

## 論文内容の要旨

### 【論文題目】

シンタキシン 1B の新規結合蛋白質の同定とその蛋白—蛋白間相互作用の生理的役割に関する研究

申請者；田中さやか

### 【要旨】

神経系に豊富に発現している膜タンパク質であるシンタキシン 1 に二つ存在するアイソフォームのうち、先行研究において焦点が当てられてきたシンタキシン 1A に比べ、シンタキシン 1B に関してはその機能の詳細は未解明のまま残されている。これまでは両者はほぼ同一の機能を有すると考えられてきたが、細胞内局在がやや異なる報告例もあることから、シンタキシン 1B がこれまで未知の機能を担っている可能性があると考えた。そこで、シンタキシン 1B の新規結合タンパク質を同定することを試みた。

先行研究においては、形質膜上に局在することが知られているシンタキシン 1A が細胞表面のイオンチャネルなどと相互作用し、その活性を制御する機能を有することが報告されてきた。一方でシンタキシン 1B に関しては細胞表面以外にも細胞内部での存在が確認されている。さらに、変異型シンタキシン 1B のノックインマウスと、細胞内カルシウムチャネルであるイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) の I 型 (IP<sub>3</sub>R1) ノックアウトマウスの表現型が類似していることに着目し、両者に機能的な連関がある可能性を考えた。そこで、まずシンタキシン 1B が IP<sub>3</sub>R1 と相互作用する可能性について検討することを考えた。両者はともに神経系に豊富に存在するタンパク質であることから、脳抽出液を

用いた生化学実験によってシンタキシン 1B と IP<sub>3</sub>R1 との結合能を検討した。シンタキシン 1B と IP<sub>3</sub>R1 の結合を評価するにあたって、より明確な実験結果を得るために、大腸菌での発現が不安定であった IP<sub>3</sub>R1 の部分配列の組換えタンパク質は、Sf9 細胞で発現させた。その結果、実際に IP<sub>3</sub>R1 がシンタキシン 1B の結合タンパク質であり、両者は直接相互作用しうることを明らかにした。また、II型およびIII型の IP<sub>3</sub>R もシンタキシン 1B と相互作用することが示唆された。

次に、培養細胞を用いてシンタキシン 1B による IP<sub>3</sub>R の機能へ与える影響を検討した。ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC12 細胞に FLAG タグを付加したシンタキシン 1B (FLAG-stx1B) を過剰発現させ、生細胞カルシウムイメージングによって IP<sub>3</sub>R を介したカルシウム放出 (IICR) を測定した結果、FLAG-stx1B が IICR を抑制していることを示唆する結果が得られた。

N

本研究の結果、stx1B が IP<sub>3</sub>R と相互作用する事を明らかにした。また、stx1B は IP<sub>3</sub>R によるカルシウム放出を負に制御するという、stx1B の機能についての新しい知見が得られた。