

## 審査の結果の要旨

氏名 田中 さやか

本研究は、各種イオンチャネルの活性制御を通して、細胞のイオン動態において重要な役割を担っていると考えられているシンタキシン1の二つのアイソフォームのうち、未解明な点が多く残されているシンタキシン1Bの機能を明らかにすることを目的にすえ、結合タンパク質の同定を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 先行研究においては主に形質膜上のイオンチャネルやトランスポーターに対するシンタキシン1の作用が着目されてきたが、細胞内のイオンチャネルに対する作用はこれまで報告がないこと、また細胞内カルシウムチャネルであるI型IP<sub>3</sub>R (IP<sub>3</sub>R1)とシンタキシン1Bはともに小脳において発現が高く、その機能維持に重要であることが示唆されることなどから、シンタキシン1Bの結合タンパク質候補としてIP<sub>3</sub>R1を考えて検討を始めた。IP<sub>3</sub>R1のN末端細胞質領域配列を含むGST融合組換えタンパク質を作成し、マウス全脳より得た粗ミクロソーム画分抽出物よりプルダウン実験を行ったところ、マウス内因性のシンタキシン1Bが共沈した。同様に、シンタキシン1Bの各ドメインを含むMBP融合組換えタンパク質によってプルダウン実験を行った結果、シンタキシン1BのSNAREドメインによりマウス内因性のIP<sub>3</sub>R1が共沈した。

2. IP<sub>3</sub>R1配列中のシンタキシン1B結合領域を同定するために、IP<sub>3</sub>R1のN末端細胞質領域を細分化し、これらの部分配列をGST融合組換えタンパク質として得ることを試みた。組換えタンパク質の大量発現系として、はじめに大腸菌を用いが、これらの組換えタンパク質は不安定であり強く断片化を受け、全長での精製が困難であった。そこでバキュロウイルス-Sf9細胞過剰発現系を用いて精製を行った結果、すべての組換えタンパク質を全長にて精製することに成功した。このように得た組換えタンパク質を用いてプルダウン実験を行った結果、IP<sub>3</sub>R1のアミノ酸残基1593から1800の領域にシンタキシン1Bが結合することが明らかになった。

3. シンタキシン1Bの各MBP融合組換えタンパク質と、IP<sub>3</sub>R1の各GST融合組換えタンパク質をそれぞれ用いてプルダウン実験を行った結果、シンタキシン1BのSNAREドメインはIP<sub>3</sub>R1のアミノ酸残基1593から1800の領域を含む組換えタンパク質を共沈し、シンタキシン1BとIP<sub>3</sub>R1が直接結合することが示された。シンタキシン1Bの

SNAREドメインはコイルドコイル構造を形成することが知られているが、あらたにIP<sub>3</sub>R1のアミノ酸残基1593から1800の領域について構造予測を行った結果、この領域もコイルドコイルを形成する確率が高いことが示された。

4. マウス全脳より得た粗マイクロソーム画分抽出物に抗シンタキシン1B抗体を用いて免疫沈降実験を行った結果、マウス内因性のIP<sub>3</sub>R1が共沈した。同様に、マウス内因性のII型IP<sub>3</sub>RおよびIII型IP<sub>3</sub>Rも共沈した。これらの結果からマウス内因性のシンタキシン1Bがマウス内因性IP<sub>3</sub>Rの全てのアイソフォームと相互作用することが明らかになった。さらに幼若マウスの全脳より得た粗マイクロソーム画分抽出物や、ニワトリ胎児全脳より得た粗マイクロソーム画分抽出物を用いて同様の検討を行った結果、やはり内因性シンタキシン1Bが内因性IP<sub>3</sub>Rと結合することが確認され、両者の相互作用が種を超えて、また発生期においても見られることが示唆された。

5. シンタキシン1BのN末端にFLAGタグを付加したcDNA哺乳類発現ベクター(FLAG-stx1B)をPC12細胞に過剰発現させ、ブラジキニン刺激によるIP<sub>3</sub>誘導性カルシウム放出をFura-2を用いて生細胞イメージングによって測定した結果、FLAG-stx1Bはブラジキニンによるカルシウム上昇を抑制することが示された。一方、タブシガルジンを用いてカルシウム貯蔵庫を枯渇させてカルシウム貯蔵量を比較した結果、変化は見られなかった。これらの結果から、シンタキシン1BはIP<sub>3</sub>Rを介したカルシウム放出を抑制する作用があることが示唆された。

以上、本研究はこれまでその機能詳細がほぼ未解明であったシンタキシン1Bに着目し、シンタキシン1Bが細胞内カルシウムチャネルであるIP<sub>3</sub>Rと結合することを明らかにし、さらにはシンタキシン1BがIP<sub>3</sub>誘導性のカルシウム放出を抑制することが示唆される知見を得た。

本研究は、これまで未知であったシンタキシン1Bの細胞内イオンチャネルに対する作用を始めて発見したものである。シンタキシン1BとIP<sub>3</sub>R1は共に小脳において重要な働きをされると考えられているため、本研究は小脳機能に寄与する細胞内カルシウムチャネルの制御機構の解明に重要な貢献をなすと言える。さらに、両分子ともに細胞のカルシウム依存的な分泌活動にも関与していることから、分泌の制御を担う分子機構の解明にあらたな展開をもたらすことも期待される。

以上から、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。