



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13329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大脳皮質より精製、単離した。シナプシンIのフラグメントは2-nitro-5-thiocyanobenzoic 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¹²⁵Iで標識した。様々な濃度の¹²⁵Iで標識したカルスペクチンを0.33 μg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¹²⁵I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 μg/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、¹²⁵I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ペクチンにより、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、カルスペ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 とカルスペクチンの結合は 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るなかった。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 の磷酸化のカルスペ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ペ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 はカルスペクチンの β 鎮の 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 とカルスペ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、もしカルスペクチンが F-アクチン-カルスペ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、カルスペ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ペ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ペクチンであるとすれば、シナプシン I とカルスペ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 とカルスペ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、カルスペ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ペ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 とカルスペ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、一方カルスペクチン側は β カルスペクチンの 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 とカルスペクチンとの結合は 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る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 とカルスペ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。