

Title	多種類の細胞骨格蛋白質と相互作用を示すカルモデュリン結合蛋白質（サイトシナリン）の微小管形成への役割
Author(s)	伊藤, 和幸
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35297
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	伊 藤 和 幸
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7 6 4 0 号
学位授与の日付	昭 和 6 2 年 3 月 2 6 日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	多種類の細胞骨格蛋白質と相互作用を示すカルモデュリン結合蛋白質 (サイトシナリン) の微小管形成への役割
論文審査委員	(主査) 教 授 吉 田 博 (副査) 教 授 西 村 健 教 授 和 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

細胞骨格は、エンドサイトーシス、エクソサイトーシス、細胞分裂等の細胞運動の基盤であり、近年その調節系としてカルシウム・カルモデュリン系の関与が注目されている。神経伝達もシナプス小胞のエクソサイトーシスという観点からみれば、細胞運動の典型例と考えられる。この神経伝達が行なわれる中心的場となるのがシナプスである。シナプスは特殊かつ高度に分化した細胞構築を示しており、この部位は極めて限定された細胞骨格蛋白質群が、その主要構成要素となっている。従って、シナプス部位における細胞骨格のCa²⁺制御機構解明は、神経伝達機構の分子論的追究の有力な方法と考えられる。今回、シナプトゾーム膜分画より新しいカルモデュリン結合蛋白質を分離精製し、この蛋白質がカルスベクチン、アクチン、チューブリン等のシナプスを構成する細胞骨格蛋白質と結合する事を明らかにし、サイトシナリンと名付けた。次いでサイトシナリンの微小管形成におよぼす役割を詳細に検討した。

[方 法]

シナプトゾーム膜、カルモデュリン、カルスベクチン、チューブリン及び微小管付属蛋白質 (MAPs) の主体をなすMAP 2、タウ因子は牛脳より、アクチンはウサギ骨格筋より精製した。サイトシナリンのニワトリ胎児初代培養細胞、マウス3T3細胞における細胞内局在は、抗サイトシナリン抗体を用いて蛍光顕微鏡観察した。サイトシナリンとカルモデュリンとの結合はアフィニティカラムにより、サイトシナリン結合蛋白質の検索は¹²⁵I-サイトシナリンを用いたトランスブロッティング法により行なった。アクチン線維のゲル化は落下球法により、チューブリンの重合は濁度測定法により定量した。又その各々についてネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行なった。アクチン、チューブリンへの各

蛋白質の結合は、遠心法により測定した。

[成 績]

非イオン界面活性剤 (Triton X-100) で処理したシナプトゾーム膜を 1 M KCl を含むリン酸バッファーで抽出後、ハイドロキシルアパタイトカラム、ホスホセルロースカラムを用いてサイトシナリンを精製した。得られたサイトシナリンは分子量35,000のリジン、アラニンに富む塩基性蛋白質 (P I = 9.0) であり、カルモデュリンとは生理的塩濃度において、 Ca^{2+} の有無にかかわらず結合した。サイトシナリンの細胞内局在は核周囲と細胞膜内側に局限しており、カルスベクチンの細胞内局在と一致した。次に、トランスプロッティング法により、サイトシナリンは細胞骨格蛋白質であるカルスベクチン、アクチン、チューブリンと結合することを明らかにした。サイトシナリンとアクチンとの結合は、低濃度のサイトシナリンで粘度上昇を来し、ネガティブ染色後の電子顕微鏡観察によりアクチン繊維束形成を示した。サイトシナリンとアクチンとの最大結合は、遠心法によりモル比で 1 : 6-7 であった。

低濃度のサイトシナリンで著しいチューブリンの重合がみられ、ネガティブ染色後の電子顕微鏡観察の結果、MAPs により形成された微小管 (直径24nm) より太い直径34nmの微小管形成が認められた。サイトシナリンにより形成された微小管は、MAPs による微小管と異なりGTPの有無あるいは低温に対して安定であった。次に、チューブリンに微小管形成に十分量のMAPsを加えた系にサイトシナリンを添加し、ネガティブ染色後電子顕微鏡観察を行なうと、サイトシナリン濃度の増加に伴い直径24nmの微小管から、直径34nmの太い微小管に変化することが明らかとなった。そこで精製したMAP2、タウ因子のチューブリンへの結合におよぼすサイトシナリンの影響を遠心法にて検討した結果、サイトシナリンの添加濃度の上昇に伴い、MAP2、タウ因子共にチューブリンへの結合が減少し、代わりにサイトシナリンのチューブリンへの結合が増加した (最大結合はモル比で 1 : 1)。また、チューブリンへの結合に関してはMAP2、タウ因子とサイトシナリンは競合していることが明らかになった。

[総 括]

サイトシナリンは、カルスベクチン、アクチン、チューブリン等シナプス部位の主要細胞骨格蛋白質と結合する事、さらに微小管形成に関しては、MAP2、タウ因子と競合してチューブリンに結合する事により直径34nmの太い微小管形成を行なう事を明らかにした。従ってサイトシナリンは、神経伝達を始めとする細胞運動に伴う細胞骨格間の相互作用の重要な因子である可能性が期待される。

論文の審査結果の要旨

シナプスは特殊に分化した構造を呈し、その主要構成要素は、アクチン、チューブリン、カルスベクチン、ニューロフィラメント等の限定された細胞骨格蛋白質群である。牛脳シナプトゾーム膜より新しく精製されたカルモデュリン結合蛋白質-サイトシナリンは、アクチン、チューブリン、カルスベクチンなど多種類の細胞骨格蛋白質と結合し、その機能制御を行なう。今回、特に微小管形成に対する作用を検討した結果、サイトシナリンが低濃度で著しいチューブリンの重合をおこし低温安定性の太い微小

管を形成する事、サイトシナリンが微小管付属蛋白質による微小管形成に対して、MAP2、タウ因子のチューブリンへの結合を濃度依存性に競合し、抑制的に働く事が明らかとなった。神経伝達もシナプトゾームのエクソサイトーシスといった細胞骨格を基盤とした細胞運動という面からみると、シナプス部位における細胞骨格制御は重要な問題である。サイトシナリンは其中で多種類の細胞骨格蛋白質と結合し、種々の機能制御を行なう事から重要な地位をしめると考えられる。その点から考えても今回の研究の意義は大きく、学位に値するものと思われる。