

## 論文内容の要旨

# ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ $\gamma$ による シナプス小胞回収制御機構

中野亜希子

シナプス伝達は神経終末端のシナプス小胞から開口放出される神経伝達物質によって媒介される。伝達物質を放出後、空になった小胞の一部はクラスリンを介したエンドサイトーシスにより回収され再利用される。これによって、シナプス伝達が恒常的に維持される。クラスリン依存性エンドサイトーシスには細胞膜を構成する微量なリン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) が重要な役割を果たしている。PIP<sub>2</sub>は、クラスリン被覆小胞を形成するAP-2 (Adaptor protein complex-2) 複合体などのエンドサイトーシス関連分子と直接結合し、エンドサイトーシス部位にこれらの分子をリクルートすることでクラスリン依存性エンドサイトーシスを正に制御する。したがってシナプス小胞の回収において、刺激に応じた局所的PIP<sub>2</sub>産生が重要であることが示唆されるが、その詳細なメカニズムは不明である。PIP<sub>2</sub>は主にホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) によりホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP) のイノシトール環 5 位がリン酸化されて産生される。PIP5Kには $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の 3 種類のアイソザイムが存在する。本研究において、脳に高い発現が認められるPIP5K $\gamma$  アイソザイムの相互作用分子として、エンドサイトーシスにおける重要な分子AP-2 複合体を同定し、この相互作用がシナプス小胞の回収に重要な役割を果たすことが見出されている。

## [結果]

### 1. PIP5K $\gamma$ はそのC末端領域を介してAP-2 複合体と相互作用する

PIP5K とシナプス小胞回収に関与するエンドサイトーシス関連分子との相互作用を検討するため、特に脳に高発現している PIP5K のアイソザイムである PIP5K $\gamma$  に特異的な抗体を用いてマウス脳抽出画分から免疫沈降を行った。その結果、PIP5K $\gamma$  共沈画分に AP-2 複合体を見出した。AP-2 複合体は  $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2,  $\sigma$ 2 アダプチンからなるヘテロ四量体である。PIP5K $\gamma$  と結合するサブユニットを同定するため、各アダプチンサブユニットのリコンビナントタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行った結果、 $\beta$ 2 アダプチンが PIP5K $\gamma$  と直接結合することが確認された。また、 $\beta$ 2 アダプチンは AP-2 複合体の核を構成する N 末端領域、他のエンドサイトーシス分子とも結合する Ear 領域、二つの領域をつなぐ Hinge 領域からなるが、 $\beta$ 2 アダプチンは Ear 領域を介して PIP5K $\gamma$  と結合することを見出した。さらに、 $\beta$ 2 アダプチンとの相互作用は PIP5K の 3 種類のアイソザイムのうち PIP5K $\gamma$  特異的であること、PIP5K $\gamma$  の  $\beta$ 2 アダプチンとの結合領域は PIP5K アイソザイム間で保存性のない PIP5K $\gamma$  の C 末端領域であることを同定した。以上の結果と、PIP5K $\gamma$  は脳特異的アイソザイムであることから、神経細胞において PIP5K $\gamma$  が AP-2 複合体と結合することが示された。

### 2. $\beta$ 2 アダプチンは PIP5K $\gamma$ を *in vitro* で活性化する

PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体の結合が PIP5K $\gamma$  の酵素活性に与える影響を検討した。PIP5K $\gamma$  をリコンビナント  $\beta$ 2 アダプチンとインキュベートすると、PIP<sub>2</sub> 産生が約 10 倍上昇した (Fig. 1)。さらに、PIP5K $\gamma$  との結合領域である  $\beta$ 2 アダプチンの Ear 領域も PIP5K $\gamma$  の活性を上昇させた。一方、コントロール GST、PIP5K $\gamma$  とは結合しない  $\beta$ 2 アダプチンの N 末端領域および Hinge 領域は PIP5K $\gamma$  の酵素活性に影響を与えなかった。以上の結果から、AP-2 複合体との結合により PIP5K $\gamma$  の酵素活性が上昇することが示された。

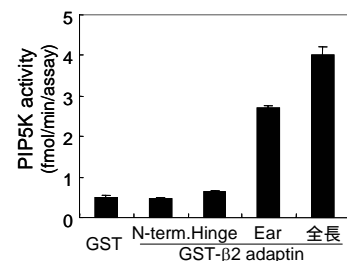


Fig. 1  $\beta$ 2 アダプチンは *in vitro* で PIP5K $\gamma$  を活性化する

### 3. PIP5K $\gamma$ と AP-2 複合体の結合は Cdk5 による PIP5K $\gamma$ の Ser645 のリン酸化により阻害される

クラスリン依存性エンドサイトーシスはエンドサイトーシス関連分子のリン酸化により制御されていることがすでに報告されている。特に、神経細胞においてはアンフィファイシン、ダイナミン、AP-180 など多くのエンドサイトーシス関連分子は神経特異的キナーゼである Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) によりリン酸化され機能が抑制されている。神経細胞が興奮して脱分極すると神経伝達物質が放出されると同時に、これらの分子が脱リン酸化されることによりクラスリン被覆小胞を形成し、クラスリン依存性エンドサイトーシスによりシナプス小胞が回収される。そこで私は PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体の結合がリン酸化/脱リン酸化の制御を受けている可能性を検討した。PIP5K $\gamma$  は SDS-PAGE 上でリン酸化によるものと思われるダブレット

バンドとして検出された (Fig. 2a)。実際、脱リン酸化酵素を用いた実験から SDS-PAGE 上で移動度の遅い PIP5K $\gamma$  のバンドは PIP5K $\gamma$  の Ser/Thr リン酸化によるものであることが示された。さらに、プルダウンアッセイによる結合実験の結果、PAGE 上で移動度の速い非リン酸化型の PIP5K $\gamma$  のバンドのみが  $\beta$ 2 アダプチンと結合することを見出した (Fig. 2a)。PIP5K $\gamma$  の AP-2 複合体との結合領域には Cdk5 によってリン酸化される Ser645 残基が存在する。そこで、HEK293T 細胞において PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体の結合に対する Cdk5 による PIP5K $\gamma$  のリン酸化の影響を検討した。その結果、Cdk5 共発現により非リン酸化型 PIP5K $\gamma$  のバンドが減少し、PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体との結合は抑制された (Fig. 2b)。さらにリン酸化擬似変異体 PIP5K $\gamma$ S645E を用いて結合実験を行った結果、PIP5K $\gamma$ S645E 変異体と  $\beta$ 2 アダプチンとの結合が顕著に阻害されることを見出した。以上の結果より、PIP5K $\gamma$  は Cdk5 により Ser645 残基がリン酸化され AP-2 複合体との結合が抑制されることが示された。

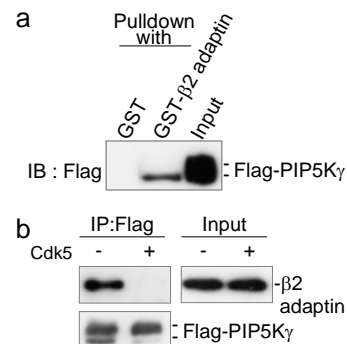


Fig. 2 PIP5K $\gamma$ はCdk5によりリン酸化され AP-2複合体との結合が阻害される

#### 4. 海馬神経細胞において脱分極刺激によりPIP5K $\gamma$ は脱リン酸化されAP-2 複合体と結合する

神経細胞内における PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体の結合制御を検討するため、内在性 PIP5K $\gamma$  が高発現している初代培養海馬神経細胞を用いて解析を行った。その結果、通常リン酸化型で存在する PIP5K $\gamma$  が脱分極刺激により一部脱リン酸化され PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体との結合量が増大した (Fig. 3a)。またカルシウム依存的ホスファターゼであるカルシニューリンの選択的阻害剤シクロスポリン A で処理したところ、脱分極刺激による PIP5K $\gamma$  の脱リン酸化が抑制されたことから、PIP5K $\gamma$ 661 はカルシニューリンにより脱リン酸化されることが示された。さらに間接抗体蛍光法により PIP5K $\gamma$  と AP-2 の細胞内局在の解析を行ったところ、未刺激時には細胞全体に分散して局在する PIP5K $\gamma$  と AP-2 複合体が刺激依存的にシナプスに集積して共局在することが示された (Fig. 3b)。これらの結果から、神経細胞において脱分極刺激依存的に PIP5K $\gamma$  は脱リン酸化されて AP-2 複合体とシナプス上で結合することが示された。

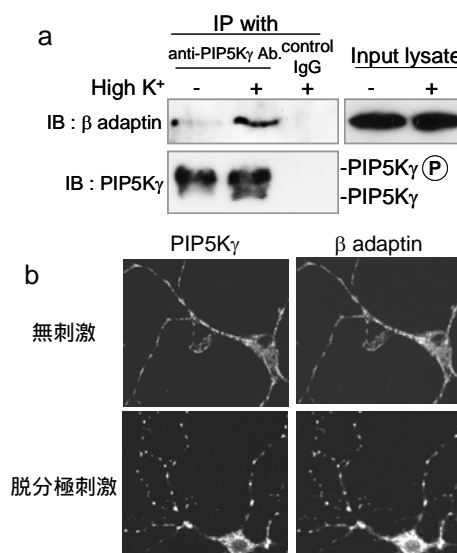


Fig. 3 海馬神経細胞において脱分極刺激によりPIP5K $\gamma$ は AP-2複合体と結合しシナプスに共局在する

#### 5. PIP5K $\gamma$ はAP-2 複合体との結合を介してシナプス小胞回収に参与する

神経細胞におけるシナプス小胞回収に PIP5K $\gamma$  が AP-2 複合体との結合を介して関与する可

能性を蛍光陽イオン性スチリル色素 FM4-64 を用いて検討した。FM4-64 は膜環境下で蛍光を発する脂質プローブであり、神経細胞の脱分極後伝達物質を放出して回収されたシナプス小胞に取り込まれ、蛍光を発する。そこで、PIP5K $\gamma$ の $\beta$ 2 アダプチンとの結合領域である C 末端領域をシンドビスウィルスを用いて海馬神経細胞に過剰発現させ、内在性の PIP5K $\gamma$ と AP-2 複合体との相互作用を阻害したときのシナプス小胞の回収を、取り込まれた FM4-64 の蛍光量を定量することにより検討した。その結果、AP-2 複合体と結合する GFP-PIP5K $\gamma$ C 末端 WT、S645A を過剰発現させたシナプスにおいて FM4-64 の取り込みが低下した。一方、GFP コントロールおよび AP-2 複合体と結合しない GFP-PIP5K $\gamma$ C 末端 S645E を過剰発現させた場合は、シナプス小胞の回収にほとんど影響は見られなかった (Fig. 4)。以上の結果から、神経細胞におけるシナプス小胞の回収に PIP5K $\gamma$ と AP-2 複合体の結合が必要であることが示された。

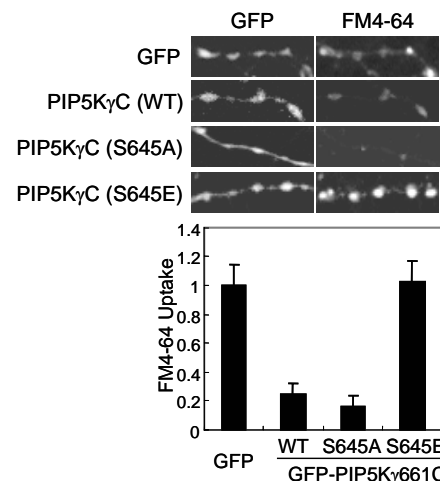


Fig. 4 海馬神経細胞においてPIP5K $\gamma$ C末端領域の過剰発現によりシナプス小胞回収が阻害される

[まとめ]

本研究において私は 1) PIP5K $\gamma$ はAP-2 複合体と結合すること、2)  $\beta$ 2 アダプチンがPIP5K $\gamma$ を *in vitro*で活性化すること、3) PIP5K $\gamma$ とAP-2 複合体の結合はCdk5 によるPIP5K $\gamma$ Ser645 のリン酸化により阻害されること、4) 海馬神経細胞において脱分極刺激時にPIP5K $\gamma$ はカルシニューリンにより脱リン酸化されAP-2 複合体と結合し、シナプスへ集積すること、5) PIP5K $\gamma$ C末端領域の過剰発現によりPIP5K $\gamma$ とAP-2 複合体の結合を阻害すると、シナプス小胞の回収が阻害されることを見出した。これらの結果から、Fig. 5 に示すモデルを提示した。すなわち、神経細胞において定常状態ではPIP5K $\gamma$ はCdk5 によりリン酸化されAP-2 複合体との結合が抑制されている。神経細胞が興奮し脱分極刺激が入るとPIP5K $\gamma$ はカルシニューリンにより脱リン酸化されAP-2 複合体と結合する。この相互作用はPIP5K $\gamma$ を活性化しプレシナプス膜上でPIP<sub>2</sub>産生を上昇させ、シナプス小胞回収を正に制御する。本研究で明らかにされたPIP5K $\gamma$ とAP-2 複合体の相互作用は、刺激依存的に局所的PIP<sub>2</sub>産生を増大させ、シナプス小胞放出部位において速やかにエンドサイトーシスが遂行されるために必須の機構であると考えられる。

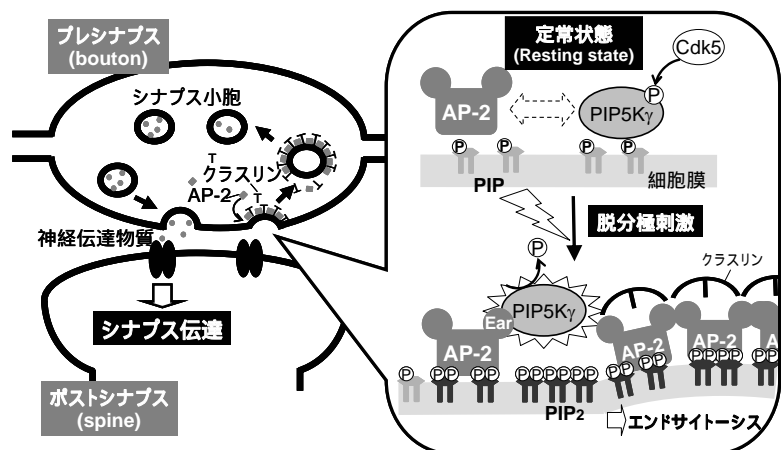


Fig. 5 本研究により提示されるシナプス小胞回収機構モデル