

ふりがな しやた あつし
氏名 車多 厚志
学位 博士(理学)
学位記番号 新大院博(理)第274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 Regulation of Cytosolic Protein Synaphin/Complexin Involved in Neurotransmitter Release
(細胞質タンパク質シナーフィン/コンプレキシンの神経伝達物質放出への関与)

論文審査委員 主査 教授 小谷 昌司
副査 教授 渡辺 勇一
副査 教授 内海 利男
副査 教授 大西 耕二
副査 助教授 阿部 輝雄

博士論文の要旨

神経細胞間での情報伝達は主として神経伝達物質を高濃度に含んだシナプス小胞が開口放出(エキソサイトーシス)され、シナプス後部へ化学的シグナルとして伝えられることによる。神経伝達物質の開口放出において中心的役割を果たすのが、SNARE蛋白質:syntaxin, SNAP-25, VAMP/synaptobrevinである。このSNARE蛋白質によるSNARE複合体形成が膜融合を導き、シナプス小胞に充填された神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。この神経伝達の開口放出は、SNARE複合体に結合する様々な細胞質蛋白質(Munc-181/nsec1, synaphin/complexinなど)により厳密に制御されていると考えられている。しかし、それらの作用機序、動態は未だ不明である。

本論文では、synaphin 1 および 2 分子中の 115 番のセリン残基が CK2 (カゼインキナーゼ 2) によるリン酸化予想部位であることに着目し、組換え蛋白質の synaphin 分子中の 115 番セリン残基が CK2 によってリン酸化されること、このリン酸化 synaphin (pS115-Synaphin) は SNARE 複合体との親和性が増強すること、そしてラット脳内で実際にリン酸化 synaphin が存在していることを見いだした。

これらの結果は、CK2 による 115 番セリン残基のリン酸化が synaphin 分子の活性を制御し、高速な伝達物質の開口放出を可能にしていることを示唆するものである。

さらに、ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部を用いて、シナプス小胞開口放出に関係する蛋白質分子の局在を免疫蛍光法で解析した。その結果、開口放出前後のシナプスにおいて、シナプス小胞の開口放出を制御している synaphin の局在が大きく変化することを見出した。その結果、SNARE 蛋白質である syntaxin、SNAP-25 は神経終末の細胞質膜に沿った局在が観察された。Rop (Munc18-1/nsec1) は細胞質全体に存在した。synaphin は開口放出前 (resting condition) では、syntaxin と同様に細胞質膜に沿った局在が見られた。高カリウム刺激によって開口放出を誘発すると、syntaxin、SNAP-25、Rop の局在は変化しなかったが synaphin は細胞質へと拡散した。

また、ショウジョウバエの synaphin 分子中にも CK2 によるリン酸化配列が存在していることから、生体内における synaphin の挙動との関係を調べた。その結果、CK2 の阻害剤である DRB および TBB で処理すると開口放出に伴う synaphin の局在の変化が見られなくなった。しかし、Ca²⁺ / CaM kinase II の

阻害剤である KN-93 および protein kinase A の阻害剤である KT5720 で処理すると開口放出に伴う synaphin の局在の変化が見られた。以上のことから、生体内での synaphin/complexin がダイナミックな動態を示すことを明らかにした。

論文審査の要旨

本論文では脳神経の機能の基盤である神経伝達物質の開口放出の分子機構を我々の研究室で発見した synaphin を中心に、そのリン酸化との関連において明らかにしようとしたものである。synaphin の組換えタンパク質をもちいた試験管内でのリン酸化実験により SNARE 複合体との結合定数が増加を示し、定量的な実験によるこのタンパクの開口放出調節における役割を明らかにした。また実際に本タンパク質のリン酸化型がラット脳に存在することを示した。またショウジョウバエ幼虫の神経・筋接合部の巨大シナプスに注目し、synaphin およびシナプトソームの膜融合にかかわるタンパク質群の動態を開口放出の前後において明らかにし、特にリン酸化による synaphin の局在変化を見だし、機能との関連を示唆する結果を得た。以上のように、本論文では試験管内の分子生物学的、生化学的研究からショウジョウバエの特殊なシナプスを利用した *in vivo* の実験まで、柔軟な発想と多彩な手法をもちいた研究にとりくみ、神経伝達物質放出とその調節機構に関する数多くの新知見をえたものであり、今後の展開も期待できる。また、神物質の放出機構は、現代分子生物学の重要なテーマの一つである、生体物質の分泌機構と直結するものであり、今回えられた結果の意義は大きい。結果の多くの部分はすでに国際誌に Shata, A. *et al.* (2007) *Phosphorylated synaphin/complexin found in the brain exhibits enhanced SNARE complex binding. Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 809-814 として掲載済みであり、後半についても投稿準備中である。学位論文は英文で明快に書かれている。以上、本論文は博士（理学）の学位論文として十分ふさわしい内容であると審査委員全員の意見が一致した。