The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Interaction of Doc 2 with tctex-1, a Light Chain of Cytoplasmic Dynein
Author(s)	永野, 史子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41794
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	永野史子（ながの ふみこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15228　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Interaction of Doc 2 with tctex-1, a Light Chain of Cytoplasmic Dynein （Doc 2と細胞質ダイニン軽鎖 tctex－1との結合について）
論文審査委員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　米田　悦啓　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目的】

私共の研究室では、神経伝達物質放出の分子機構を研究する過程において、C 2領域と呼ばれるCa^{2+}結合領域を2個有する蛋白質Doc 2を見い出している。Doc 2にはαとβの2個のアイソフォームが存在し、C末端側のC 2領域以外に、N末端側にDoc 2に特異的なアミノ酸配列（DSR）が保存されている。Doc 2αは神経細胞に特異的に発現し、神経終末ではシナプス小胞に局在している。Doc 2αはシナプス前膜に局在するMunc13に結合することによってシナプス小胞のシナプス前膜へのドッキングを制御している。さらに、Doc 2α遺伝子欠損マウスの海馬CA 1領域の電気生理学的解析により、Doc 2αはシナプス小胞のシナプス前膜への輸送の効率を上げることによって、長期増強の形成にも関与していることが明らかになっている。一方、Doc 2βは種々の組織に普遍的に発現しているが、その機能についてはまったく不明である。そこで、本研究では、Doc 2βの機能の解明を目的として、種々の組織に普遍的に発現しているDoc 2結合蛋白質の同定を試みた。

【方法ならびに成績】

1）　yeast two-hybrid systemを用いたDoc 2結合蛋白質の同定　Doc 2αのDSRを含むN末端領域90アミノ酸残基（Doc 2α－N）をbaitとし、yeast two-hybrid systemを用いてrat brain cDNA libraryよりDoc 2結合蛋白質を検索した。その結果、9個のクローンが得られ、このうち2個が微小管モーター蛋白質細胞質ダイニンの軽鎖の1つであるtctex－1をコードしていた。tctex－1は、Doc 2βのDSRを含むN末端領域120アミノ酸残基（Doc 2β－N）にも結合したが、Doc 2αのC末端領域310アミノ酸残基（Doc 2α－C）には結合しなかった。ノーザンブロット解析により、tctex－1は種々の組織に普遍的に発現していることが明らかになった。

2）　in vitroおよびin vivoにおけるDoc 2とtctex－1の結合の検討　in vitro translation法を用いて［^{35}S］メチオニンでラベルしたtctex－1は、リコンビナント蛋白質GST－Doc 2α－Nとは結合したがGSTには結合しなかった。また、HeLa細胞に、HAタグをつけたDoc 2αとFLAGタグをつけたtctex－1を同時に発現させ、そのcell lysateを用いて抗HA抗体でDoc 2αの免疫沈降を行ったところ、FLAG－tctex－1が共に沈降されることが確認された。

3）　Doc 2とtctex－1との結合と細胞質ダイニン依存性小胞輸送との関連　細胞質ダイニンは、種々の細胞内小器官や小胞の微小管依存性輸送に関与することが報告されているが、そのうち早期エンドソーム（EE）から後期エ

ンドソーム（LE）への小胞輸送への関与は確立している。また、陽イオン非依存性マンノース6リン酸受容体（CIMPR）とそのリガンドのカテプシンD は、BHK細胞ではトランスゴルジ網（TGN）からEEを経由してLEへ輸送され、その後カテプシンDはさらにリソソームへ輸送され、CIMPRは再びTGN へ回収される。そこで、BHK細胞にHAタグをつけたDoc 2の変異体Doc 2 α－NやDoc 2 α－Cを発現させて、CIMPRとカテプシンDの局在の変化を検討した。変異体の発現していない細胞では、CIMPRは核の周囲に、カテプシンDは細胞質に粗大な顆粒状に免疫染色され、それぞれ、LEとリソソームへの局在を示すと考えられた。しかし、Doc 2 α－Nを発現した細胞では、CIMPR は細胞質全体に分散し、また、カテプシンD の粗大な顆粒は消失した。Doc 2 α－Cでは、Doc 2 α－Nに比べて程度は弱いながらも同様の変化が認められた。これらの結果から、Doc 2の変異体を発現した細胞では、CIMPRとカテプシンDのEEからLEへの小胞輸送に変化が生じることが明らかになった。

【総括】

本研究では、Doc 2と細胞質ダイニンの軽鎖の1つであるtctex－1が結合することが明らかになった。細胞質ダイニンは、重鎖、中間鎖、中間軽鎖および軽鎖から構成される。重鎖はATPase活性を示し、微小管に結合する。中間鎖はダイナクチンとともに小胞に結合する。軽鎖については、その機能は不明であったが、本研究において軽鎖の1つであるtctex－1がDoc 2と結合することが示された。さらに、Doc 2のtctex－1との結合部位であるN末端領域のみの変異体の過剰発現が、BHK細胞ではCIMPRとカテプシンDのEEからLEへの輸送に影響することが明らかになった。この輸送経路は微小管依存性であることから、Doc 2がtctex－1を介して細胞質ダイニンと小胞の結合に関与することによりこの輸送過程を制御すると考えられる。Doc 2 αがシナプス小胞に局在することから、Doc 2 βもまた非神経細胞においてなんらかの特異的な小胞に局在すると予想される。C末端領域の変異体の過剰発現がN末端領域の変異体の過剰発現と同様の効果を示したことから、Doc 2 βはC末端領域で小胞と結合すると考えられる。細胞質ダイニンは、EEからLEへの小胞輸送の他に、細胞分裂時における染色体の分離や紡錘体形成や核の移動、また、細胞内小器官の配置、神経軸索の逆行性輸送、小胞体からゴルジ体への輸送など、非常に多様な細胞機能に関与する。Doc 2は、これらの細胞質ダイニン依存性の細胞機能に関与する可能性があり、今後、さらに、Doc 2とtctex－1の結合の生理的意義を解析していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、C 2領域と呼ばれるCa^{2+}結合領域を2個有する蛋白質Doc 2の機能を明らかにする目的で、yeast two-hybrid systemを用いてDoc 2結合蛋白質の単離を試みた。その結果、微小管モーター蛋白質である細胞質ダイニンの軽鎖tctex－1がDoc 2のN末端側のDoc 2特異領域に結合することを明らかにした。また、Doc 2とtctex－1の結合はcell-free系およびintact cell系においても認められた。さらに、Doc 2がtctex－1を介して細胞質ダイニン依存性の微小管に沿った小胞輸送に関与することも示した。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。