

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 深 津 和 美

本研究は神経細胞樹状突起におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP₃)受容体タイプ 1(IP₃ 受容体 1)の動態とその制御機構を明らかにするため、ラット海馬の初代培養神経細胞に、IP₃ 受容体 1 の GFP 融合タンパク質を発現させ、共焦点顕微鏡下で蛍光退色後回復法(FRAP 法)により解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. ラット海馬の初代培養神経細胞に、IP₃ 受容体 1 の GFP 融合タンパク質を発現させ、樹状突起の小胞体膜上における IP₃ 受容体 1 の側方拡散を、共焦点顕微鏡下で蛍光退色後回復法(FRAP 法)により観察した。比較対照として小胞体膜上の Ca²⁺ポンプである SERCA の GFP 融合タンパク質も同様に観察した結果、IP₃ 受容体 1、SERCA 共に小胞体膜上を拡散していることが分かった。またこれまで二次平面での小胞体膜上のタンパクに対して使われてきた拡散定数の計算式を、神経細胞の樹状突起という管状の構造に適用する新しい解析方法を確立し、IP₃ 受容体 1、SERCA の拡散定数を求めた。その結果 IP₃ 受容体 1 の拡散定数は SERCA に比べて有意に小さいことが示された。
2. IP₃ 受容体 1 の拡散定数は SERCA に比べて有意に小さいことから、IP₃ 受容体 1 の拡散制御には細胞骨格が関与している可能性を考え、微小管を脱重合させる薬剤処理を行った所、IP₃ 受容体 1、SERCA 共に拡散定数が減少した。これより微小管は小胞体膜上のタンパクの動態に関与する可能性が示唆された。またアクチンの関与について解析した所、IP₃ 受容体 1 の拡散定数はアクチンを脱重合すると増加し、安定化すると減少する結果が得られた。SERCA については拡散定数の変化は見られなかった。これよりアクチンを介した IP₃ 受容体 1 特異的な拡散制御機構が存在し、アクチンは IP₃ 受容体 1 の拡散を抑制する方向に働いていることが示唆された。
3. アクチンと IP₃ 受容体 1 をつなぐリンカータンパクの候補として、IP₃ 受容体 1 結合タンパクである 4.1N が考えられた。4.1N はアクチン-スペクトリン結合配列を持っており、4.1N の C 末端 (CTD)が IP₃ 受容体 1 の C 末端細胞質内領域に結合する。そこで 4.1N が IP₃ 受容体 1 の拡散に関与しているか明らかにするために、IP₃ 受容体 1 との結合領域は持っているが、アクチン-スペクトリン結合配列を欠損させたドミナントネガティブ型(4.1N-CTD)を作成し、海馬神経細胞に IP₃ 受容体 1 と共発現させた。

その結果、IP₃受容体 1 の拡散定数が増加したことから、4.1N が IP₃受容体 1 の拡散に関与していることが示唆された。

4. IP₃受容体 1 の 4.1N 結合配列である IP₃受容体 1 の C 末端 14 アミノ酸(CTT14aa)が拡散制御に関与しているかどうか検討した。IP₃受容体 1 の CTT14aa を欠損したミュータントは、IP₃受容体 1 よりも拡散定数が有意に大きいことが分かった。また CTT14aa 配列のペプチドを過剰発現させると、IP₃受容体 1 の拡散定数が有意に増加した。さらに IP₃受容体のサブタイプの一つである IP₃受容体 3 は 4.1N には結合しないことが明らかとなっていることから、IP₃受容体 3 についても解析を行ったところ、IP₃受容体 3 の拡散定数は IP₃受容体 1 に比べて有意に大きいことが明らかとなった。次に IP₃受容体 3 に CTT14aa をつないだキメラタンパク (IP₃受容体 3-CTT14aa) を作成した。IP₃受容体 3-CTT14aa は、4.1N と結合する性質を持つようになり、拡散定数が IP₃受容体 1 と同程度まで減少した。またアクチンの脱重合実験により、IP₃受容体 3-CTT14aa の拡散定数は有意に増加した。これより CTT14aa は IP₃受容体 1 の拡散制御に関与していることが示された。
5. IP₃受容体 1 の 4.1N 結合配列として CTT14aa 以外に C 末端細胞質内中間領域(CTM1) が報告されており、この配列が IP₃受容体 1 の拡散制御に関与しているかどうかを検討した。CTM1 配列のペプチドを過剰発現させると CTT14aa 配列の過剰発現実験と同様に、IP₃受容体 1 の拡散定数が有意に増加した。

以上、本論文は、神経細胞樹状突起において小胞体膜上の膜タンパクである IP₃受容体 1 は、その拡散が制御されていること、またその制御にはアクチン骨格系が関与しており、さらに IP₃受容体 1 結合タンパクとして同定された 4.1N がアクチンと IP₃受容体 1 をつなぐリンカータンパクとして働いていることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、小胞体膜上の膜タンパクの拡散制御機構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。