

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 林 亜矢子

本研究は細胞間相互作用の解析において重要となる受容体等の膜タンパク質の細胞内外での動態を生細胞において直接観察するため、ペプチドタグを利用した膜タンパク質の新規可視化法の樹立を試みるとともに、その新規可視化法を神経細胞において応答のトリガーとして働くAMPA受容体動態の解析に適用したものであり、下記の結果を得ている。

1. 膜タンパク質の新規可視化は、合成したZIPペプチドを蛍光標識し膜タンパク質に融合したZIPペプチドを検出することで確立させた。これまでの抗体(IgG抗体は約150 kDa)等よりはるかに小さな分子(Zipペプチドは6 kDa)によるタンパク質の可視化を可能にした。ZIPペプチドによる膜タンパク質の可視化によってNIH3T3, COS細胞および海馬神経細胞の初代培養、アストロサイトにおいて細胞膜上に局在する受容体を特異的に観察できることが示された。
2. ZIPペプチドの解離定数は $K_d=1.3 \times 10^{-11} \text{ M}$  と小さく、高い親和性を示した。標識した細胞において、3時間まで観察可能であることが示された。この親和性及び安定性は、pH7.4及びpH5.4で共に保たれていることが示された。
3. pH感受性色素RhPMでラベルしたZIPペプチドを用いることで細胞膜上にだけでなく、細胞内に取り込まれた受容体を可視化できることが示された。
4. 海馬神経細胞においてAMPA受容体の取り込みをZIP-RhPMを用いて評価したところ、AMPA受容体を取り込まれたエンドソームがスパインや樹状突起で観察された。また、成熟したスパインではその多くにZIP-RhPMを用いて標識したAMPA受容体陽性エンドソームが見られた。
5. 樹状突起に存在するリサイクリングエンドソームを蛍光標識したトランスフェリンにより検出した結果、AMPA受容体陽性エンドソームと局在が異なる事が示された。
6. 海馬神経細胞においてAMPA受容体の取り込みをタイムラプスイメージングによって観察すると、スパイン及びシャフトで同調的に起こり、10分で飽和に達することが示された。また、輝度の立ち上がりのタイミングを解析することで、0.2~0.03 Hzで取り込みが起きていることが示唆された。
7. SEP-GluA1を用いることで、樹状突起及びスパインにおいてエキソサイトーシスが観察された。観察結果より、AMPA受容体のエンドサイトーシスがシナプスに近い場所で起き、表面にあるAMPA受容体の数を調整するために細胞内にあるAMPA受容体のリサイクリングプールが重要である可能性が示唆された。

以上、本論文はペプチドタグを用いて受容体動態を可能にした。本研究は、これまで生き

た細胞では追えなかった受容体エンドサイトーシスを可視化し、直接観察することを可能とした。細胞内に取り込まれた受容体の運命を個々の受容体を可視化することで複雑な運搬のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。