

審査の結果の要旨

氏名 井端啓二

本研究は調節的な膜輸送に関与していると考えられているタンパク質であるシナプトタグミンファミリーのアイソフォームの一つであるシナプトタグミンIV (Syt IV) の神経細胞に於ける細胞内局在、及び細胞への刺激によるSyt IVの発現、局在の変化を明らかにするために、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、発達期のマウスの脳切片におけるSyt IVの局在を、シナプス小胞と有芯小胞上に存在するが知られているSyt Iとの比較に重点を置いて検討、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試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Syt IV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示された。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、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、樹状突起、軸索ではあまり発現が見られない事が示された。
2. Syt IVが局在する核の近傍の構造物の同定が試みられた。ゴルジ体とトランスゴルジネットワーク(TGN)を分離する薬剤、ブレフェルジン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は共在していた。そして、ゴルジ体に局在するGOS28とSyt IVはブレフェルジン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された。
3. 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共在しない事が示された。また、脳組織より調製したシナプス小胞画分にはSyt IVは存在しない事が示された。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。

4. 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事が示された。大脳新皮質の2/3層と5層の領域について金コロイドを用いた免疫電顕を行ったところ、Syt IVのシグナルは細胞体のゴルジ体、軸索、樹状突起、及びスパイン内に局在しており、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る事が示された。これに対し、神経終末のシナプス小胞で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事が示された。

5. 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のタンパク質量が増加する事が示された。この増加はプロテインキナーゼAの阻害剤によって抑えられる事が示された。さらに、タンパク増加に伴ってゴルジ体と神経突起内のSyt IVが増加する事が示された。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が顕著に増加する事が示された。

以上、本論文で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。ゴルジ体は細胞にとって基本的な細胞内小器官である。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事が示された。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が関与していた事から、Syt IVはプロテインキナーゼAもしくはcAMP依存的であると考えられている長期的な神経の可塑的变化に関与している可能性が考えられる。本研究は、神経活動依存的に調節される細胞内膜輸送の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。