融合にはSNAREタンパク質以外のタンパク質が不可欠であると考えられている。例えば、カルシウム依存的な神経伝達物質の放出を例にとると、シナプトタグミンI(Syt I)と呼ばれるタンパク質がシナプス小胞上に存在し神経伝達物質放出の際のカルシウムセンサーとして働きシナプス小胞とプレシナプス膜との膜融合を制御することが知られている。

シナプトタグミンファミリーはマウスにおいて12種類のアイソフォームが存在しており、このうちSyt Iに関しては詳細に解析されているが、他のアイソフォームに関してはその局在、機能がほとんど明らかになっていない。シナプトタグミンファミリーの1つであるシナプトタグミンIV (syt IV)は膜脱分極刺激によりmRNA量が増大するimmediate early geneとしてクローニングされたが、その局在、機能に関してはこれまで全く明らかではなかった。従って本実験ではまず、Syt IVに対する特異的な抗体を作製し、PC12細胞および海馬初代培養細胞におけるSyt IVの局在、また免疫電顕法を用いて発達期のマウスの脳切片におけるSyt IVの局在を検討した。特にSyt IVは神経特異的に発現することからシナプス小胞上に存在するSyt Iの局在との違いに重点をおいて観察を行った。さらに高カリウム刺激やフォルスコリン刺激によるSyt IVのタンパク質量及び局在の変化についても検討を行った。

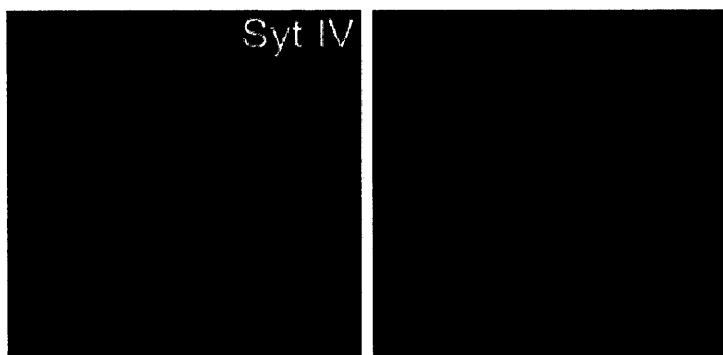
(結果と考察)

Syt IVのC2Aドメインに対する抗体を作成した結果、この抗体 (anti-Syt IV) はSyt IVアイソフォームだけを特異的に認識する事が明らかになった。この抗体を用いてPC12細胞および未成熟な海馬初代培養細胞を免疫染色したところ細胞体の核の近傍の構造物及び神経突起の先端の小胞または小器官に局在することが判明した。また、成熟した海馬初代培養細胞では核の近傍の構造物にはSyt IVは良く発現していたが、樹状突起、軸索ではあまり発現が見られなかった。核の近

傍の構造物においてはSyt IVはトランスゴルジネットワーク (TGN) のマーカーであるTGN38とよく共在していたが、免疫染色を用いた実験ではゴルジ体、TGN及びエンドソームを正確に区別することが困難なので、以下の2種類の薬剤を用いてSyt IVが局在する核の近傍の構造物の同定を試みた。ゴルジ体とTGNを分離する薬剤、プレフェルジンAを用いた場合、Syt IVとTGNのマーカーであるTGN38は共在しなかった。また、エンドソームとゴルジ体+TGNを分離する薬剤ワートマニンを用いた場合、Syt IVとTGN38は共在したままであった。これに対し、ゴルジ体に局在するGOS28とSyt IVはプレフェルジンAを投与した後も共在していた。従ってanti-Syt IVで染色される核の近傍の構造物はゴルジ体であると結論できた (Fig. 1.)。

Fig. 1.

PC12 cells



Syt IVはゴルジ体に局在していた。

PC12細胞および未成熟な海馬初代培養細胞ではSyt IVは突起の先端にも局在するが、Syt Iも突起の先端のシナプス小胞と有芯小胞に局在することが知られている、そこで、Syt IVとSyt Iの共染色をおこなったところ、神経突起の先端においてほとんどは共在しなかった (Fig. 2.)。また、脳組織より調製したシナプス小胞画分にはSyt IVは存在していなかった。従って、Syt IVはSyt Iとは異なり通常のシナプス小胞及び有芯小胞の融合には関与していないと推察された。

Fig. 2.

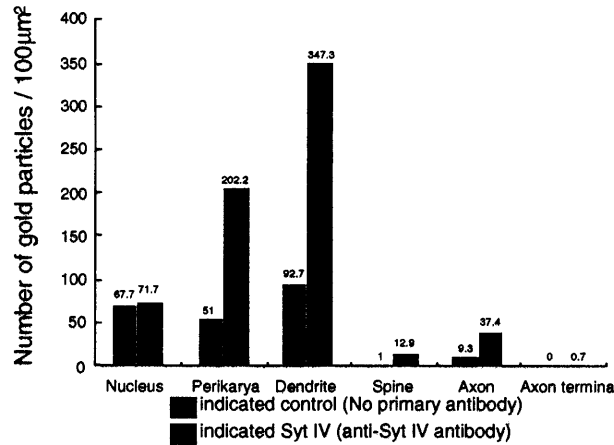
NGF-treated PC12 cells



Syt IVはSyt Iはほとんど共在しなかった。

Syt IVは発達過程の脳内で顕著に発現していたので、発達期のマウスの脳切片の免疫組織染色を行ったところ、大脳新皮質の2/3層と5層及び海馬のCA3とCA1領域で良く発現していることが明らかになった。特に大脳新皮質の2/3層と5層においてもっとも強い発現が見られたのでこの領域について金コロイドを用いた免疫電顕を行った。その結果、Syt IVのシグナルは細胞体のゴルジ体、軸索、樹状突起、及びスパン内局在した(Fig. 3.)。固定による膜の保存性の問題が有り全ての金コロイド粒子が膜系に局在しているわけではなかったが、いくつかのシグナルは樹状突起内の小胞又は小器官に局在していた(Fig. 4)。これに対し、神経終末のシナプス小胞のシグナルは皆無に等しかった。従って、培養細胞だけでなく脳組織においてもSyt IVはゴルジ体と神経突起内の小胞又は小器官に局在することが明らかになった。以上の結果からSyt IVはゴルジ体と神経突起内の小胞又は小器官の両方で調節的な膜輸送に関わっていると考えられる。

Fig. 3.



免疫電顕の結果、生後6日齢のマウスの大脳新皮質II/IIIとV層においてSyt IVはゴルジ体、樹状突起、軸索に局在していた。

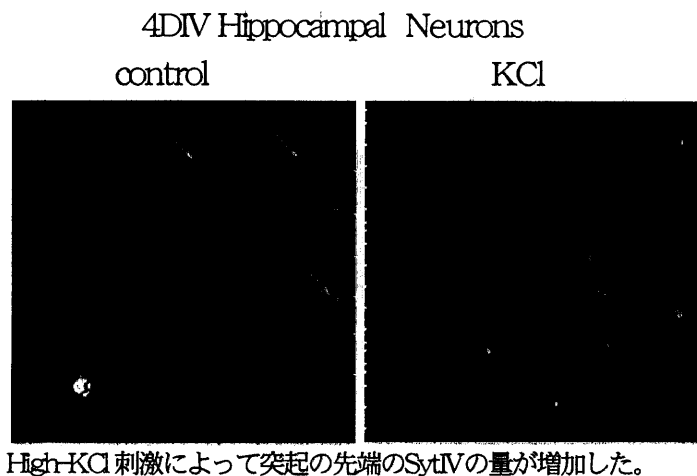
Fig. 4.



Syt IVは突起内の小胞又は小器官に局在していた。

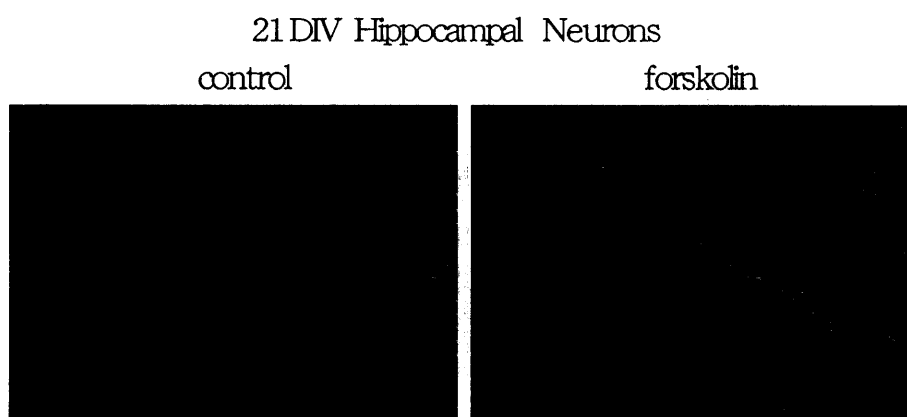
*syt IV*はimmediate early geneであり、神経活動によってその発現が調節されている。そこで高カリウム及びフォルスコリン刺激によるSyt IVのタンパク質量及び局在の変化について検討した。その結果、両刺激の投与5時間後にSyt IVのタンパク質量がそれぞれ6倍及び10倍増加していた。この増加はプロテインキナーゼAの阻害剤で抑えられた。さらに、高カリウム又はフォルスコリン刺激後の細胞ではタンパク増加に伴ってゴルジ体と神経突起内のSyt IVが増加していた(Fig. 5.)。成熟した海馬初代培養細胞では通常anti-Syt IVで神経突起内のSyt IVを検出できなかったが、フォルスコリン刺激によって神経突起内の小胞又は小器官上でSyt IVが顕著に増加していた(Fig. 6.)。

Fig. 5.



High-KCl 刺激によって突起の先端のSyt IVの量が増加した。

Fig. 6.



Forskolin 刺激によって突起内の小胞又は小器官に局在するSyt IVの量が増加した。

本研究により、Syt IVはゴルジ体と神経突起内の小胞又は小器官に局在することが明らかになった。Syt Iとは共在しないことから、Syt IVはシナプス小胞と有芯小胞以外に存在する初めての神経特異的シナプトタグミンアイソフォームであることが示された。高カリウム及びフォルスコリン刺激によるSyt IVの増加にはプロテインキナーゼAが関与していることから、Syt IVはプロテインキナーゼAもしくはcAMP依存的な神経の可塑的変化に関与している可能性が考えられる。Syt IVを含んでいる小胞または小器官の性質（カーゴ分子など）はまだ明らかになっていないが、Syt IVはゴルジ体から突起の先端に輸送される小胞または小器官の、出発点であるゴルジ体からの出芽または終点である突起の形質膜との融合に関わっているものと推察している。