

審査結果の要旨

氏名 中野亜希子

シナプス伝達は、神経終末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が、伝達物質を放出して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って回収され、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-ニリン酸 (PIP₂) が重要な役割を果たしている。PIP₂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PIP₂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。PIP₂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。「ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ によるシナプス小胞回収制御機構」と題する本論文において、脳に高い発現が認められるPIP5K 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回収に重要な役割を果たしている知見を得ている。

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

特に脳に高発現している PIP5K のアイソザイムである PIP5K 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い、PIP5K 共沈降画分に AP-2 複合体を見出した。AP-2 複合体は、2、 μ 2、2 アダプチンからなるヘテロ四量体である。PIP5K 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解析した結果、2 アダプチンが PIP5K と直接結合することが確認された。以上の結果より、PIP5K が AP-2 複合体と結合することが示された。

2. 2 アダプチンは PIP5K を *in vitro* で活性化する

PIP5K と AP-2 複合体の結合が PIP5K の酵素活性に与える影響を検討した。PIP5K をリコンビナント 2 アダプチンとインキュベートすると、PIP₂産生が上昇した。さらに、PIP5K との結合領域である 2 アダプチンの Ear 領域も PIP5K の活性を上昇させた。一方、コントロール GST、PIP5K とは結合しない 2 アダプチンの N 末端領域および Hinge 領域は PIP5K 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 の酵素活性が上昇することが示された。

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

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ており、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、PIP5K 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結果、PIP5K は Ser/Thr リン酸化されており、脱リン酸化体のみが AP-2 複合体と結合することが示された。また、Cdk5 の共発現により非リン酸化型 PIP5K が減少し、PIP5K と AP-2 複合体との結合は抑制された。さらに、リン酸化擬似変異体 PIP5K S645E を用いて結合実験を行った結果、PIP5K S645E 変異体と 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 は Cdk5 によりその 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。

4. 海馬神経細胞の脱分極刺激により PIP5K 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 と AP-2 複合体の結合制御を検討するため、内在性 PIP5K 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。通常リン酸化型で存在する PIP5K は脱分極刺激により一部脱リン酸化され、PIP5K と AP-2 複合体との結合量が増大した。さらに間接抗体蛍光法により PIP5K と AP-2 の細胞内局在の解析をした結果、未刺激時には細胞全体に分散して局在する PIP5K 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。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 は脱リン酸化され、AP-2 複合体とシナプス上で結合することが示唆された。

5. PIP5K は AP-2 複合体との結合を介してシナプス小胞回収に関与する

PIP5K が AP-2 複合体との結合を介してシナプス小胞の回収に関与する可能性を、蛍光陽イオン性スチリル色素 FM4-64 を用いて検討した。PIP5K の 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 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 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 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。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 と AP-2 複合体の結合が必要であることが示唆された。

本論文から、神経細胞におけるシナプス小胞の回収機構について、以下のモデルが提示される。1) 定常状態では PIP5K 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。2) 神経細胞が興奮し脱分極刺激が入ると、PIP5K は脱リン酸化されて AP-2 複合体と結合する。3) この相互作用は PIP5K を活性化し、プレシナプス膜上で PIP₂ 産生を上昇させてシナプス小胞回収を正に制御する。PIP5K と AP-2 複合体の相互作用は、刺激依存的に局所で PIP₂ 産生を増大させ、シナプス小胞放出部位のエンドサイトーシスを速やかに遂行するために必須の機構であると考えられる。本論文はシナプス小胞の回収機構の理解に有用な知見を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。