

論文内容の要旨

論文題目 キナーゼによる分泌小胞開口放出制御機構の研究

氏名 森 靖典

脱分極によるシナプスからの神経伝達物質放出は細胞外の様々な刺激によって制御されていることが明らかになっており、この制御過程がシナプス可塑性を説明する機構の一つである可能性が高いと考えられている。従って、開口放出の制御機構を研究することは神経回路の可塑性の理解にも必須であると考えられる。しかし、細胞外の刺激がどのような分子機構により開口放出機構を制御しているかについては未だ多くの部分が解明されていない。キナーゼは細胞内シグナル伝達の様々な生理現象を制御していることから、開口放出過程への制御にキナーゼによるリン酸化反応が重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで本研究では、開口放出制御におけるキナーゼの働きに注目しその機能を明らかにすることを目的にして研究を行った。

1. NGF による JNK を介した分泌小胞開口放出の制御

本研究では分泌小胞の開口放出を解析する細胞系として PC12 を用いた。PC12 細胞は大型有芯小胞よりカルシウム依存的にペプチド性の伝達物質およびホルモンを放出することが知られており開口放出のモデル系として用いられている。そこでニューロペプチド Y と改変型 YFP の一種である Venus の融合タンパク質 (NPY-Venus) を PC12 細胞に安定的に発現させ、脱分極により開口放出を誘導して培地中に放出される NPY-Venus の量を培地中の蛍光強度を測定することにより定量化する系を作成した。もしくはヒト成長ホルモンを PC12 細胞に一過的に発現させ、脱分極により開口放出を誘導して培地中に放出されるヒト成長ホルモンの量をウェスタンブロットにより検出して定量する系も併用した。

NGF は PC12 細胞において脱分極依存的な開口放出を促進することが報告されているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。本研究では NGF 刺激で活性化するキナーゼの一つである

JNK が線虫において神経機能に関与することが報告されていることから、JNK 経路が開口放出に関与する可能性を考え検証することにした。まず、NGF による開口放出の促進に JNK 経路が必要かを検討した。NGF 刺激により NPY-Venus の放出が促進されたが、この時培地中に JNK 阻害剤 SP600125 をあらかじめ加えておくと開口放出が抑制された。また JNK の活性化を阻害する JBD の過剰発現によっても NGF による NPY-Venus 放出の促進が抑制された。従って NGF による開口放出の促進に JNK 経路が必要であることが示された。次に NGF 刺激を行わなくても JNK 経路を活性化すれば開口放出が促進されるかを検討した。JNK の上流のキナーゼである MKK7 の活性化型を発現させたところ NPY-Venus の放出量が上昇した。従って JNK 経路を活性化するだけで開口放出が促進されることが示された。

前述の結果から JNK 経路が開口放出の促進に重要な役割を果たすことが示された。次に JNK がどのような基質を制御することにより開口放出を制御するかを検討した。JNK の新たな結合分子を同定するために two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、その結果 Synaptotagmin IV (Syt IV) をコードしているクローンが得られた。Synaptotagmin は小胞膜に局在する一回膜貫通型タンパク質でカルシウム依存的な細胞膜と小胞膜の融合に関与していることから、JNK が開口放出を促進する際の基質である可能性を考え検討した。まず、JNK と Syt IV が直接結合しうることが GST-pull down 法により明らかになった。PC12 細胞内でも内在性の JNK と Syt IV が結合していることを免疫共沈法により確認した。

次に、JNK が Syt IV をリン酸化している可能性を調べたところ、リコンビナント Syt IV を活性化型 JNK が *in vitro* で効率よくリン酸化することがわかった。さらに Syt IV のリン酸化部位を同定するためにリン酸化される可能性のある配列に変異を挿入した。すると、Ser135 を Ala に変異させることで JNK によるリン酸化が減少した。そこで Syt IV のリン酸化 Ser135 を特異的に認識する抗体を作成して検討を行ったところ、NGF 刺激により Syt IV の Ser135 のリン酸化は上昇し、かつ JBD の発現によりその上昇が抑制された。従って NGF の下流で JNK は Syt IV の Ser135 をリン酸化していることが示唆された。

次に Syt IV の Ser135 が Syt IV による開口放出の促進に重要かを検討した。その結果、PC12 細胞に野生型の Syt IV を発現させた細胞ではコントロール細胞に比べて脱分極による NPY-Venus およびヒト成長ホルモンの放出が促進されたが、Ser135 を Ala に置換した Syt IV を発現している細胞では開口放出の促進は起こっていなかった。従って Syt IV の開口放出機能には Ser135 が

重要であることが示唆された。

さらに Syt IV が NGF による開口放出の促進に必要かどうかを RNA 干渉法を用いて検討した。その結果、コントロール siRNA を発現した細胞では脱分極によるヒト成長ホルモンの放出が NGF 刺激によって上昇したが、Syt IV の発現を抑制する siRNA を発現した細胞では NGF 刺激による開口放出の促進は起こらなかった。従って NGF による開口放出の促進に Syt IV が必要であることが示唆された。

PC12 細胞において Syt IV は NGF 刺激依存的に未成熟小胞から成熟小胞へと局在を変えることが報告されている。そこで一つの仮説として、NGF は JNK を介して Syt IV をリン酸化することにより未成熟小胞から成熟小胞への局在移行を制御している可能性を考えた。この仮説を検証するために NGF 刺激による Syt IV の局在移行における JNK の必要性について検討した。PC12 細胞に NGF 刺激を行い、Syt IV 抗体、成熟小胞マーカーである Rab3、ゴルジ体もしくは未成熟小胞のマーカーである Syntaxin6 で細胞染色を行い局在を観察した。その結果 NGF 刺激をした細胞では一部の Synaptotagmin IV がゴルジ体もしくは未成熟小胞から細胞膜近傍に局在を移行していることが確認された。この領域は Rab3 が局在している領域であることから、成熟小胞に移行した Syt IV であると考えられる。このとき JBD を発現している細胞に NGF 刺激をした場合には細胞膜近傍への Syt IV の局在移行はほとんど見られなかった。従って NGF による Syt IV の細胞膜近傍への局在移行に JNK が必要であることが示された。

2. A2A-アデノシン受容体による PKA と PI3-kinase を介した開口放出の制御

これまでに A2A-アデノシン受容体が PC12 細胞において開口放出を促進するかどうかは不明であった。そこで A2A 受容体の特異的に活性化させるアゴニストである CGS21680 を用いて開口放出の制御について検討した。その結果 CGS21680 の量依存的に脱分極による NPY-Venus の放出が促進された。CGS21680 の刺激を時間経過を追って検討した結果、CGS21680 刺激開始後 10 分から 15 分の間で特に開口放出の促進が顕著に起こっていることが判明した。一方、CGS21680 刺激によりどのような細胞内シグナルが活性化するかを検討した結果、CGS21680 刺激後 10 分から 15 分をピークに、これまで報告されている MAPK, CREB のリン酸化に加え、JNK, p38, AKT, ATF-2 のリン酸化の亢進が見られた。さらに PKA 阻害剤 KT5720 と PI3-キナーゼ阻害剤 LY294002 を共に加えることによって、有為に CGS21680 の刺激による開口放出の促進が抑制されることがわかった。従って A2A-

アデノシン受容体の活性化による脱分極依存的な開口放出の促進には部分的に PKA と PI3-Kinase の活性が必要であることが示唆された。

次に A2A-アデノシン受容体がどのような機構で開口放出の促進しているのかを検討した。CGS21680 刺激後、PC12 細胞内での NPY-Venus を含む小胞の局在を時間経過を追って観察した。その結果 NPY-Venus は CGS21680 の刺激をしていない状態では主に細胞質に存在しているが、CGS21680 刺激後 10 分から 15 分の間に NPY-Venus が細胞膜近傍により多く局在していることが明らかになった。従って、A2A 受容体の活性化により NPY-Venus を含む小胞の局在が細胞膜近傍に移行することが示された。

結論

前半の結果から、NGF による開口放出の促進には JNK 活性と Syt IV が必要であり、かつ NGF は JNK 依存的に Syt IV の Ser135 をリン酸化すること、また Syt IV の開口放出促進機能には Ser135 が必要であること、さらに NGF 刺激による Syt IV の局在移行は JNK 依存的事であることが明らかになった。これらの結果から NGF は JNK を介して Syt IV をリン酸化し、リン酸化された Syt IV は未成熟小胞から成熟小胞に局在を移行させることにより開口放出が促進されるというモデルを考えている。

また後半の結果から A2A アデノシン受容体の活性化による脱分極依存的な開口放出の促進には PKA と PI3-キナーゼの経路の活性化が重要であること、およびこの時 NPY-Venus を含む小胞が細胞膜近傍に局在移行していることが明らかになった。現在、PKA もしくは PI3-kinase の経路の活性化が NPY-Venus を含む小胞を細胞膜近傍に移行させるというモデルを検証中である。