

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 博康

本研究は哺乳類中枢神経系における神経伝達の分子機構を明らかにすることを目的とし、N型、P/Q型電位依存性カルシウムチャンネルに結合する新規タンパク質を探索し、その働きを脳切片にパッチクランプ法で神経伝達を測定することにより検討して、下記の結果を得ている。

1. 哺乳類中枢神経系の神経伝達を担う電位依存性カルシウムチャンネルである、N型、P/Q型カルシウムチャンネルの細胞内ドメイン特有に存在するsynprint siteに結合するタンパク質を、アフィニティーカラムクロマトグラフィーと質量分析を用いて同定したところ、クラスリン依存性のエンドサイトーシスのアダプター分子であるAP-2が結合することを新たに見出した。

2. AP-2とカルシウムチャンネルの結合をそれぞれの組み換え精製タンパク質を用いた結合実験で検討したところ、AP-2の μ サブユニットがsynprint siteと直接結合することが示された。synprint site上のAP-2の結合部位は、既に知られているエキソサイトーシス、エンドサイトーシス関連タンパク質であるsynaptotagminの結合部位と一致する。またAP-2上のsynprint siteの結合部位も、同じくsynaptotagminの結合部位と一致することが示された。実際に組み換え精製タンパク質を用いた実験ではこれら三者の結合が拮抗しあうことが示された。

3. 脳抽出液を様々な濃度のカルシウムに調整し、この抽出液内のAP-2及びsynaptotagminと組み換え精製タンパク質のsynprint siteとの結合を検討すると、低濃度カルシウム下ではAP-2はsynprint siteに結合するが、高濃度カルシウム下になるとAP-2はsynprint siteに結合しなくなる。反対にsynaptotagminは高濃度カルシウム下でのみsynprint siteに結合する。AP-2の組み換え精製タンパク質とsynprint siteとの結合にはカルシウム依存性が認められないが、組み換え精製タンパク質に脳抽出液を加えて、組み換え精製のAP-2とsynprint siteとの結合を検討すると、脳抽出液由来のAP-2と同様に高濃度カルシウム下ではsynprint siteとの結合が弱まる。以上からAP-2は高濃度カルシウム下ではsynaptotagminを含む脳抽出液に存在する分子と拮抗することで、synprint siteに結合しにくくなることが示された。

4. synprint site、AP-2、synaptotagminの結合が実際のシナプス伝達でどのように働いているかを検討するために、パッチ内液にsynprint siteの組み換え精製タンパク質を導入して、Rat脳幹部Calyx of Held のプレシナプスに直接パッチクランプをし、細胞膜容量測定を用いて、エキソ、エンドサイトーシスを測定したところ、synprint siteを導入した細胞では、エンドサイトーシスが阻害されることが示された。

以上、本論文は中枢神経系のシナプス伝達に参与する N、P/Q 型カルシウムチャンネルに、

エンドサイトーシス関連分子である AP-2 が新たに結合することを見出し、この結合がシナプス小胞のエンドサイトーシスに関与することを明らかにした。本研究ではこれまで明らかになっていなかった、シナプス小胞エンドサイトーシスのカルシウム依存性に関わる分子機構を明らかにしたという点で意義深く、学位の授与に値するものと考えられる。