

平成 21年 5月 15日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300127
 研究課題名 (和文) シナプス前性タンパク質のリン酸化によるシナプスおよび脳機能の制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Functional roles of PKC-dependent SNAP-25 phosphorylation in brain function.
 研究代表者
 高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)
 北里大学・医学部・教授
 研究者番号：10318826

研究成果の概要：

SNAP-25 はシナプス前部に発現するタンパク質で、神経伝達物質の放出に必須な役割を果たしている。SNAP-25 の Ser¹⁸⁷ はプロテインキナーゼ C によってリン酸化を受けるが、その機能的な役割については明らかではなかった。今回プロテインキナーゼ C による神経伝達物質の放出制御にそのリン酸化が必須であり、ストレス応答などの脳機能や、てんかん発作など疾患に深く関わっていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質、SNARE タンパク質、開口放出、シナプス前性制御、タンパク質リン酸化、ストレス

1. 研究開始当初の背景

シナプス可塑性は記憶や学習などの細胞基盤であり、その機構解明は現在の神経科学の重要な課題となっている。シナプス伝達を担う神経伝達物質の放出はリン酸化によって制御されており、その制御がシナプス可塑性の一つの重要な機構と考えられている。多くの研究から神経伝達物質放出が多様なタンパク質キナーゼによって促進的に制御されていることが明らかにされたが、シナプシンのようなごく少数の例外を除き、どのようなタンパク質のリン酸化によってどのよう

な機構で放出制御が起こっているか、それらのリン酸化がどのような脳の機能の発現に関わっているのかなどの多くの重要な問題が未解決のまま残されていた。

2. 研究の目的

本研究はプロテインキナーゼ C (PKC) を介した神経伝達物質放出の制御機構を分子レベルおよび細胞レベルで明らかにすると共に、リン酸化部位に変異を加えた遺伝子改変マウスを用いて、そのリン酸化がどのような脳の機能の発現に関わっているかを明ら

かにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 抗体の作成

抗リン酸化抗体は SNAP-25 の C 末付近の配列 (IMEKADS(Pi)NKTRI) を持つ合成リン酸化ペプチドをウサギに免役し、得られた抗血清から抗原ペプチドを用いたアフィニティーカラムを用いて精製した。SNAP-25a および SNAP-25b 特異抗体は両者の配列が最も異なる部位の合成ペプチド (SNAP-25a, LDRV EEGMNHINQD; SNAP-25b, LERI EEGMDQINKD) を抗原とし、抗原ペプチドを用いたアフィニティーカラムを用いて精製した。

2) 免疫組織化学

パラホルムアルデヒドで還流固定したマウスの脳のパラフィン切片を作成し、免疫組織化学を行った。必要な場合にはプロテアーゼ K を用いて抗原賦活化を行った。

3) ストレス実験

拘束冷水ストレスはマウスを空気穴を開けた 50ml 遠心管に閉じこめ、18°C の冷水に 30 分漬けた。

4) ノックインマウスの繁殖

ノックインマウスは体外受精を用いて計画的に同腹の野生型およびホモ変異体を出生させ使用した。

4. 研究成果

1) SNAP-25 ファミリータンパク質の

脳内発現

SNAP-25 にはスプライシングによって生じた SNAP-25a および SNAP-25b の 2 種類のアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームの脳内発現やリン酸化による機能調節の機構の違いを明らかにするため特異抗体を作成し解析を行った。リコンビナントタンパク質を用いて特異性を調べたところ、得られた抗体は他のアイソフォームとは互いに交差製を示さないことが確認された。リコンビナントタンパク質を基準として、成体マウス海馬での発現量を定量的イムノブロット法で調べたところ、SNAP-25b の発現量は SNAP-25a や、様々な組織に普遍的に発現する SNAP-23 の 10 倍であることが明らかとなった。細胞分画法で調べると、SNAP-25b や SNAP-23 は膜分画に多く含まれるのに対し、SNAP-25a のかなりの割合が、可溶性分画である LS2 分画に来ることが明らかとなった。PC12 細胞を用いて細胞内局在を調べたところ、SNAP-25b は細胞膜に局在するのに対し、SNAP-23 や SNAP-25a は細胞質に存在することが明らかとなった。マウスの脳を免疫組織化学で調べると、SNAP-25a、SNAP-25b および SNAP-23 は異なる脳内分布を示すことが明らかとなっ

た。以上のことから SNAP-25 の各アイソフォームは脳内で異なる局在を示し、異なる機能を担っていることが明らかとなった。

2) SNAP-25 のリン酸化による、神経伝達物質の放出促進機構の解明

開口放出による神経伝達物質の放出には SNARE タンパク質 (SNAP-25, Syntaxin, VAMP-2) が複合体を形成することが必要である。今回組替えタンパクを用いた解析により、SNAP-25 の Ser¹⁸⁷ が PKC によってリン酸化を受けると Syntaxin との結合の親和性が増加することを明らかにした。さらに副腎髄質細胞を用いた電気生理学的解析からは、リン酸化が起こると分泌小胞プールが増大し放出が促進されることも示した。またインスリン分泌細胞を用い、SNAP-25 のリン酸化が、PKC 依存的な開口放出の促進に不可欠であることも明らかにした。

3) SNAP-25 のリン酸化が見られる脳内部位の特定と、生理的な役割の解明

抗リン酸化 SNAP-25 抗体を用いたイムノブロット解析から、SNAP-25 のリン酸化の度合いが脳皮質や海馬、扁桃体で特に高いことを示した。マウスを冷水ストレスへの暴露やカイニン酸による痙攣誘導の際、これらの部位で SNAP-25 のリン酸化が更に亢進し、ストレスから解放すると速やかに負荷前のレベルにまで減少した。これらの結果からストレスや痙攣発作などの生理的な変化や脳機能異常によって SNAP-25 のリン酸化が大きく変動することが判った。

副腎を摘出したマウスに冷水拘束ストレスを加えた場合にも、脳内各部位での SNAP-25 のリン酸化の亢進が見られることから、恐らくは扁桃体で関知されるストレス刺激は、HPA 軸を介さずに直接脳内各部位に伝えられると考えられた。

4) ストレス脆弱性機構の解明

PKC によるリン酸化部位である Ser¹⁸⁷ を Ala に置換した SNAP-25 変異マウスはさまざまな興味深い行動異常を示す。ホモ変異体マウスを高ストレス環境である、代謝ケージに入れて飼育を行ったところ摂食や飲水をほとんどしなくなってしまい、1 週間以内に実験に用いた全個体が死亡した。このような拒食傾向は通常の飼育ケージでも見られ、個別飼育した後のしばらくはケージ交換の様な些細な刺激で拒食に陥ることが分かった。ホモ変異体はしばしば自傷行為を行うほか、痙攣発作を起こすことも観察された。

SNAP-25 のノックインマウスのストレス脆弱性の機構を調べるため、拘束ストレスを加えた際の血中コルチコステロン濃度の変化を調べたところ、野生型との間に顕著な差が

見られないことが明らかとなった。さらに海馬のグルココルチコイドレセプターの発現量をイムノブロット解析で調べたが、やはり顕著な差は認められなかった。以上のことから、ストレス脆弱性の原因はHPA軸の上流にあることが推察された。

5) SNAP-25 リン酸化部位変異マウスで見られる脳内変化の解析。

SNAP-25 のノックインマウスの脳の生化学的および組織化学的解析を行ったところ、ホモ変異マウスでは海馬を含む広い領域でアストロサイトの活性化が見られ、海馬自体大きかった。さらに海馬歯状回での新生ニューロン数も野生型の2倍近く増加していた。海馬や大脳皮質ではBDNF、ニューロペプチドY(痙攣や不安感に関与)の発現量も著しく増加していた。様々な週齢のSNAP-25-KIマウスを解析した結果、生後3週頃に海馬歯状回顆粒細胞層でc-fosの特異的な発現が見られ、その後上述の変化が生じてくる事が明らかとなった。

6) 末梢組織でのSNAP-25リン酸化の役割

SNAP-25は自律神経終末や内分泌細胞にも発現し、さまざまな末梢機能の制御にも関わっている。生後1年くらいのホモマウスは痩せており、平均体重は雄で野生の6割程度でしかなかった。野生型マウスの体重は生後15週位までに急激に増加した後もゆっくりと増加するが、変異マウスは生後の急激な体重増加が野生型より小さいのみならず、体重増加が15週付近で停止するという際だった特徴を示した。ホモ変異体では体脂肪の蓄積が極めて貧弱で、下腹部や卵巣や腎臓の周囲の内臓脂肪の発達が悪いことが明らかとなった。ホモ変異体の平均の摂食量は野生型と差が無いが、飼育日数と共に体重差が大きくなっていった。以上のことから、ホモ変異体ではエネルギー代謝にも何らかの異常が生じており、末梢神経系でのSNAP-25のリン酸化が何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Kataoka M, Sekiguchi M, Takahashi M (2009) Identification of a minimal segment of complexin II essential for preferential distribution in axons. *J Neurochem*, 108: 1109-1115. (査読有)
- ② Pozzi D, Condliffe S, Bozzi Y, Chikhladze M, Grumelli C,

Proux-Gillardeaux V, Takahashi M, Franceschetti S, Verderio C, Matteoli M. (2008) Activity-dependent phosphorylation of Ser¹⁸⁷ is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 323-328. (査読有)

- ③ Shu Y, Liu X, Yang Y, Takahashi M, Gillis KD (2008) Phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells. *J Neurosci*. 28: 21-30. (査読有)
- ④ Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:19498-503. (査読有)
- ⑤ Morita M, Saruta C, Kozuka N, Okubo Y, Itakura M, Takahashi M, Kudo Y. (2007) Dual regulation of astrocyte gap junction hemichannels by growth factors and a pro-inflammatory cytokine via the mitogen-activated protein kinase cascade. *Glia*, 55: 508-515. (査読有)
- ⑥ Taniguchi M, Taoka M, Itakura M, Asada A, Saito T, Kinoshita M, Takahashi M, Isobe T, Hisanaga SI. (2007) Phosphorylation of adult type Sept5 (CDCrel-1) by cyclin-dependent kinase 5 inhibits interaction with syntaxin-1. *J Biol Chem*, 282: 7869-7876. (査読有)
- ⑦ Yang Y, Craig TJ, Chen X, Ciufo LF, Takahashi M, Morgan A, Gillis KD (2007) Phosphomimetic mutation of Ser-187 of SNAP-25 increases both syntaxin binding and highly Ca²⁺ sensitive exocytosis. *J Gen Physiol*, 129: 233-244. (査読有)
- ⑧ Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y. (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci*, 10: 691-701. (査読有)
- ⑨ Shimizu S, Yoshida T, Wakamori M, Ishii M, Okada T, Takahashi M, Seto M, Sakurada K, Kiuchi Y, Mori Y (2006) Ca²⁺-calmodulin-dependent

myosin light chain kinase is essential for activation of TRPC5 channels expressed in HEK293 cells. *J Physiol*, 570.2: 219-235 (査読有)

- ⑩ Inamura M, Itakura M, Okamoto H, Hoka S, Mizoguchi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Yamamori S, Takahashi M (2006) Differential localization and regulation of stargazin-like protein, γ -8 and stargazin in the plasma membrane of hippocampal and cortical neurons. *Neurosci Res*, 55: 45-53. (査読有)
- ⑪ Sadakata T, Itakura M, Kozaki S, Sekine Y, Takahashi M, Furuichi T. (2006) Differential distributions of the Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *Comp Neurol*, 495: 735-753. (査読有)
- ⑫ Hosokawa T, Saito T, Asada A, Ohshima T, Itakura M, Takahashi M, Fukunaga K, Hisanaga S (2006) Enhanced activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II upon downregulation of cyclin-dependent kinase 5-p35. *J. Neurosci Res*, 84: 747-754. (査読有)
- ⑬ Kataoka M, Kuwahara R, Matsuo R, Sekiguchi M, Inokuchi K, Takahashi M (2006) Development- and activity-dependent regulation of SNAP-25 phosphorylation in rat brain. *Neurosci Lett*, 407: 258-262. (査読有)
- ⑭ Kakizaki A, Takahashi M, Akagi H, Tachikawa E, Yamamoto T, Taira E, Yamakuni T, Ohizumi Y (2006) Ca^{2+} channel activating action of maitotoxin in cultured brainstem neurons. *Eur J Pharmacol*, 536: 223-231 (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. M. Takahashi, Roles of Protein Phosphorylation in Neuronal and Glial functions. USA-Japan joint meeting for Glial Research, Mar., 2008, Philadelphia
2. 高橋正身 SNAP-25 変異マウスの解析—分子から行動へ—三菱化学生命科学研究会公開セミナー“Clocks, Around The Clock” 2008 年 4 月, 東京
3. 渡辺和泉, 板倉誠, 山森早織, 高橋正身

Stargazin-like protein, γ -8 is associated with calcineurin in rat hippocampus. *Neuroscience 2008* (第 31 回日本神経科学大会) 2008 年 7 月, 東京

4. 山森早織, 内田達也, 東貞宏, 片岡正和, 高橋正身 Neuropeptide Y is increased in the brain of Snap-25 mutant mice. *Neuroscience 2008* (第 31 回日本神経科学大会) 2008 年 7 月, 東京
5. 菅谷大地, 山森早織, 板倉誠, 高橋正身 Stress-induced phosphorylation of SNAP-25 in mouse brain. 第 51 回日本神経化学会大会, 2008 年 8 月, 富山
6. 高橋正身 毒素が拓いた情動異常の研究 第 54 回毒素シンポジウム 2007 年 9 月 大阪府犬鳴
7. 高橋正身, 板倉誠, 安田圭一, 菅谷津貴子 リン酸化によるグリア細胞の機能制御 *Neuro2007* (第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会) 2007 年 9 月、横浜
8. 兼田悠, 高橋正身, 片岡正和 ComplexinII と Parkin との相互作用 *Neuro2007* (第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会) 2007 年 9 月、横浜
9. 山森早織, 板倉誠, 菅谷大地, 高橋正身 マウス脳での SNAP-25 family タンパク質の局在の解析 *Neuro2007* (第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会) 2007 年 9 月、横浜
10. 発表者 (所属): 安田圭一, 板倉誠, 菅谷津貴子, 山森早織, 高橋正身 C6 グリオーマではホルボールエステルによって開口放出が抑制される。 *Neuro2007*

- (第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会) 2007年9月、横浜
11. 板倉誠、菅谷津貴子、山森早織、深谷昌弘、渡辺雅彦、高橋正身 電位依存性カルシウムチャネル γ -5 および γ 7 は AMPA 型受容体と複合体を形成している。Neuro2007 (第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会) 2007年9月、横浜
 12. 三木崇史、清中茂樹、瓜生幸嗣、若森実、森恵美子、板倉誠、高橋正身、Kevin Campbell、森泰生 錐体・桿体ジストロフィー遺伝変異 RIM1 による電位依存性カルシウムチャネルの機能変化解析。Neuro2007 (第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会) 2007年9月、横浜
 13. 清中茂樹、木崇史、野中美央、瓜生幸嗣、若森実、森恵美子、原雄二、Michel De Waard、板倉誠、高橋正身、尾藤晴彦、Kevin Campbell、森泰生 アクティブゾーンタンパク質 RIM1 と電位依存性カルシウムチャネルの機能的相互作用 Neuro2007(第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会) 2007年9月、横浜
 14. 鈴木映二、高橋正身 神経伝達物質の放出とストレス脆弱性との関連 ; SNAP25 遺伝子改変マウスでの検討 第23回日本ストレス学会学術総会 2007年11月、東京
 15. M. Kataoka, S. Yamamori, T. Sato, E. Suzuki, S. Watanabe, H. Miyaoka, S. Ikegami, R. Kuwahara, R. Suzuki-Migishima, Y. Nakahara, K. Inokuchi, Y. Kato-Fukui, S. Azuma, M. Yokoyama, and M. Takahashi. Phosphorylation of SNAP-25, an essential protein for neurotransmitter release, is essential for the emotional homeostasis in mouse. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 第79回日本生化学学会大会/第29回日本分子生物学会大会, 2006年6月, 京都
 16. H. Kaneda, M. Mori, Y. Hashimoto, M. Sekiguchi, M. Takahashi, M. Kataoka. Preferential axonal localization of a presynaptic soluble protein, Complexin II. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 第79回日本生化学学会大会/第29回日本分子生物学会大会, 2006年6月, 京都
 17. M. Taniguchi, M. Taoka, M. Itakura, A. Akiko, T. Saito, M. Takahashi, T. Isobe, S. Hisanaga. Cdk5 suppresses the interaction of Septin5 (CDCre-1) with syntaxin -1A by phosphorylation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 第79回日本生化学学会大会/第29回日本分子生物学会大会, 2006年6月, 京都
 18. 高橋正身 シナプスタンパク質 SNAP-25 のリン酸化部位変異マウスの解析. 第31回広島神経医学会研究会 2006年7月, 広島
 19. M. Kataoka, S. Yamamori, T. Sato, E. Suzuki, S. Watanabe, H. Miyaoka, S. Ikegami, R. Kuwahara, R. Suzuki-Migishima, Y. Nakahara, I. Nihonmatsu, K. Inokuchi, Y. Kato-Fukui, S. Azuma, M.

- Yokoyama, and M. Takahashi, A single amino acid substitution of SNAP-25 at PKC-dependent phosphorylation site markedly increases the stress-vulnerability in mice. 29th Japan Neuroscience Meeting Satellite Symposium. Mouse genetical manipulations as tools for understanding brain function. 2006年7月, 京都
20. 板倉誠、山森早織、高野幸太、高橋正身、2つのアイソフォーム SNAP-25a,b は脳内で異なる局在を示す. 第29回日本神経科学学会大会, 2006年7月, 京都
21. 深澤有吾、板倉誠、高橋正身、斉藤喜人、井ノ口馨、E. Monlnar、重本隆一凍結割断レプリカ免疫標識法を用いた海馬神経細胞膜上イオンチャネル型グルタミン酸受容体分布の高解像度解析. 第29回日本神経科学学会大会, 2006年7月, 京都
22. 板倉誠、安田圭一、菅谷津貴子、山森早織、高橋正身 Phorbol 12-myristate 13 acetate suppresses Ca²⁺-dependent peptide hormone release from astrocyte. 第49回日本神経化学学会大会 (第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会) 2006年9月, 名古屋
23. 山森早織、勝又修、山科正平、朝倉哲也、佐藤拓、鈴木映二、渡辺滋、宮岡等、東貞宏、片岡正和、高橋正身 Reactive astrogliosis in hippocampus of SNAP-25 mutant mouse. 第49回日本神経化学学会大会 (第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会) 2006年9月, 名古屋
24. 鈴木映二、佐藤拓、朝倉哲也、山森早織、東貞宏、渡辺滋、横山正宗、宮岡等、片岡正和、高橋正身 SNAP-25 変異ノックインマウス脳における神経伝達物質に

関する研究 第49回日本神経化学学会大会 (第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会) 2006年9月, 名古屋

〔図書〕 (計 4件)

- ① Takahashi, M. (2008) Synapse. In M. D. Binder, N. Hirokawa, U. Windhorst (Eds.) Encyclopedia of Neuroscience (pp. 3916-3932). Heidelberg: Springer.
- ② Takahashi, M. (2008) FM1-43. In M. D. Binder, N. Hirokawa, U. Windhorst (Eds.) Encyclopedia of Neuroscience (pp. 1589-1591). Heidelberg: Springer.
- ③ 高橋正身*、板倉誠、山森早織: アストロサイトにおける神経伝達物質の開口放出. Brain and Nerve, 59, 697-706 (2007)
- ④ 高橋正身*、板倉誠: 神経伝達物質の放出を制御するシグナル. 蛋白質核酸酵素 53, 453-458 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 10318826

(2) 研究分担者

板倉 誠 (ITAKURA MAKOTO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 30398581

東 貞宏 (AZUMA SADAHIRO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 80348507

片岡 正和 (KATAOKA MASAKAZU)

信州大学・工学部・准教授

研究者番号: 90332676