

論文の内容の要旨

氏名：郭 敬卓

S N A R E 蛋白は、輸送小胞を決められた目的地の膜に結合させる機能があるが、神経細胞においては、特にシナプス小胞の細胞前膜へのドッキングに重要な役割を担っている。SNAP25, VAPM2, syntaxin1Aは、その代表的な分子群であり、前者は細胞膜側に、後二者は、シナプス小胞側に局在する膜蛋白である。シナプス前膜でこれら三者は特異的な結合部位を用いて強固な複合体を形成し、シナプス小胞の細胞膜への融合を誘導する (Trimble et al., 1988; Baumert et al., 1989)。細胞膜上でのS N A R E 蛋白の挙動については詳細な解明がなされているのに対し、これらの蛋白の軸索先端への輸送についてはこれまであまり情報がなく、これらが、細胞体にあるゴルジ装置の膜上や輸送途中で、部分的にでも結合する可能性についても明らかになっていなかった。

一方、K I F 5は、微小管モーターの中で最初に同定された、いわゆる“キネシン”に相当する、モーター蛋白の代表格である。A T Pを基質として、微小管上を一定方向に動き、膜小器官や、蛋白複合体、R N A等を目的地に輸送する (Hirokawa, 1996; Hirokawa, 1998; Hirokawa and Takemura, 2004)。キネシンとよく似た、保存性の高いモーター部位を持つ一連の蛋白群は、キネシンスーパーファミリー蛋白と呼ばれ、ゲノムの解読によって、45種類が同定、分類されている (Miki et al., 2001; Miki et al., 2005)。キネシン1に分類されるK I F 5は、この内最も発現量が多く、機能についても最もよく研究がなされている。分子構造については、K I F 5本体が重鎖に相当し、これら2本が軽鎖2本と結合して4量体を構成する事がわかっている。球状のモーター部位のC末側に、カーゴ結合部位と軽鎖結合部位があり、これらを介して輸送担体と結合する。神経細胞においてはK I F 5 A, B, Cの三種類のアイソフォームが発現しており、この内5 Aと5 Cは神経に特異的に存在する。

今回私は、K I F 5によって運ばれるカーゴを免疫沈降と質量分析の系を組み合わせて網羅的に検索し、上記の三種のS N A R E 蛋白を同定し、さらに三者の輸送がモーターとしてK I F 5を用いながらも、互いに独立して、しかも

おのおの異なった輸送形態をとって運ばれている事を明らかにしたので報告する。

実験は、最初に、K I F 5 の結合蛋白を同定する目的で、K I F 5 特異的な抗体を用いてマウス脳の P 3 膜分画より、カーゴ蛋白を含む K I F 5 を精製した。サンプルを電気泳動で分離後切り出して酵素処理し、質量分析にかけ、上記の S N A R E 蛋白およびその周辺蛋白群を同定した。抗 K I F 5 抗体は 5 A, 5 B, 5 C 各々について特異的なものを使用したが、アイソフォームによる実験結果の違いは見られなかった。さらにこれらの S N A R E 蛋白の遺伝子を蛍光分子でラベルし、K I F 5 と共に海馬初代培養神経細胞内に強制発現させて、軸索内で K I F 5 と一致した局在を示す事を確認し、K I F 5 により運ばれる事を証明した。

次に、多点蛍光ビデオ解析装置にて、SNAP25, VAPM2, syntaxin1A 三者の神経細胞内での輸送を詳細に観察、比較検討を行った。各 S N A R E 蛋白の輸送速度を測定したところ、最大速度では三者の輸送に全く差は認められなかった。しかしながら、この内二者を神経細胞内に同時に発現させて動きを観察した結果、三者は各々独立に軸索内を輸送されている事が判明した。

他方、酵母ツーハイブリッド法を用いて各々の蛋白の直接相互作用を調べたところ、キネシン重鎖 (K I F 5) と軽鎖の間の既知の結合の他、これまで報告のあった S N A P 2 5 と K I F 5 の結合に加えて (Diefenbach et al., 2002a)、V A M P 2 とキネシン軽鎖の直接結合が明らかになった。Syntaxin1A は、K I F 5、キネシン軽鎖いずれとも直接結合はせず、scaffolding 蛋白を介するというこれまでの報告と矛盾はなかった (Su et al., 2004)。S N A R E 蛋白に対する抗体を用いた免疫沈降では、キネシン軽鎖は抗 V A M P 2 抗体でのみで共沈され、SNAP25, syntaxin1A の輸送担体には、キネシン軽鎖が含まれない事が確認された。

以上より、(1) S N A P 2 5 が K I F 5 に直接結合、(2) syntaxin1A が軽鎖以外の蛋白を介して K I F 5 に結合、(3) V A M P 2 がキネシン軽鎖を介して K I F 5 に結合、という三種類の輸送形態が存在し、各々は軸索内を K I F 5 によって別々に運ばれる事が明らかになった。

K I F 5 により輸送されるカーゴの中には、キネシン軽鎖を介さず直接 K I F 5 に結合する蛋白が存在する事は知られていたが、キネシン軽鎖とカー

ゴの結合部位が、K I F 5 上で異なる事から、両者が同時に結合する可能性も云われていた。現にリコンビナント蛋白を用いた試験管内での実験では、軽鎖と結合したK I F 5 が、同時にカーゴ結合部位を介して第三の蛋白に直接結合するとの報告もある (Diefenbach et al., 2002a; 2002b)。今回私が観察した細胞内の系では、強制発現により大量に存在する状況下でも、異種のカーゴ同士が直接あるいはキネシン軽鎖を介して、同時にK I F 5 に結合する事はなかった。

また、S N A R E 蛋白については、結紮して輸送を止めた神経軸索内より、三者を複合体の形で精製分離できたとの報告もあったが (Shiff et al., 1997a; 1997b)、今回の結果はこれとは異なり、SNAP25, syntaxin1A, VAMP2が、神経軸索内を別々に運ばれている様子が生きている細胞内で経時的に観察され、過去の報告は何らかのアーチファクトを含む可能性がでてきた。

さらに、今回の結論より、S N A R E 蛋白は軸索先端まで別々に運ばれる事が明らかになった結果、必然的にそれ以降、細胞膜直下で複合体を形成する事が明らかになり、未知の制御系の軸索先端にしぼった検索も今後可能になると考えられる。

今後は、S N A R E 蛋白の輸送をさらに詳細に解析し、モーター分子とカーゴとが1対1の関係で結合する制御機構を明らかにしていきたいと考えている。