



Title	Characterization of the Interaction between Synapsin I and Calspectin (Brain Spectrin or Fodrin)
Author(s)	伊賀, 正英
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40741
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 伊 賀 正 英

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 3 3 2 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 9 年 6 月 30 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当
医学研究科 生理系専攻学 位 論 文 名 Characterization of the Interaction between Synapsin I and Cal-
spectin (Brain Spectrin or Fodrin)
(シナプシン I とカルスペクチンとの結合解析)論文審査委員 (主査)
教 授 祖父江憲治
(副査)
教 授 武田 雅俊 教 授 柳原 武彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 シナプシン I は神経終末においてアクチンと結合し、シナプス小胞のアクチンネットワークへの貯留に重要な役割を果たしている。カルスペクチンは細胞膜骨格を形成する主要蛋白質であるが、シナプス前部において、電顕上その形や大きさからカルスペクチンと思われるフィラメントが細胞膜より細胞質側に突き出している像が報告されている。また、in vitro においてシナプシン I がカルスペクチンと結合することが既に報告されている。しかしながら、その結合様式は未だ明らかではない。本論文では、シナプス前部における神経伝達物質放出に膜骨格蛋白質が関与していることを明らかにすることを目的として、シナプシン I とカルスペクチンとの結合の詳細な解析を行った。

〔方法〕 材料：シナプシン I とカルスペクチンは牛の脳皮質より精製、単離した。シナプシン I のフラグメントは 2-nitro-5-thiocyano benzoic acid (NTCB) を用いてシナプシン I をシステイン基で特異的に切断し、それらを精製した。また、カルスペクチンをトリプシンで分解し、結合部位の同定に用いた。シナプシン I に対するポリクローナル抗体はウサギより作製し、さらにシナプシン I の尾部だけに特異的な抗体をシナプシン I の尾部のフラグメントのアフィニティーカラムより精製した。

カルスペクチン結合分析実験：精製したカルスペクチンを ^{125}I で標識した。様々な濃度の ^{125}I で標識したカルスペクチンを $0.33\text{ }\mu\text{g}$ のシナプシン I と 1 時間混和後、シナプシン I の尾部に対する抗体を加え、さらにプロテイン A セファロースを加えて免疫沈降を行なった。シナプシン I に結合した ^{125}I で標識したカルスペクチンの量は γ カウンターにより測定した。

シナプシン I 結合分析実験：カルスペクチンとカルスペクチンをトリプシンで分解したフラグメントを SDS-PAGE により分離後、ニトロセルロース膜に転写した。その転写したニトロセルロース膜を洗浄後、 $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ のシナプシン I を加えて 2 時間室温で混和した。さらに、洗浄後、ニトロセルロース膜をパラホルムアルデヒドで固定し、洗浄後、シナプシン I の抗体を用いて結合したシナプシン I を検出した。

〔成績〕 NTCB で切断されたシナプシン I をプロットした後、 ^{125}I で標識したカルスペクチンを用いてゲルオーバーレイアッセイを行なったところ、カルスペクチンは 54 kDa 、 40 kDa 、 29 kDa 、 15 kDa のフラグメントに結合し、ま

たこれらの結合は50倍量の非標識カルスベクチンにより、阻害された。一方、35 kDa のフラグメントへの結合は認められなかった。これらの結果より、カルスベクチンはシナプシン I の頭部、中央部領域に結合し、C 末の尾部へは結合しないことが明らかとなった。

シナプシン I の尾部に対する抗体を用いた免疫沈降法の結果、シナプシン I とカルスベクチンの結合は K_d が 9 nM と非常に高い親和性を示した。またその結合は Ca^{2+} 非依存性であり、カルモデュリンはその結合に影響を与えなかった。シナプシン I は cAMP-dependent protein kinase (cAMP-PK), Ca^{2+} , calmodulin dependent protein kinase II (CaM-PK II) の主要な基質の 1 つと知られているが、それらの酵素によるシナプシン I の磷酸化のカルスベクチンとの結合に及ぼす影響について、同様に免疫沈降法を用いて調べた。その結果、結合は著しく抑制された。

トリプシンにより切断したカルスベクチンのフラグメントに対するシナプシン I の結合をシナプシン I の抗体を用いて調べた。その結果、シナプシン I はカルスベクチンの β 鎖の N 末のアクチン結合部位でもある 28 kD, 23 kD のフラグメントに結合することが明らかとなった。

〔総括〕 シナプシン I とカルスベクチンの結合の生体内における、生理的な役割については現在のところ明かではない。しかしながら、シナプシン I はシナプス小胞をアクチンネットワークに貯留するリザーバーとしての役割を果たすことが知られており、もしカルスベクチンが F-アクチン-カルスベクチン複合体としてアクチンネットワークに組み込まれているとすれば、カルスベクチンもシナプス小胞を貯留する役割を果たしているかも知れない。

一方、その形と大きさからカルスベクチンと思われるフィラメントがシナプス小胞とシナプス前部の細胞膜とを結び付けている像が電顕により報告されているが、もしこのフィラメントがカルスベクチンであるとすれば、シナプシン I とカルスベクチンとの結合はシナプス小胞の細胞膜へのドッキング、あるいはシナプス小胞のリサイクリングに何らかの役割を果たしている可能性があることが示唆された。

また、海馬のシナプスにおいて、 Ca^{2+} , cAMP をセカンドメッセンジャーとして利用することでシナプス前部における長期増強が現れるとの報告がある。

今回の結果で、cAMP-PK, CaM-PK II によるシナプシン I の磷酸化がシナプシン I とカルスベクチンの結合を抑制したことは、シナプス前部におけるこれらの結合の調節が長期増強に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

シナプシン I はシナプス前部において、アクチンメッシュワークへのシナプス小胞の貯留、あるいは神経伝達物質放出の調節に関与している。一方、カルスベクチンはシナプス前部および後部における膜骨格を形成する主要な蛋白質として知られている。シナプス前部において、シナプス前膜に直結したカルスベクチンとシナプシン I の結合が電顕で観察されているが、その詳細な結合様式は未だ明らかではなかった。本研究において、in vitro におけるシナプシン I とカルスベクチンとの結合様式の詳細な解析を行った。その結果、結合は K_d が 9 nM と非常に高親和性であること、また結合部位はシナプシン I の頭部、中央部領域、一方カルスベクチン側は β カルスベクチンの N 末であることを免疫沈降測定法、overlay assay 法により明らかにした。シナプシン I とカルスベクチンとの結合は Ca^{2+} 非依存性であり、cAMP-PK, CaM-PK II によるシナプシン I のリン酸化により、両者の結合は抑制された。以上の結果は、シナプス前膜におけシナプス小胞の結合、あるいは神経伝達物質放出の調節にシナプシン I とカルスベクチンの結合が関与している可能性を示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられる。