
原 著

非神経型シンタキシン (syntaxin) の ミオシン V 結合能の性状解析

大 関 康 志

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野
(主任：青柳 豊教授)

Nonneuronal Syntaxins Bind to Myosin - V in a Ca^{2+} - dependent Manner

Koushi OOSEKI

Division of Gastroenterology

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)

要 旨

目的： Syntaxin family は細胞内輸送を担う最大のファミリー分子で、神経細胞では syntaxin - 1A が開口放出を担っている。非神経細胞には形質膜に局在する syntaxin アイソフォームが存在し、それぞれの細胞で重要な役割を果たしている。神経細胞では、 Ca^{2+} 依存性に小胞輸送の分子モーター myosin - V が syntaxin - 1A に結合して、小胞の tethering に役割を果たす。この機構が非神経型アイソフォームについても成り立つかどうかを、生化学的に検討することにした。

方法： 組換え蛋白質として、syntaxin - 2, 3, 4 と myosin - V のそれぞれを作成して *in vitro* で結合実験を行って、との結合と比較した。また *in vitro* motility を行って、myosin - V の運動性に関する機能制御を解析した。

結果： Syntaxin - 2, - 3, - 4 は結合の最大量は少ないものの、syntaxin - 1A と同様の myosin - V 結合特性を示した。この相互作用は、myosin - V の運動性を抑制しない点は、- 1A の場合と同様であったが、syntaxin - 2, 3 については - 1A のときより、motility が速くとなるという結果が得られた。副腎髄質クロマフィン細胞において、複数の syntaxin の存在が確認された。

結論： 非神経型 syntaxin アイソフォームは、神経型の syntaxin - 1A と同様、myosin - V と結合することが証明された。これらの結合には細かい差異があり、その点がそれぞれの細胞での

Reprint requests to: Koushi OOSEKI
Division of Gastroenterology
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医歯学系 消化器内科学教室 大関 康志

各 syntaxin アイソフォームの機能的特性, すなわち細胞生物学的な固有の役割を表すと考えられる。

キーワード: syntaxin, myosin-V, 細胞内小胞輸送, 開口放出, Ca^{2+}

緒 言

細胞機能を担う細胞内小胞輸送は, SNARE 機構で担われている¹⁾. SNARE 機構は小胞に存在する v-SNARE (VAMP family) とターゲット膜に存在する t-SNARE とが複合体を形成して小胞・膜間の融合が起こることで, 実行される. t-SNARE の中心的な分子は syntaxin family の分子であり, もっとも多様な存在を持ち, ヒトでも 20 種類以上が存在する²⁾. これらは種々の細胞でさまざまな分布を示しているが, すべての細胞で多様な機能を果たすためにわずかな分子構造の差異を利用して役立っていると考えられる. Syntaxin family のうち, 形質膜に存在する分子は哺乳動物で数種類存在するが, これらは細胞ごとに特徴的な分布を示されており, 神経細胞では syntaxin-1A, -1B が, 非神経細胞では syntaxin-2 (上皮細胞), syntaxin-3 (消化管細胞), syntaxin-4 (脂肪細胞, 骨格筋細胞) などが局在する³⁾. SNARE 機構の骨格は最初に神経細胞のシナプス伝達で明らかにされてきたため, 開口放出の調節に関する分子メカニズムが詳細に解析されてきた¹⁾. これは Ca^{2+} に依存する現象であり, SNARE 機構が関係する Ca^{2+} 依存性調節が解明するはずであるが, その詳細はあまり解明されていない。

五十嵐らのグループは神経細胞や調節性分泌細胞に特異的な syntaxin-1A の Ca^{2+} 依存性制御に関係する 2 つの分子間相互作用を明らかにし, それらが細胞レベルで開口放出の調節に関係することを明確に証明した^{4)–6)}. このうち, myosin-V は小胞の輸送を担う分子モーターとして神経細胞を中心に, 幅広い分布をしていることが明らかとなっている⁷⁾⁸⁾. このような分子は, 非神経細胞でも機能することが推定されるため, 非神経型の syntaxin との相互作用が同様にあれば, 非神経細

胞での固有の機能に関係する可能性がある。

今回, 著者はこの点を明らかにするため, syntaxin family のうち, 非神経細胞の syntaxin-2, 3, 4 と myosin-V の相互作用を明らかにすることに成功し, その生化学的的特性を明らかにしたので報告する。

方 法

1. Myosin-V の精製

1) 脳からの myosin-V は, ヒヨコ脳から Cheney の方法で精製した⁹⁾.

2) 組換え蛋白質としての精製は, myosin-V 全長 (pFLAG-mouse myosin-Va; 池辺光男博士より供与) をコードした baculovirus の系で導入した昆虫細胞 (Sf9) 発現系を用い, anti-FLAG (M2)-agarose により myosin-V を精製した。

2. Syntaxin アイソフォームと myosin-V の結合実験

それぞれの膜貫通部位を除去して glutathione-S-transferase (GST) 融合蛋白質として大腸菌で発現した syntaxin-1A, 2, 3, 4 を glutathione Sepharose にて精製し, 各 $500 \mu\text{g}$ (8.9 nmol) を myosin-V 組換え蛋白質 $1 \mu\text{M}$ ($90 \mu\text{l}$) と混ぜて, pCa 4–8 の 4 mM EGTA-Ca バッファー [pH7.4] (ソフトウェア Max Chelator を用いて pCa 計算); 1 mM DTT, 1 mM AEBSF) で洗浄 (各 $500 \mu\text{l} \times 3$) し, 室温で 10 分放置した. 洗浄後に SDS 溶出を行い, 電気泳動して myosin-V のバンドをソフトウェア Image J を用いて定量化した。

3. Motility assay

先に記載された方法¹⁰⁾に従い, rhodamine-phalloidin で標識した F-actin を用い, 牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングしたフローセルに脳 myosin-V ($20 \mu\text{g/ml}$) を加え, 氷上で 5 分

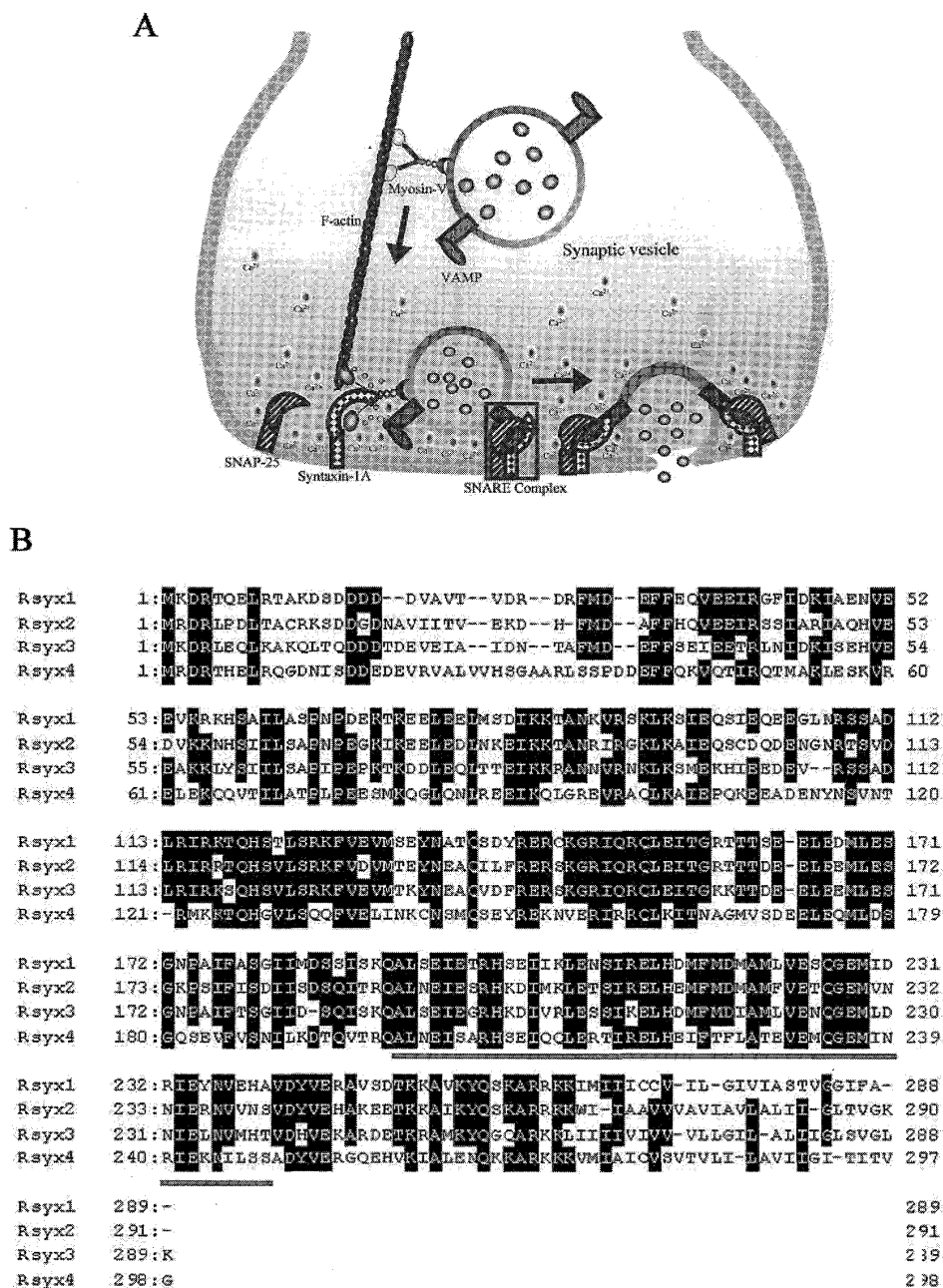


図1 SNARE機構と膜の融合、およびそれに関わる myosin-V 結合の役割

- (A) 神経終末における SNARE 機構と myosin-V の意義：SNARE 蛋白質は小胞上の v-SNARE (VAMP) と形質膜上の t-SNARE (SNAP-25, syntaxin-1A) の3種類があり、これらが 1:1:1 結合することで小胞は膜に不動化され、 Ca^{2+} の流入によって膜との融合（開口放出）が起こる。この SNARE 複合体形成は、小胞が他の複合体で形質膜に繫留されている (tethering) 際に生ずると考えられ、この機構は神経細胞では完全には解明されていない。小胞の局所輸送を司るモーター分子の myosin-V は小胞を運ぶと同時に、 Ca^{2+} 依存性に形質膜上の syntaxin-1A と結合することで、tethering を担う1つの分子機構に関与すると考えられる。
- (B) 形質膜 syntaxin アイソフォームのアミノ酸配列：それぞれのアミノ酸配列のうち、3種類以上が共通のアミノ酸配列を inverted 表示で、syntaxin-1A の myosin-V 結合部位 (191-240; H3S) を橙色の下線で表示した。

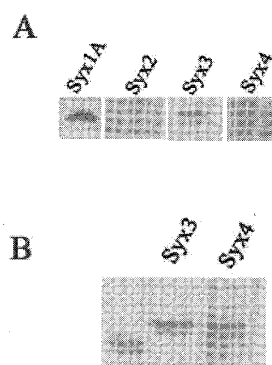


図2 同一の細胞における、複数の形質膜 syntaxin アイソフォームの存在

(A) 副腎髄質クロマフィン細胞 (B) メラノーマ細胞 melan-a. それぞれライセートにおいて、免疫ブロッティングで各分子種を検出した。

間放置した。次いで syntaxin 1A-4 (各 $1\mu\text{M}$) を含んだ Ca-free, pCa 7, pCa 6.3 の各フローバッファー (25 mM imidazole-HCl [pH 7.2], 25 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 4 mM EGTA- CaCl_2) をフローセルに吸着させ、氷上で 20 分放置した。最後に標識 F-actin ($420\mu\text{g/ml}$), 1 mM ATP バッファーを加え, motility を計測した ($n = 100$)。

結 果

発現の確認

非神経細胞において、複数の形質膜型 syntaxin が発現しているかどうかを確認するために、副腎髄質クロマフィン細胞 (図 2A) およびメラノーマ細胞 melan-a (図 2B) のライセートをブロッティングした。その結果、前者では syntaxin-1A, -3, -4 の 3 種類が、後者では syntaxin-3, 4 が発現していることが確認できた。

In vitro での結合実験

これらの形質膜型 syntaxins は syntaxin-1A と同様, myosin-V に結合するかどうかを確認した。

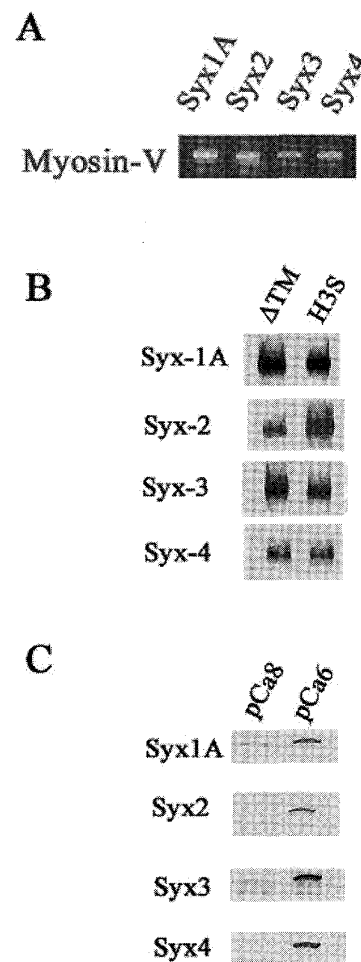


図3 形質膜 syntaxin アイソフォームの myosin-V 結合
(A) pCa = 6 における myosin-V の結合. (B) 結合の Ca^{2+} 依存性. (C) H3S 部位の myosin-V 結合

その結果, syntaxin-2, 3, 4 は syntaxin-1A と同様, myosin-Va に結合できることがわかった (図 3A). これらの結合については, Ca^{2+} の要求性も, syntaxin-1A のケースとほぼ同様であった (図 3B). なおこの結合における, 脳由来の native myosin-V と Sf9 細胞で作成した recombinant myosin-V についての差異は認められなかった (data not shown). 結合の程度は, syntaxin-1A よりも少なく, 結合の最大量は syntaxin-1A の約 60-70% 程度であった (syntaxin-2: 70%; syn-

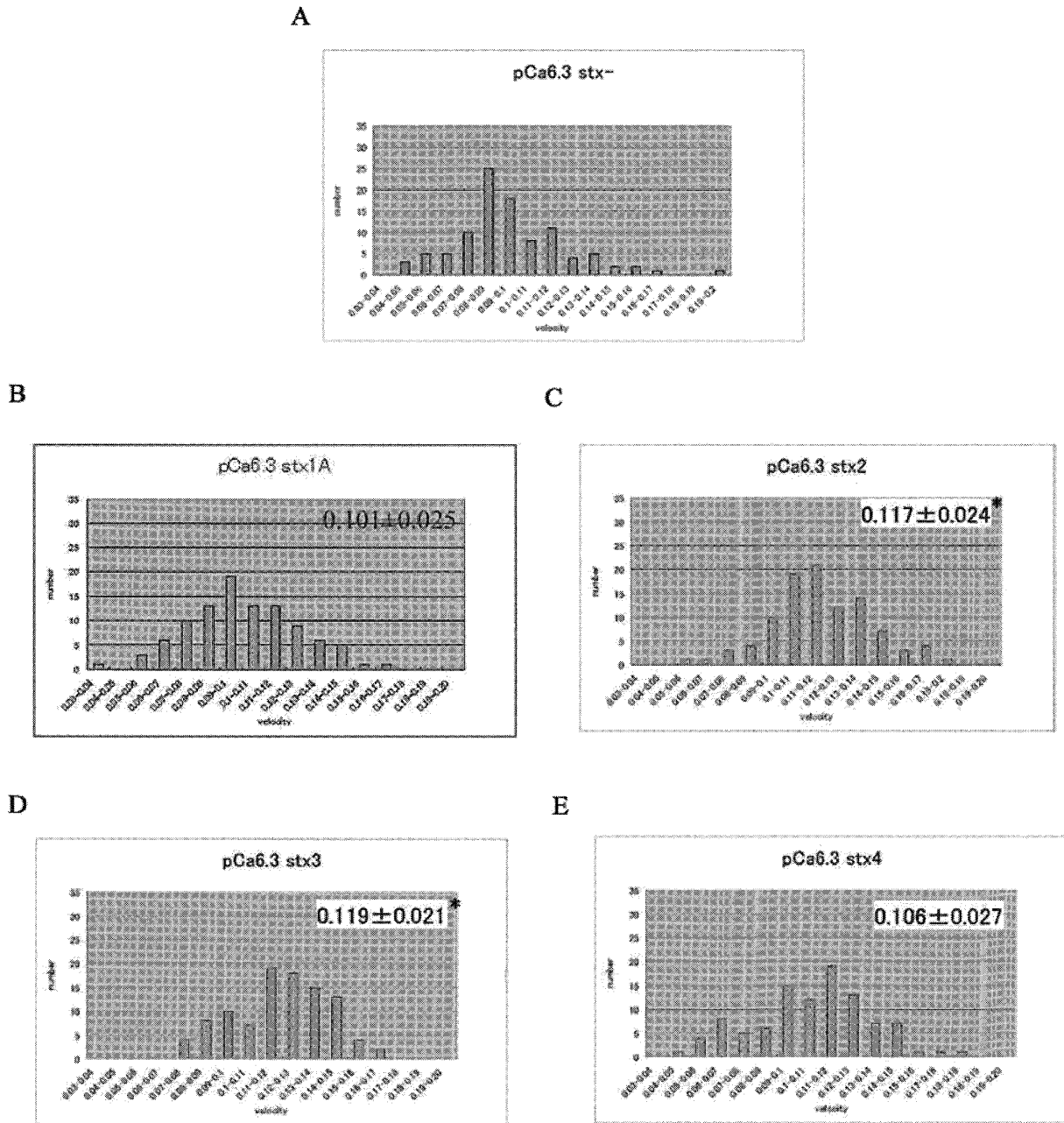


図4 高 Ca^{2+} ($\text{pCa} = 6.3$) 条件下での形質膜 syntaxin アイソフォームの myosin-V 運動性への影響

(A) Syntaxin isoform なし (Myosin-V のみ); (B) syntaxin-1A; (C) syntaxin-2; (D) syntaxin-3; (E) syntaxin-4, のそれぞれ存在下での myosin-V の運動速度の分布. 高 Ca^{2+} 時には syntaxin-2, 3 で運動性の増大が認められる (*; $p < 0.05$).

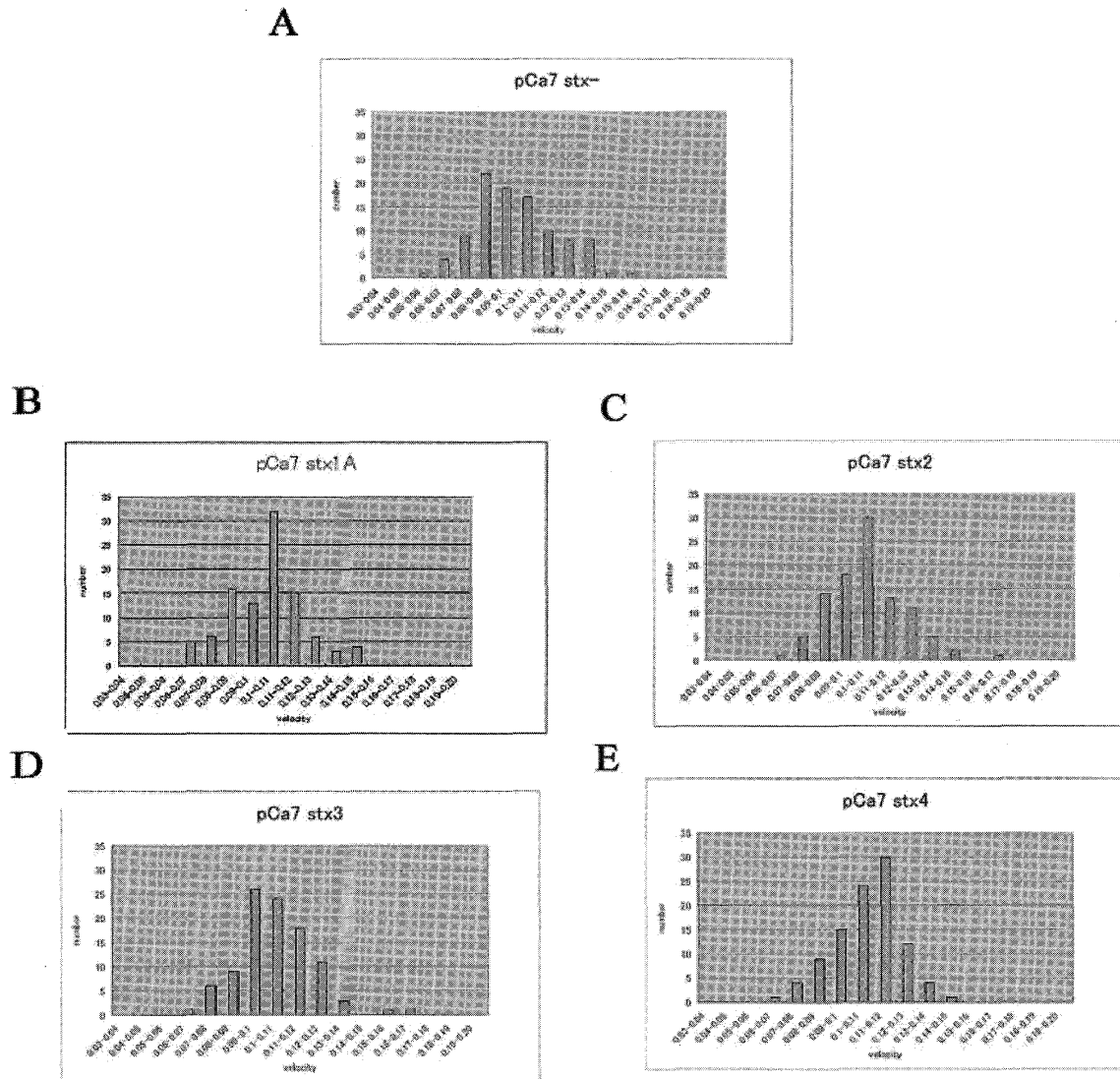


図5 低 Ca^{2+} ($\text{pCa} = 7.0$) 条件下での形質膜 syntaxin アイソフォームの myosin - V 運動性への影響

(A) Syntaxin isoform なし (Myosin - V のみ) ; (B) syntaxin - 1A; (C) syntaxin - 2; (D) syntaxin - 3; (E) syntaxin - 4, のそれぞれ存在下での myosin - V の運動速度の分布。低 Ca^{2+} 時には, アイソフォーム同士の差異は認められない。

taxin - 3: 69 %; syntaxin - 4: 77 %). また結合に必須の部位を検討したところ, syntaxin - 1A の結合部位 [191 - 240], すなわち H3 domain の前半約 2/3 に相当する H3S 部分が, syntaxin - 2, 3, 4 でも同様に結合部位であった (図 3C).

結合の myosin - V の運動性への影響

これらの syntaxin アイソフォームと myosin - V の結合について, *in vitro* motility assay によって myosin - V の運動性に及ぼす影響を調べたところ, $\text{pCa} = 6.3$ (高 Ca^{2+}) および $\text{pCa} = 7.0$ (低 Ca^{2+}) における測定で, 運動性は阻害されなかつ

た (図 4, 5). また $pCa = 6.3$ の時に限り, syntaxin-2, -3 の結合が myosin-V の運動性を増大させるという結果が得られた (図 4B-E).

考 察

ヒトは 60 兆個の細胞があるにも関わらず遺伝子の数は約 22,000 個と言われ, 単細胞生物の酵母が 5,500 個の遺伝子を有するのと比較して高々 4 倍に過ぎない. これに基づくと, ある細胞で成り立つ蛋白質間相互作用が他の細胞でも同様に機能することを想定しないと, 多様な細胞機能を少数の遺伝子で成り立つことを説明できないはずである. また SNARE 機構は, 真核細胞では酵母から哺乳動物の神経細胞まで幅広く多様なアイソフォームの分布に基づいて機能していることが証明されている. これらの観点から考えると, すべての細胞で存在する SNARE 機構は類似性が高く, わずかな分子間相互作用の変異をそれぞれの細胞に固有の機能に結びつける可能性が高い.

今回の著者の研究で, syntaxin-1A について五十嵐らのグループが証明した結果が, 基本的に他の syntaxin アイソフォームでも成り立つことが証明された. Myosin-V は神経細胞でもっとも多量に存在しているものの, クロマフィン細胞¹¹⁾ やメラノーマ細胞¹²⁾ でも存在が確認され, 分泌現象やメラノサイトの輸送など, それぞれの細胞の固有機能に寄与していることが示されている. これらの細胞に syntaxin アイソフォームの存在が示され (図 2), これらが syntaxin-1A の結合よりは若干弱いものの, myosin-V を Ca^{2+} 依存性に結合できることが示された (図 3). さらにこれらの特性は myosin-V の運動性を抑制せず, ある場合には Ca^{2+} 依存性に運動性を増大させることが新たに見出された (図 4). その生理的意義はまだ明らかでないが, この運動性の増大が効率的な tethering に関係することが想定される⁶⁾.

著者が示したように, 近年, 種々の細胞においては複数の形質膜 syntaxin アイソフォームが発現されていて, しかもそれぞれが別個の働きを有する可能性が明らかとなった¹³⁾⁻¹⁷⁾. この事実

を踏まえると, それぞれの myosin-V との相互作用は, 各細胞での小胞輸送の方向性等に大きく関与すると推定される. この結果をもとに, 今後それぞれの細胞の細胞内輸送事象が, さらに詳細に解析できるものと期待される.

また myosin-V には 3 種類のアイソフォームがあり, そのうち, 非神経細胞には今回実験に使用した myosin-Va だけでなく, myosin-Vc が発現している¹⁸⁾, *in vivo* での結合には myosin-Vc の特性を考慮する必要もあろう. 但し, Va, Vc のもっとも大きな差異は tail domain にあり, 一方 myosin-V 上の syntaxin 結合部位は neck domain であって, この部位は Va, Vc ともそれほど大きな変化はないため, 今回の結論をそれほど大きく修正する必要はないものと予想される.

謝 辞

本研究の遂行に関してご支援をいただいた青柳 豊・教授, 本研究の実際的なご指導をいただいた五十嵐 道弘・教授 (新潟大学医歯学系・分子細胞機能学分野), 実験に関してご指導・ご助言をいただいた同分野の渡部通寿・助教, 群馬大学の石川良樹・講師 (大学院医学研究科・分子薬理学), マサチューセッツ大学の池辺光男教授および佐藤治博士 (医学部・生理学) に深謝申し上げます. また本研究に関する実験にご協力いただいた野村和重 (現・群馬大学) 博士, 大学院生の大湖 健太郎, 田口直希の両氏に感謝いたします.

文 献

- 1) Duman JG and Forte JG: What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C237-249, 2003.
- 2) Jahn R and Scheller RH: SNAREs: engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 631-643, 2006.
- 3) Bennett MK, Garcia-Ararras JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD and Scheller RH: The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74: 863-873, 1993.
- 4) Ohyama A, Hosaka K, Komiya Y, Akagawa K,

- Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Mochida S, Yamauchi T and Igarashi M: Regulation of exocytosis through Ca^{2+} /ATP-dependent binding of autophosphorylated Ca^{2+} /calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. *J Neurosci* 22: 3342-3351, 2002.
- 5) Nomura K, Ohyama A, Komiya Y and Igarashi M: Minimal residues in linker domain of syntaxin 1A required for binding affinity to CaMKII. *J Neurosci Res* 72: 198-202, 2003.
 - 6) Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, Ishikawa R, Komiya Y, Hosaka K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Ushiki T, Sato O, Ikebe M and Igarashi M: Myosin-Va Regulates Exocytosis through Ca^{2+} -dependent Binding of Syntaxin-1A. *Mol Biol Cell* 16: 4519-4530, 2005.
 - 7) Vale RD: The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480, 2003.
 - 8) Reck-Peterson SL, Provance DW Jr, Mooseker MS and Mercer JA: Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* 1496: 36-51, 2000.
 - 9) Cheney RE: Purification and assay of myosin V. *Methods Enzymol* 298: 3-18, 1998.
 - 10) Rock RS, Rief M, Mehta AD and Spudich JA: *In vitro* assays of processive myosin motors. *Methods* 22: 373-381, 2000.
 - 11) Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD and Trifaro JM: Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* 85: 287-298, 2003.
 - 12) da Silva Bizario JC, da Cunha Nascimento AA, Casaletti L, Patussi EV, Chociay MF, Larson RE and Espreafico EM: Expression of constructs of the neuronal isoform of myosin-Va interferes with the distribution of melanosomes and other vesicles in melanoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 51: 57-75, 2002.
 - 13) Darios F and Davletov B: Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature (London)* 440: 813-817, 2006.
 - 14) Beest MBA, Chapin SJ, Avrahami D and Mostov KE: The role of syntaxins in the specificity of vesicle targeting in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 16: 5784-5792, 2005.
 - 15) Fukuda M, Imai A, Nashida T and Shimomura H: Slp 4-a/granuphilin-a interacts with syntaxin-2/3 in a Munc18-2-dependent manner. *J Biol Chem* 280: 39175-39184, 2005.
 - 16) Low SH, Vasanji A, Nanduri J, He M, Sharma N, Koo M, Drazba J and Weimbs T: Syntaxins 3 and 4 are contributed in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Mol Biol Cell* 17: 977-989, 2006.
 - 17) Sharma N, Low SH, Misra S, Pallavi B and Weimbs T: Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 173: 937-948, 2006.
 - 18) Rodriguez OC and Cheney RE: Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 991-1004, 2002.

(平成18年12月13日受付)