

氏名	おおぜき こうし 大 関 康 志
学位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第171号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	非神経型シntaxin(syntaxin)のミオシンV結合能の性状解析
論文審査委員	主査 教授 青 柳 豊 副査 教授 五十嵐 道 弘 副査 教授 島 山 勝 義

#### 博士論文の要旨

目的: 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。SNARE 機構は小胞に存在する v-SNARE 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 のなかで中心的な分子は Syntaxin family である。これらは哺乳類のあらゆる細胞にアイソフォームが存在する。このうち形質膜に存在するアイソフォームはは数種類存在することが知られている。神経細胞では syntaxin-1A が開口放出を担っている。非神経細胞では、syntaxin-2(上皮細胞)、-3(消化管細胞)、-4(脂肪細胞)などの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<sup>2+</sup>依存性に syntaxin-1A と結合する蛋白質のひとつに myosin-V が明らかになっている。この蛋白質は神経細胞を中心に生体内で幅広い分布をしており、細胞内輸送を担う分子モーターとして様々な細胞機能発現に関与する。神経細胞の開口放出の調節において、この myosin-V と syntaxin-1A の結合はシナプス小胞の形質膜への供給に重要な役割を果たしている。今回、筆者は非神経型の syntaxin アイソフォームについても Ca<sup>2+</sup>依存性に同様の相互作用が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: 膜貫通部位を除去した組み換え蛋白質として大腸菌で発現した、GST 融合 syntaxin-1A,-2,-3,-4 のそれぞれを作成した。myosin-V はヒヨコ脳から精製したものと、全長をコードした組み換え蛋白質を昆虫細胞(Sf9)の発現系を用い作成した。これらを用い Ca<sup>2+</sup>濃度の異なる条件下で結合させ、結合量を比較した。結合部位の決定のため、それぞれのアイソフォームの膜貫通ドメインを除去したものと、syntaxin-1A で明らかになった myosin-V 結合部位(H3S ドメイン)に相当するそれぞれのドメインの myosin-V に対する結合動態を比較した。また、motility assay は各 Ca<sup>2+</sup>濃度条件下でフローセル上に吸着した myosin-V と syntaxin-1A,2,3 を各々結合させ、そこに注入した F-actin の運動性を計測することで、myosin-V の運動性に関する機能制御を解析した。

結果: syntaxin-1Aと比較し、syntaxin-2,3,4はmyosin-Vとの結合の最大量は少ないものの、syntaxin-1Aと同様にCa<sup>2+</sup>依存性の結合特性を示した。結合実験において脳由来と組み替え蛋白質のmyosin-Vについての差異は認めなかった。また、syntaxin-1Aとsyntaxin-2,3,4におけるmyosin-Vとの結合部位は同様と考えられた。この相互作用は、myosin-Vの運動性を抑制しない点は、syntaxin-1Aの場合と同様であったが、高Ca<sup>2+</sup>濃度条件下(pCa=6.3)においてsyntaxin-2,-3については-1Aの時より、運動性が上がるという結果が得られた。低Ca<sup>2+</sup>濃度条件下(pCa=7)ではアイソフォーム同士の差異は認めなかった。また、副腎髄質クロマチン細胞、およびメラノーマ細胞において、複数のsyntaxinの存在が確認された。

結論: 非神経型 syntaxin のアイソフォームは、神経型の syntaxin-1Aと同様、myosin-Vと結合することが証明された。Myosin-Vは神経細胞以外にクロマフィン細胞やメラノーマ細胞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。またこれらが syntaxin-1Aと比べ若干弱いものの、myosin-VをCa依存性に結合できることが示された。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依存性に運動性を増大させることが見出された。その生理的意義は明らかでないが、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。以上のように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。

(論文審査の要旨)

Syntaxin familyは細胞内輸送を担う分子群で、神経細胞では syntaxin-1Aが開口放出を担う。一方、種々の非神経細胞には syntaxin アイソフォームが存在し、各細胞で重要な役割を果たしている。神経細胞では五十嵐らの研究グループが、小胞輸送の分子モーターmyosin-Vと syntaxin-1Aとの結合による小胞の tethering 機能を証明しており、申請者は同様の機構が非神経型 syntaxin アイソフォームについても成り立つかどうかを検討した。その結果、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。さらに申請者は、syntaxin-2, 3に関しては-1Aの場合に比べて、結合後のmyosin-Vの運動速度が速くなるという結果を証明した。よって、myosin-V結合のアイソフォーム間の性状比較で細かい差異が存在し、その点が各 syntaxin アイソフォームの機能的特性、すなわち細胞生物学的に固有の役割を表すと結論された。この結果は、syntaxin アイソフォームの意義の一端を明らかにしたものとして、学位論文に値すると判定された。