

氏 名	ふじ 藤 田 恭 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1895 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 学 専 攻
学位論文題目	Phosphorylation of Munc-18 / n-Secl / rbSecl by Protein Kinase C —— Its Implication in Regulating the Interaction of Munc-18 / n-Secl / rbSecl with Syntaxin (プロテインキナーゼ C による Munc-18 / n-Secl / rbSecl のリン酸化—— Munc-18 / n-Secl / rbSecl とシンタキシンとの相互作用の調節におけるその関与)
論文調査委員	(主 査) 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 井 出 千 東 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

Phosphorylation of Munc-18 / n-Secl / rbSecl by Protein Kinase C —— Its Implication in Regulating the Interaction of Munc-18 / n-Secl / rbSecl with Syntaxin (プロテインキナーゼ C による Munc-18 / n-Secl / rbSecl のリン酸化—— Munc-18 / n-Secl / rbSecl とシンタキシンとの相互作用の調節におけるその関与)

藤田恭之, 佐々木卓也, 福井浩司, 小谷泰一, 木村敏啓, 畑裕, Thomas C. Sudhof, Richard H. Scheller, 高井義夫

(序説)

小胞輸送のメカニズムは, 1980年に2つの新たな方法が確立され, 分子レベルで理解できるようになってきた。その一つは, Rothman らが確立したゴルジ体を用いた小胞輸送の無細胞系の再構成実験系であり, 他の一つは, Schekman らが確立した酵母を用いた分子遺伝学的方法である。前者の方法を用いて小胞輸送に必要な蛋白質が数多く同定されたが, それらの大多数が後者の方法を用いて酵母の小胞輸送に必要な遺伝子として見い出されたもののホモログであることが明らかになってきた。それらの分子のうちの一つがシンタキシンであり, Munc-18 である。シンタキシンと Munc-18 は互いに結合する蛋白質であり, 細胞内小胞輸送, 特に神経細胞のプレシナプスで, シナプス小胞と前シナプス形質膜との結合・融合に関与していることが明らかになりつつある。シンタキシンと Munc-18 との結合を調節するメカニズムは, それらの機能の発現に大きな役割を果たすものと思われる。また一方, c-PKC (conventional PKC) が数多くの細胞において Ca^{2+} 依存性の分泌に関与していることが明らかになってきた。以上のデータをふまえ, PKC (C キナーゼ) によるリン酸化がシンタキシンと Munc-18 との結合に影響を与えるかどうかを検討した。

(研究結果)

1. PKC による Munc-18 のリン酸化

Munc-18 は、PKC、PKA (A キナーゼ)、CaMKII (カルモデュリンキナーゼ II) に対するリン酸化アミノ酸配列を有している。まず、Munc-18 がこれらのキナーゼによってリン酸化されるかどうかを検討した。Munc-18 は PKA や CaMKII によってはほとんどリン酸化をされなかったが、PS (ホスファチジルセリン)・Ca²⁺ 存在下にて c-PKC (conventional PKC) によってリン酸化された。PKC によって、1 モルの Munc-18 に対して約 1 モルのリン酸が取り込まれた。Munc-18 に対する PKC の Km 値は約 1 μ M であった。

2. PKC による Munc-18 のリン酸化部位の決定

PKC によって [γ -³²ATP] 存在下でリン酸化した Munc-18 を *Achromobacter* プロテアーゼ I にて完全消化し、C₁₈ カラムにかけたところ 30 以上のピークを認めた。それぞれのピークの放射性活性を測定し、2 つの大きなピークを得た。これらのピークのアミノ酸配列とリン酸化部位を調べたところ、S³⁰⁶ と S³¹³ がリン酸化されていることが明らかになった。

3. シンタキシンによる Munc-18 のリン酸化の抑制

シンタキシンは Munc-18 の結合蛋白質である。シンタキシンの存在下・非存在下にて Munc-18 の PKC によるリン酸化を調べた。まず、シンタキシンそのものはリン酸化されなかった。シンタキシン非存在下では Munc-18 はリン酸化されたが、シンタキシン存在下ではそのリン酸化は著しく抑制された。このことから、シンタキシンと結合した Munc-18 は PKC によってリン酸化されないことが明らかになった。

4. Munc-18 のリン酸化によるシンタキシンと Munc-18 の結合の抑制

最後に、Munc-18 の PKC によるリン酸化が Munc-18 とシンタキシンとの結合に影響を与えるかどうかを検討した。Munc-18 を [γ -³²ATP] 存在下・非存在下にて PKC と反応させて、リン酸化 Munc-18 と非リン酸化 Munc-18 を調製し、各々の Munc-18 とシンタキシンとの結合の強さを調べた。非リン酸化 Munc-18 はシンタキシンと結合したが、リン酸化された Munc-18 はほとんどシンタキシンと結合できなかった。このことから、Munc-18 のリン酸化は Munc-18 とシンタキシンとの結合を著しく抑制することが明らかになった。

(結語)

Munc-18 はシンタキシンの結合蛋白である。最近、両者が神経終末からの神経伝達物質の放出に大きな役割を果たしていることが最近の研究から明らかになりつつある。今回ここで、PKC が Munc-18 をリン酸化し、そのリン酸化が Munc-18 とシンタキシンとの結合に影響を与えることが明らかになった。すなわち、シンタキシンと結合した Munc-18 は PKC によってリン酸化されず、また、PKC によってリン酸化された Munc-18 はシンタキシンと結合できない。だが、これらは全て in vitro のデータであり、実際に生体内でもあてはまるかどうかについては現在の段階では明らかになっていない。また、いったん結合したシンタキシンと Munc-18 がどのようなメカニズムで解離するのかについてもまだ分かっていない。これらは今後に残された課題であろう。

今後、これらの分子の機能をより深く解明することによってプレシナプスからの神経伝達物質の放出機構が明らかになり、脳の高次機能の解析や痴呆の病態の解明などにつながっていくものと期待される。

論文審査の結果の要旨

小胞輸送のメカニズムは、ゴルジ体を用いた小胞輸送の無細胞系の再構成実験系と酵母を用いた分子遺伝学的方法という2つの新たな方法によって、分子レベルで理解できるようになってきた。前者の方法を用いて小胞輸送に必要な蛋白質が数多く同定されたが、それらの大多数が後者の方法を用いて酵母の小胞輸送に必要な遺伝子として見い出されたもののホモログであることが明らかになってきた。それらの分子のうちの一つがシンタキシンであり、Munc-18である。シンタキシンとMunc-18は互いに結合する蛋白質であり、細胞内小胞輸送、特に神経細胞のプレシナプスで、シナプス小胞と前シナプス形質膜との結合・融合に関与していることが明らかになりつつある。シンタキシンとMunc-18との結合を調節するメカニズムは、それらの機能の発現に大きな役割を果たすものと思われる。

本研究においては、c-PKC (conventional PKC) が、数多くの細胞において Ca^{2+} 依存性の分泌に関与していることから、PKC (Cキナーゼ) によるリン酸化がシンタキシンとMunc-18との結合に影響を与えるかどうかを検討した。まず、Munc-18が、PKCのよい基質であることが明らかになった。PKCによるMunc-18のリン酸化部位はS³⁰⁶とS³¹³であった。シンタキシンと結合したMunc-18はPKCによってリン酸化されず、また、PKCによってリン酸化されたMunc-18はシンタキシンと結合できないことが明らかになった。

以上により、PKCによるMunc-18のリン酸化が、シンタキシンとMunc-18との結合に影響を与えることが明らかになった。

この研究の結果を踏まえ、これらの分子の機能をより深く解明することによってプレシナプスからの神経伝達物質の放出機構が明らかになり、脳の高次機能の解析や痴呆の病態の解明などにつながっていくものと期待される。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。