

氏 名 三枝 智香

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大乙第 169 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 6 条第 2 項該当

学位論文題目 小胞輸送におけるシナプトタグミンファミリーの機能解析

論文審査委員 主 査 教授 山森 哲雄
教授 野田 昌晴
教授 大隅 良典
教授 藤澤 肇（名古屋大学）

論文内容の要旨

特定の蛋白質や脂質を含む膜画分（小胞）を細胞内小器官間に輸送する機構は、個々の細胞が形態、機能を維持する上で必要不可欠であり、小胞輸送と呼ばれている。ホルモンや神経伝達物質放出における小胞輸送機構の解析は古くからなされているが、これらの機能以外にも神経細胞の突起伸長、受精、膜修復等、様々な生命活動に小胞輸送は関与している。ホルモンや神経伝達物質は、細胞内で合成され、小胞体、ゴルジ体を経て、分泌小胞内に貯蔵される。その分泌小胞が、細胞膜上の分泌部位へ輸送され、最終的には分泌小胞膜と細胞膜とが融合し、分泌小胞内容物を細胞外へ分泌する。この一連の過程は、多様な分子によって緻密に制御されている。特に分泌小胞と細胞膜とが融合し、分泌小胞内容物を細胞外へ放出する過程は、開口放出と呼ばれている。この開口放出には、いくつかの素過程がある。分泌小胞はまず細胞膜上の分泌標的的部位に結合し（docking）、ATP 依存的に分泌可能な状態にされる（priming）。その後、外界の刺激によって、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、分泌小胞と細胞膜とが Ca^{2+} 依存的に融合（fusion）し、分泌小胞内容物が細胞外に放出される。この開口放出に関与する蛋白質として SNARE（soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors）蛋白質が同定されている。分泌小胞膜上の v-SNARE（VAMP-2）と細胞膜上の t-SNARE（SNAP-25、シンタキシン）との間で複合体が形成されることにより、分泌小胞と細胞膜が融合すると考えられている。しかし、SNARE 蛋白質自身には Ca^{2+} 結合能がないため、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を感知する Ca^{2+} センサーが SNARE 蛋白質とは別に必要であると考えられる。

Ca^{2+} 結合型膜蛋白質であるシナプトタグミンは、C 型タンデム C2 蛋白質ファミリーに属し、調節性開口放出時の Ca^{2+} センサーの有力候補と考えられている。シナプトタグミンファミリーのカルボキシル末端（C 末端）側には、 Ca^{2+} 結合領域であるタンデム C2 ドメインを有しており、 Ca^{2+} と結合し、アミノ末端（N 末端）側には膜貫通領域を有しており、分泌小胞膜上に局在すると考えられている。現在までのところ、シナプトタグミンファミリー蛋白質のように分泌小胞膜上に局在し、 Ca^{2+} にも結合する蛋白質は他には見つかっていない。

近年、タンデム C2 蛋白質に類似する蛋白質を網羅的に探索した結果、N 末端に、膜貫通領域を持たず、代わりに Rab27 結合ドメイン（Slp homology domain、SHD）を持つシナプトタグミン様蛋白質（Synaptotagmin-like protein、Slp）が同定された。Rab27 は、低分子量 GTP 結合蛋白質であり、分泌小胞膜上に局在することで、分泌小胞の細胞内輸送を制御する分子であることが、2000 年にヒトおよびマウスで報告された。Slp ファミリー蛋白質は、Rab27 と結合することから、細胞内小胞輸送において何らかの重要な役割を担うと考えられる。

Slp ファミリーが同定されたことから、C 型タンデム C2 蛋白質ファミリーは、開口放出時の Ca^{2+} センサーとして機能するだけでなく、細胞内小胞輸送の様々な過程を制御している可能性が高いと考えられた。シナプトタグミンファミリー、および Slp ファミリー蛋白質の機能を解明することは、細胞内小胞輸送機構の統合的な理解につながると考えられる。そこで本研究では、シナプトタグミンファミリー蛋白質の細胞内局在および発現様式の解析（第 I 章）と、Slp ファミリー蛋白質の細胞内小胞輸送における機能解析（第 II 章）を行った。

（第 I 章）シナプトタグミンファミリー蛋白質のうち、これまで主に解析が進められているのは、シナプス小胞開口放出におけるシナプトタグミン I の機能である。それ以外のシナプ

トタグミンファミリー蛋白質に関する解析はほとんど行われていない。シナプトタグミン III、V、VI、X は系統樹上で同じサブファミリーに属し、共通の生化学的特徴を持つことから、ユニークな機能を持つサブファミリーを形成すると考えられる。そこで本研究では、シナプトタグミン III、V、VI、X の細胞内局在について検討を行った。ホルモン分泌のモデル細胞として PC12 細胞を用い、緑色蛍光蛋白質 (GFP) 標識シナプトタグミンをこの細胞に強制発現させた。シナプトタグミン III、V、VI、X-GFP の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した結果、シナプトタグミン V-GFP のみが内在性のシナプトタグミン I 同様、神経突起の先端に集積していた。さらに、連続スクロス密度勾配遠心法により細胞内分布を解析した結果、シナプトタグミン V-GFP は主に有芯顆粒上に存在することが明らかとなった。シナプトタグミン V-GFP が存在する有芯顆粒は Ca^{2+} 依存的に開口放出をしたことから、シナプトタグミン V が Ca^{2+} センサーとしての機能を持つ可能性が示唆された。

次に、シナプトタグミン V のマウス生体内での発現様式を解析したところ、シナプトタグミン V は脳で発現しており、主に有芯顆粒上に分布していることが分かった。また、膵 α 細胞においても発現が認められ、シナプトタグミン V がグルカゴン分泌時の Ca^{2+} センサーである可能性が示唆された。

(第 II 章) Slp ファミリー蛋白質は、これまでヒトおよびマウスにおいて 5 種類が報告されている (Slp1-Slp5)。本研究では、Slp2-a のマウス生体内での機能解析を行った。まずマウス生体内での Slp2-a の発現様式を調べたところ、Slp2-a は胃において非常に高い発現を示し、主に胃表層粘液分泌細胞の頂端部に Rab27A/B と共局在していることが分かった。免疫沈降実験により、マウスの胃においても、Slp2-a と Rab27A/B が特異的に結合していることも明らかとなった。さらに Slp2-a 欠損マウスを作製し、胃表層粘液分泌細胞の形態を電子顕微鏡で観察したところ、細胞内の全粘液顆粒数および細胞膜とドッキングしている粘液顆粒の割合が、Slp2-a 欠損マウスにおいて野生型よりも有意に減少していた。頂端細胞膜の形態異常も、Slp2-a 欠損マウスの細胞において多く観察された。また、培養した胃細胞からの基礎粘液分泌量も、Slp2-a 欠損マウスにおいて有意に減少していた。以上の結果から、Slp2-a は胃表層細胞からの粘液分泌を制御していることが明らかとなった。

以上、本研究から、1) 膵 α 細胞における Ca^{2+} センサー候補分子を初めて同定し (シナプトタグミン V)、2) 胃表層粘液分泌細胞からの粘液分泌を制御する細胞内小胞輸送関連分子の同定 (Slp2-a、Rab27A、Rab27B) もすることができた。多様な内分泌、外分泌臓器からの開口放出機構を統合的に理解するためには、シナプトタグミンファミリー、Slp ファミリー蛋白質の詳細な機能解析を行うことが今後の課題である。

論文の審査結果の要旨

申請者は分泌小胞の輸送、融合、放出に関わるシナプトタグミンファミリー分子の細胞内局在の解析(第1章)、及びシナプトタグミン様タンパクの1つ Slp2-a の細胞内小胞輸送における機能解析(第2章)を行った。

Ca²⁺結合型膜蛋白質であるシナプトタグミンは、C型タンデム C2 蛋白質ファミリーに属し、調節性開口放出時の Ca²⁺センサーの有力候補と考えられている。これまで主にシナプス小胞開口放出におけるシナプトタグミン I の機能解析が進められてきたが、それ以外のシナプトタグミンファミリー蛋白質に関する解析はほとんど行われていない。そこで本研究(第1章)では、シナプトタグミン III、V、VI、X の細胞内局在について検討を行った。緑色蛍光蛋白質(GFP)標識シナプトタグミンを PC12 細胞に強制発現させ、細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した結果、シナプトタグミン V-GFP のみが内在性のシナプトタグミン I 同様、神経突起の先端に集積していた。さらに、連続スクロス密度勾配遠心法によりシナプトタグミン V-GFP は主に有芯顆粒上に存在することが明らかとなった。有芯顆粒は Ca²⁺依存的に開口放出をしたことから、シナプトタグミン V が Ca²⁺センサーとしての機能を持つ可能性が示唆された。次に、シナプトタグミン V のマウス生体内での発現様式を解析したところ、脳に発現しており、主に有芯顆粒上に分布していることが分かった。また、膵・細胞においても発現が認められ、グルカゴン分泌時の Ca²⁺センサーである可能性が示唆された。

最近、N 末端に膜貫通領域をもたず、代わりに Rab27 結合ドメインをもつシナプトタグミン様蛋白質(Slp)が同定された。Slp ファミリー蛋白質は、Rab27 と結合することから、細胞内小胞輸送において何らかの重要な役割を担うと考えられる。Slp ファミリー蛋白質は、これまで 5 種類が報告されている(Slp1-Slp5)。本研究(第2章)では、Slp2-a のマウス生体内での機能解析を行った。まずマウス生体内での Slp2-a の発現様式を調べたところ、Slp2-a は胃において非常に高い発現を示し、主に胃表層粘液分泌細胞の頂端部に Rab27A, B と共局在していることが分かった。免疫沈降実験により、Slp2-a と Rab27A, B が特異的に結合していることも明らかとなった。さらに Slp2-a 欠損マウスを作製し、胃表層粘液分泌細胞の形態を電子顕微鏡で観察したところ、細胞内の全粘液顆粒数および細胞膜とドッキングしている粘液顆粒の割合が、Slp2-a 欠損マウスにおいて野生型よりも有意に減少していた。また、培養した胃細胞からの基礎粘液分泌量も、Slp2-a 欠損マウスにおいて有意に減少していた。以上の結果から、Slp2-a は胃表層細胞からの粘液分泌を制御していることが明らかとなった。

以上、本研究は、膵・細胞における Ca²⁺センサー候補分子としてシナプトタグミン V を初めて同定するとともに、Slp2-a、Rab27A, B が胃表層粘液分泌細胞の粘液分泌のための小胞輸送に関わることを明らかにしたものである。この内容は開口放出の分子機構の一端を明らかにした優れた成果として評価でき、博士論文としての水準を充分満たすものであると審査員全員一致で判断した。