

論文内容要旨

SNARE protein Syntaxin 3 is involved in
functional regulation of serotonin transporter
(SNARE タンパク質 Syntaxin 3 はセロトニン
トランスポーターの機能制御に関わる)

主指導教員：入船 正浩教授
(医系科学研究科 歯科麻酔学)

副指導教員：津賀 一弘教授
(医系科学研究科 先端歯科補綴学)

副指導教員：兼松 隆特任教授
(医系科学研究科 細胞分子薬理学)

本池 芹佳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景と目的】

セロトニントランスポーター(SERT)は、神経終末から放出されたセロトニン(5-HT)を神経終末に再取り込みすることにより、5-HT 神経伝達の終了を担う膜タンパク質である。SERT は翻訳された後に小胞体(ER)にて糖鎖修飾を受ける。その後、ゴルジ体を経由し、細胞膜へと運ばれる。以前の研究で、SERT の C 末端の膜輸送と糖鎖修飾に対する役割を明らかにするために、SERT の C 末端欠損変異体(SERT Δ CT)の特性を検討した。SERT Δ CT は、折りたたみ不全タンパク質であり、膜輸送が阻害され ER に停留すること、および ER ストレスは、SERT の膜輸送を障害し SERT を ER に停留させ、SERT Δ CT と同様な状態を作ることが明らかになった。

SERT や SERT Δ CT の膜輸送を促進する薬物は、SERT の機能修飾を介して 5-HT 神経伝達を変化させうる。また、このような薬物は、ER ストレス緩和作用を持つことも期待できる。我々は、SERT Δ CT の取り込み活性を著明に改善させる薬物としてシグマ 1 受容体作用薬の SKF-10047 を見出した。また、SKF-10047 の 24 時間投与で変動する遺伝子として、膜輸送に重要な働きを持つ Syntaxin3(STX3)を同定した。そこで本研究では、SERT 機能に及ぼす STX3 の影響について検討した。

【結果】

① SERT に対する STX3 過剰発現の影響

Myc-DDK-STX3 cDNA と野生型 FLAG-SERT を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞(HEK293 の亜型)および COS-7 細胞に遺伝子導入した。また、FLAG-SERT 安定発現 HEK293 細胞(FLAG-SERT HEK 細胞)には Myc-DDK-STX3 cDNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質取り込み量を平均し、取り込み活性として測定した。その結果、一過性 FLAG-SERT 発現 AD293 細胞、COS-7 細胞では、STX3 の過剰発現は、SERT 取り込み活性を減少させた。

一方、western blotting による検討では、STX3 の過剰発現により、SERT タンパク質の完全糖鎖修飾体が減少した。

Myc-DDK-STX3 と HA-SERT を COS-7 細胞に発現させて蛍光免疫染色にて観察すると、HA-SERT、Myc-DDK-STX3 は、主に小胞体やゴルジ体で共局在し一部凝集体を形成することが確認された。また、STX3 が過剰発現している細胞では SERT の膜発現が抑制された。

これらの結果から、過剰発現された STX3 は SERT をゴルジ体や小胞体に留め、凝集して細胞膜発現を抑制する可能性があることが示唆された。

② SERT に対する STX3 ノックダウンの影響

STX3 siRNA と野生型 SERT を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞および COS-7 細胞に遺伝子導入した。また、FLAG-SERT HEK 細胞には STX3 siRNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に取り込み活性を測定したところ STX3 のノックダウンは、いずれの細胞でも影響を及ぼさなかった。

一方、western blotting では、STX3 のノックダウンにより、SERT の完全糖鎖修飾体のバンドが上方移動した。また、糖鎖切断酵素の検討から、この上方移動は糖鎖修飾の変化に起因するものであることが明らかとなった。

この結果から、STX3 は SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を与えることが示唆された。

③ 内在性に SERT と STX3 を発現するヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞における、SERT の局在および取り込み活性の検討

Caco-2 細胞の内在性 SERT および STX3 の局在を免疫蛍光染色で観察したところ、SERT と STX3 は微絨毛マーカーの villin と共局在し、SERT と STX3 の一部は微絨毛に局在することが明らかとなった。

STX3 siRNA を、電気穿孔法を用いて Caco-2 細胞に遺伝子導入した。72 時間後、単位タンパク質あたりの³H]5-HT の取り込み量を、SERT の取り込み活性として測定した。その結果、Caco-2 細胞では、STX3 をノックダウンすると、SERT 取り込み活性が抑制された。

これらの結果から、STX3 は Caco-2 細胞において共局在する SERT の機能を調整する可能性があることが示唆された。

【考察とまとめ】

以上の結果から、AD293 細胞と COS-7 細胞では SERT と STX3 は細胞内で共局在し、STX3 は SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を与えることが考えられた。また、Caco-2 細胞においても、STX3 は共局在する SERT の取り込み活性を正に制御することが示唆された。本研究より、STX3 は SERT の膜輸送の過程で SERT と共局在し、SERT の機能を調節する可能性が示唆された。