

論文の内容の要旨

論文題目 : **Direct Interaction of AP-2 and Calcium Channel Synprint Site Involved in Synaptic Vesicle Endocytosis**

和訳 : シナプス小胞のエンドサイトーシスに関する Ca チャンネル synprint site と AP-2 の直接結合

指導教員 : 狩野 方伸 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年4月 入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 : 渡邊 博康

哺乳類の中樞神経系のシナプスにおいて、N型及び P/Q 型電位依存性Caチャンネルは伝達物質の放出を媒介する。これらCaチャンネルの細胞内ドメイン(II-III ループ)には小胞の開口放出に必須とされる synaptotagmin や syntaxin が結合する領域があり synprint site と呼ばれる。このうち synprint site と syntaxin との結合はCa濃度に依存し、最適濃度が 20 μ M と報告されている。synprint site 含有フラグメントを神経細胞に導入するとシナプス伝達が抑制されることから、synprint site はシナプス小胞の開口放出に重要な役割を持つと推測されている。

私は幼齢ラットの脳の抽出液内の N 型Caチャンネル synprint site 結合タンパク質を affinity column chromatography を用いて探索したところ、クラスリン依存性エンドサイトーシスの adaptor protein として重要な役割を果たす AP-2 が新たに見出だされた。affinity column に結合した精製物を SDS-PAGE にかけて、AP-2 とそのホモログである AP-1 の抗体でそれぞれイムノブロットを行った結果、AP-2 は N 型(Cav2.2)、P/Q 型(Cav2.1) Caチャンネルの synprint site 含有フラグメントには結合するが、synprint site を持たない L 型Caチャンネル II-III ループのフラグメントには結合しなかった(図 1A)。また AP-1 は synprint site に結合しなかった。AP-2 は $\alpha, \beta, \mu, \sigma$ のサブユニットから構成される 4 量体である。GST-fusion synprint site (N 型、P/Q 型)は MBP-fusion AP-2 μ サブユニットに直接結合した (図 1B)。既に報告されている synaptotagmin と AP-2 μ の直接結合も観

察された。また heparin カラムで精製した Mouse brain の抽出液において、N 型Caチャンネルは AP-2 抗体と共沈降し、その結合は synprint site フラグメントの添加によって阻害されることから、AP-2 と N 型Caチャンネルが synprint site を介して結合することが確かめられた(図 1C)。

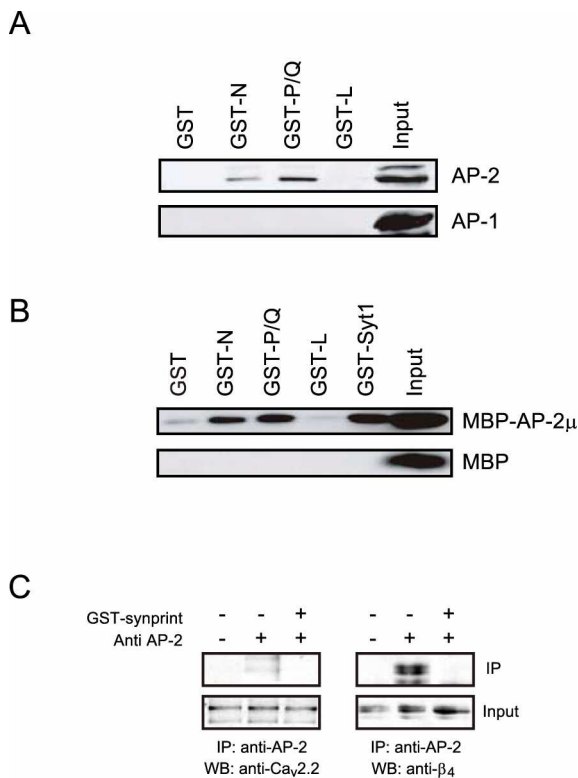


図1

次に組み換え体タンパク質を用いて synprint site 上の AP-2 結合部位を探索したところ、synaptotagmin の結合部位とほぼ一致することが明らかになった。synaptotagmin はまた、AP-2 とも結合することが知られているが、AP-2 上の synprint site 結合部位は synaptotagmin 結合部位とほぼ一致した。synaptotagmin との結合能が弱い AP-2 のポイントミュータントは synprint site との結合も弱いことが示された。synprint site, AP-2, synaptotagmin の3者間の結合阻害を各分子の過剰量を加えて検討した結果、3者間の結合が競合することが示された(図 2)。

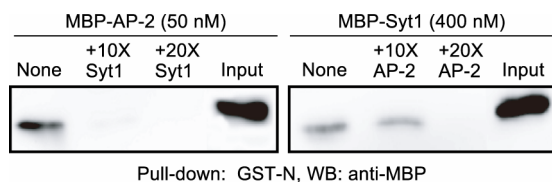


図2

次に脳の抽出液を用いて、GST-synprint に結合した AP-2 と synaptotagmin をイムノブロットで検出して synprint に対する AP-2 と synaptotagmin の結合のCa濃度依存性を比較した。synprint はCa濃度が低いときには専ら AP-2 と結合し(●)、濃度が高くなると synaptotagmin と結合する(○)ことが見いだされた(図 3)。組み換え体 AP-2 自体の synprint site との結合にはCa依存性が認められないことから、脳抽出液で観察された高濃度Caにおける AP-2 の結合低下は脳抽出液内の synaptotagmin による結合阻害の可能性が示唆された。

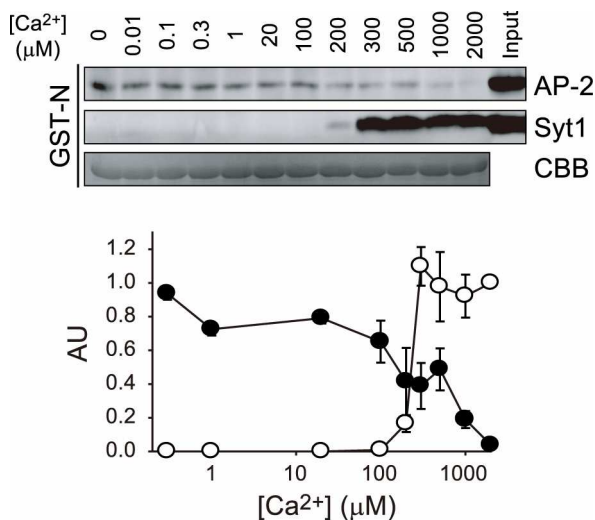


図3

最後に synprint フラグメントをパッチ電極の内液に加えて、幼若ラット脳幹スライスの calyx of Held シナプス前末端に拡散投与した。シナプス小胞のエキソサイトーシスを、Ca 電流によって誘発し、エキソサイトーシスと、これに続くエンドサイトーシスを膜容量測定によって定量した。synprint フラグメントを導入したプレシナプスでは、コントロールの L 型フラグメント注入時と比べ、エンドサイトーシスが顕著にブロックされた(図 4C)。一方、エキソサイトーシスは、Ca 電流と共にわずかに増大した(図 4A)。エキソサイトーシスの増加分は、Ca 電流の増大によって説明されることから synprint フラグメントはエキソサイトーシスに影響を与えないことがわかった(図 4B)。

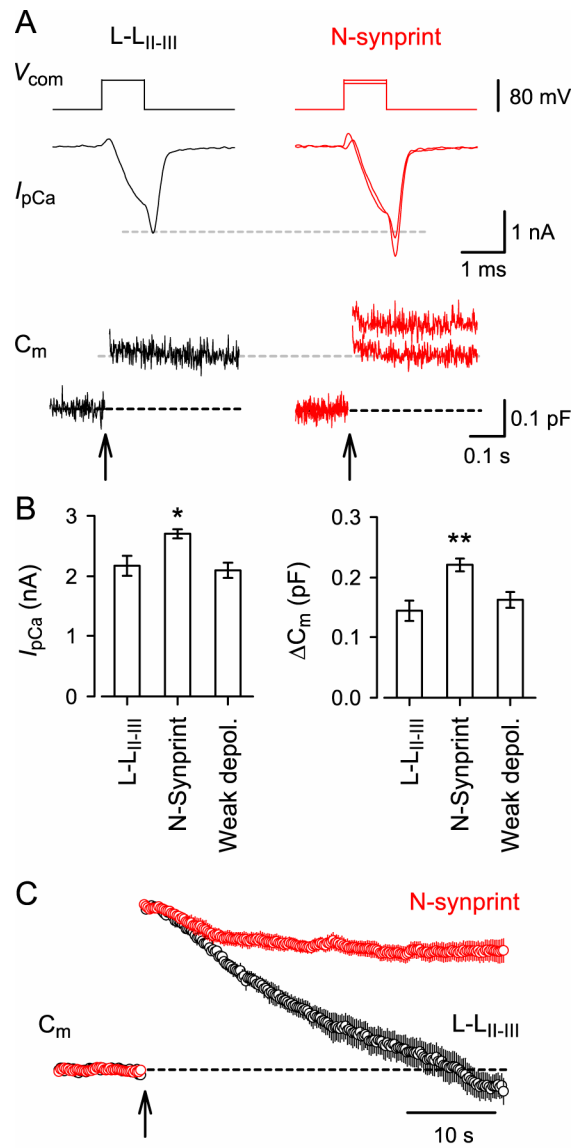


図4

これらの結果は、電位依存性 Ca チャネルの synprint site への AP-2, synaptotagmin の Ca 濃度依存的な結合がシナプス小胞のエンドサイトーシスに重要な役割を果たすことを示唆する。