

平成23年5月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590209
 研究課題名（和文）シナプトタグミン1のSNAP-25への結合の神経伝達物質放出における生理的意義
 研究課題名（英文）Physiological significance of synaptotagmin-SNAP25 binding in neurotransmitter release
 研究代表者
 西木 禎一（NISHIKI TEIICHI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70423340

研究成果の概要（和文）：神経伝達物質放出のしくみを解明するため、シナプトタグミン（syt）と SNARE 複合体の結合について調べた。予想とは異なり、syt はカルシウムイオン非存在下において SNARE の構成因子の一つ SNAP-25 と結合せず、別の構成因子シンタキシン（stx）と結合したことから、syt-stx 結合について解析を進めた。その結果、静止状態の神経終末において syt が stx を介して SNARE に結合し膜融合を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To understand mechanisms of neurotransmitter release, the binding of synaptotagmin (syt) to SNARE complexes (SNAP-25-syntaxin-synaptobrevin) was studied. Surprisingly, whereas SNAP-25 did not bind syt, which differs from previous findings, syntaxin bound syt in the absence of calcium ion (Ca^{2+}). Point mutagenesis and liposome fusion assay provide biochemical evidence that syt binds SNARE complexes via syntaxin before Ca^{2+} influx into presynaptic nerve terminals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：神経科学、シナプス伝達、シナプス小胞、カルシウムイオン、開口放出

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達を担っている神経伝達物質はシ

ナプス前終末においてシナプス小胞に蓄えられている。神経細胞の興奮に伴い終末内に流入し

てきたカルシウムイオン(Ca^{2+})が、シナプス小胞膜とシナプス前膜の膜融合を引き起こし、伝達物質は開口放出される。この Ca^{2+} 依存性伝達物質放出にはシナプス小胞膜タンパク質シナプトタグミン1への Ca^{2+} の結合が必須である。 Ca^{2+} と結合したシナプトタグミンは、SNAP受容体タンパク質(SNARE)と呼ばれるタンパク質複合体を活性化し膜融合を引き起こすと考えられている。SNARE複合体は、シナプス前膜に存在するSNAP-25とシンタキシン、シナプス小胞に局在するシナプトブレビンからなる(図1)。これら3種類のタンパク質がシナプス小胞膜とシナプス前膜の間でコイルドコイル構造をもつ複合体を形成することが膜融合に重要であることが示されている。したがって、シナプトタグミン1とSNARE複合体の相互作用の解明は神経伝達物質放出のメカニズムを分子レベルで理解する上でとても重要な課題である。しかし、両者の結合については実験材料や測定方法の違いなどから研究グループによって結果が異なり、統一した見解は得られておらず不明のままである。

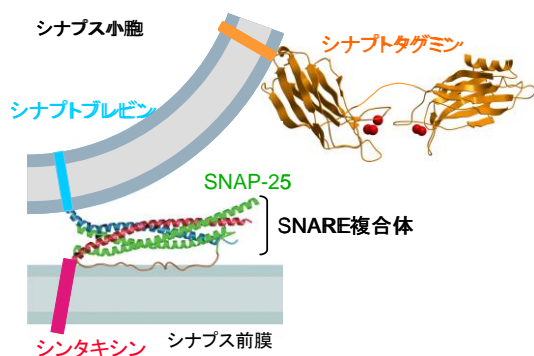


図1. Ca^{2+} 依存性神経伝達物質放出に必要な Ca^{2+} センサーシナプトタグミンと膜融合装置 SNARE 複合体。

私たちは、シナプトタグミン1欠損神経細胞を用いたレスキュー実験の結果から、静止状態において Ca^{2+} 非依存性にシナプトタグミン1がSNAREに結合し Ca^{2+} 流入まで放出を抑制しているという仮説を立てた (*J Neurosci* **24**:8542, 2004)。さらに、脳から可溶化したシナプトタグミンとSNARE複合体を用いて予備的実験を行い、こ

の仮説を支持する結果を得た。

2. 研究の目的

私たちは、上の項で述べたようにこれまでの研究成果を踏まえ、シナプトタグミン1とSNARE複合体が Ca^{2+} 非依存性に結合することを生化学的に証明し、その詳細を明らかにするとともに神経伝達物質放出における役割を解明しよう考えた。複合体を構成する3種類のSNAREのうち、SNAP-25は Ca^{2+} 非依存性にシナプトタグミンと結合することが、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いた結合実験によって示されている (*PNAS* **94**:997, 1997; *J Biol Chem* **275**:6328, 2000)。そこで私たちはSNAP-25に着目し、同分子上のシナプトタグミン結合部位を同定し、両者の結合の伝達物質放出における生理学的意義を明らかにする目的で本研究に着手した。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの構築

シナプトタグミン、SNAP-25、シンタキシン、シナプトブレビンのcDNAをPCR法により増幅した。シナプトタグミンおよびシンタキシンの変異体はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いて点突然変異法により作製した。組換えタンパク質を哺乳動物細胞に発現させるために、シナプトタグミン遺伝子はプラスミドベクターpIRES2-EGFP (Clontech社)に、各SNAREの遺伝子はpIRES2-DsRed2 (Clontech)にサブクローニングした。大腸菌での発現のために、シナプトタグミンはプラスミドベクターpGEX-6p-1 (GE社)に、シンタキシンとSNAP-25はpET-Duet-1 (Merck社)に、シナプトブレビンはpET-3a (Merck)にサブクローニングした。

(2) ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞における組換えタンパク質の発現

定法により培養したHEK293細胞にLipofectamin 2000 (Invitrogen社)を用いて発現プラスミドベクターを導入した。導入後3日目に界面活性剤を

用いて組換えタンパク質を可溶化し、超遠心後の上清を細胞可溶化画分として結合実験に用いた。

(3) 免疫沈降法

組換えタンパク質を含む細胞可溶化画分あるいはラット脳可溶化画分をCa²⁺存在下あるいは非存在下で反応させた後、抗シナプトタグミン抗体あるいは抗シナプトブレビン抗体とプロテインGセファロース(GE)を用いて免疫沈降した。沈降物中のタンパク質をSDS電気泳動後ポリフッ化ビニリデン膜に転写し、定量的イムノブロッティングにより解析した。

(4) 大腸菌で発現させた組換えタンパク質の精製

目的タンパク質発現用のプラスミドベクターで形質転換した大腸菌をSuper Broth培地中で振盪培養した。増殖期にIPTGを培養液に添加し組換えタンパク質の発現を誘導した。遠心により回収した菌体を破碎後、界面活性剤で可溶化し、超遠心後の上清を出発材料とした。シナプトタグミンはグルタチオンセファロース(GE)、SNAREはニッケルアフィニティー樹脂(QIAGEN社)を用いてカラムクロマトグラフィーを行い精製した。

(5) リポソーム融合実験

精製した組換えシナプトブレビンを透析法によりFRET 対の蛍光物質(NBD、ローダミン)で標識した脂質を含むリポソームに再構成した。一方、SNAP-25-シンタキシン複合体は蛍光色素を含まないリポソームに再構成した。二種類のリポソームを 96 穴プレート内で反応させ、融合に伴う FRET の減弱により発生する FRET ドナー NBD からの蛍光をプレートリーダーで測定した。

4. 研究成果

(1) 組換えシナプトタグミンとSNAREの結合

Ca²⁺非依存性の結合においてシナプトタグミンがSNARE複合体のどの構成タンパクと結合しているのかを明らかにするために、HEK293細胞に発現させた組換えタンパク質を用いて結合実験を行った。シナプトタグミン遺伝子とSNAP-25、シ

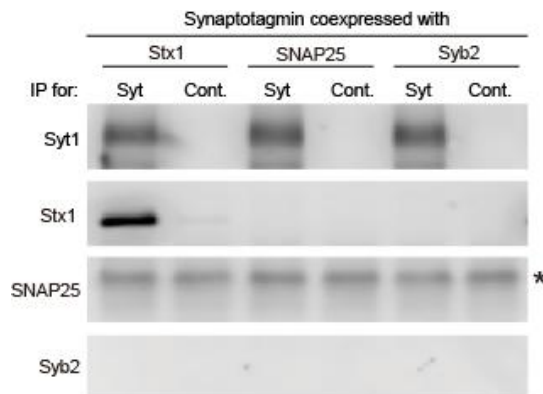


図 2. HEK293 細胞に共発現させたシナプトタグミン (Syt) 1 とシンタキシン (Stx) 1, SNAP25, あるいはシナプトブレビン (Syb) 2 の結合。

ンタキシン、シナプトブレビンの各遺伝子のいずれかを共発現させた細胞を可溶化し免疫沈降後イムノブロッティングによりシナプトタグミンと共沈したSNAREを解析した。その結果、Ca²⁺非存在下においてシナプトタグミンはSNAP-25やシナプトブレビンとは結合せず、シンタキシンと結合した(図2)。

当初の予定では既報の知見を踏まえ、三種類のSNAREのうちSNAP-25がシナプトタグミンと共沈すると予想し、両者の結合の意義について解析する計画であった。しかし、私たちの実験条件ではシナプトタグミンはSNAP-25とではなくシンタキシンと結合したことから、研究計画を変更しシナプトタグミンとシンタキシンの結合の性状について解析を進めた。

(2) シナプトタグミン-シンタキシン結合の性状

シナプトタグミンとシンタキシンの結合は1 M NaCl存在下ではほぼ完全に消失した。この結果は、脳可溶化画分中のシナプトタグミンとSNARE複合体の結合が1 M NaCl存在下で阻害されることと良く一致する。以上のことから、シナプトタグミンが静電力を介してSNARE複合体中のシンタキシンに結合していると考えられた。

シナプトタグミンの細胞質領域は、二つの相同なドメイン(C₂A、C₂B)が短いリンカーでつながれた構造をしている。二つのC₂ドメインのうち、C₂Bドメイン中の近接する3つのリジン残基(K)が、SNARE複合体との結合に関与していると考えら

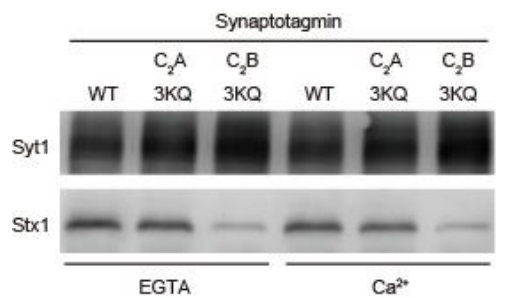


図3. シナプトタグミンのC₂AドメインおよびC₂Bドメインのポリリジン残基に導入した変異(3KQ)がシntaxinへの結合に及ぼす影響。

れている (*J Biol Chem* **279**:12574, 2004)。これらのリジン残基のもつ正電荷を中和するためにグルタミン(Q)に置換すると、シナプトタグミンのシntaxinへの結合が阻害された(図3)。これらの結果は、シナプトタグミンのC₂Bドメインのポリリジン領域がシntaxinを介したCa²⁺非依存性のSNARE複合体との結合に必須であることを示している。

(3)シntaxin上のシナプトタグミン結合部位

上で述べた結果から、シntaxinのシナプトタグミン結合部位は負電荷をもつアミノ酸残基である可能性が示唆された。これまでの報告で、シntaxin結合タンパク質の多くはシntaxinのSNARE複合体形成(H3)ドメインに結合することが示されている。そこで、H3ドメインに点在するグルタミン酸(E)およびアスパラギン酸(D)残基をそれぞれグルタミンおよびアスパラギン(N)に置換し、シナプトタグミンへの結合に対する影響について調べた。その結果、シntaxin H3ドメインのアミノ末端側約1/3の領域に点在する複数のグルタミン酸がシナプトタグミンとの結合に関与することが明らかとなった(図4)。

(4)シナプトタグミンとシntaxinのCa²⁺非依存性結合の意義

シntaxin-SNAP-25複合体を再構成したリポソームと、シナプトブレブリンを再構成したリポソームを反応させると、両者は融合する。このリポソーム融合系にシナプトタグミンの細胞質フラグメントを加えるとSNAREによる膜融合は抑制され、

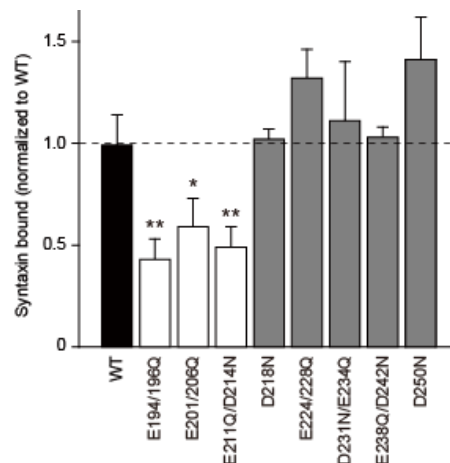


図4. シntaxinの酸性アミノ酸残基に導入した変異のシナプトタグミン結合に及ぼす影響。

一方シナプトタグミンとCa²⁺を同時に加えると促進が見られる。シナプトタグミン結合能を減少させた変異シntaxinは野生型と同様にSNARE依存性膜融合を引き起こし、Ca²⁺とシナプトタグミンの添加による膜融合の促進も観察された。これらの結果は、シntaxinのシナプトタグミン結合部位に導入した変異がSNAREの膜融合活性やCa²⁺・シナプトタグミンによる促進には影響を及ぼさないことを示す。これに対し、変異シntaxinでは野生型と比べ、Ca²⁺非存在下におけるシナプトタグミンによる抑制が減少した。以上の結果から、シナプトタグミンはシntaxinを介してSNARE複合体に結合し、SNAREによる膜融合をCa²⁺濃度が上昇するまで抑制している可能性が示唆された。

(5)シntaxinあるいはSNARE複合体からのシナプトタグミンのCa²⁺依存性解離

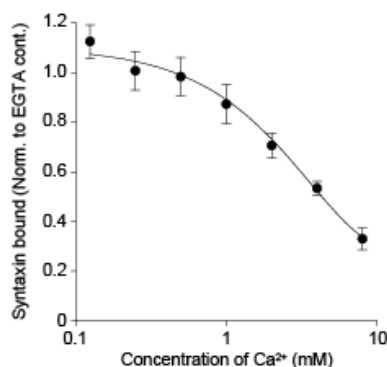


図5. シナプトタグミン-シntaxin複合体のCa²⁺依存性解離。

HEK293細胞に発現させたシナプトタグミンとシンタキシンを予め結合させた後Ca²⁺を添加し、結合に対する影響について調べたところ、両者はCa²⁺濃度依存性に解離した(図5)。Martinらのグループは、シナプトタグミンとSNAP-25の結合はCa²⁺依存性に親和性が高まり結合量が増加すると報告した(*J Biol Chem* **275**:6328, 2000; *Neuron* **34**:599, 2002)。そこで、シンタキシンを介してSNARE複合体に結合したシナプトタグミンがCa²⁺存在下で複合体から解離するのか、それともシンタキシンから解離すると同時にSNAP-25に結合することにより見かけ上SNARE複合体との結合量に変化が見られないのかを明らかにするために、脳の可溶化画分をCa²⁺存在下および非存在下で反応させ、抗シナプトブレビン抗体で免疫沈降した。その結果、SNARE複合体と結合しているシナプトタグミンはCa²⁺存在下において約50%減少した(図6)。この結果は、HEK293細胞で発現させた組換えタンパク質を用いた私たちの実験条件では、シナプトタグミンとSNAP-25はCa²⁺存在下においても結合しないことと良く一致する。



図6. 脳から可溶化したシナプトタグミン-SNARE複合体のCa²⁺依存性解離。

(6)成果の位置づけと今後の展望

シナプトタグミンがCa²⁺非存在下においてSNARE依存性の膜融合を抑制していることを示唆する知見が増えつつある(*J Neurosci* **24**:8542, 2004; *Nat Struct Mol Biol* **15**:827, 2008; *Neuron* **69**:736, 2011)。しかし、両者のCa²⁺非存在下における結合については不明な点が多く、シナプトタグミンによるSNAREの膜融合活性の抑制のメカ

ニズムは不明である。本研究課題の成果は、静止状態のシナプス前終末においてシナプトタグミンがシンタキシンを介してSNARE複合体に結合し、Ca²⁺流入までその機能を抑制していることを示す生化学的実験証拠となり、伝達物質放出機構の分子レベルでの解明につながる。

次に明らかにすべき問題は、Ca²⁺が結合したシナプトタグミンがどのようにしてSNAREによる膜融合を引き起こすのかである。本研究では、Ca²⁺存在下においてシナプトタグミンはシンタキシンとの結合が阻害されSNARE複合体から解離することを明らかにした。今後、このCa²⁺依存性解離の性状と生理学的意義について検討することが重要である。

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5件)

- ① Burgalossi A, Jung S, Meyer G, Jockusch WJ, Jahn O, Taschenberger H, O'Connor VM, Nishiki T, Takahashi M, Brose N, Rhee JS. SNARE protein recycling by α SNAP and β SNAP supports synaptic vesicle priming. *Neuron*, 査読有, **68**:473-487, 2010.
- ② Masumoto T, Nishiki T, Ohmori I, Tomizawa K, Matsui H, Ca²⁺-dependent dissociation of syntaxin 1 from synaptotagmin 1, *J Physiol Sci*, 査読無, **60**:S127, 2010.
- ③ Masumoto T, Nishiki T, Ohmori I, Matsui H, Assembly and disassembly of the complex of synaptotagmin 1 and syntaxin 1 under physiological conditions, *Neurosci Res*, 査読無, **68**:228, 2010.
- ④ Masumoto T, Nishiki T, Omori I, Tomizawa K, Matsui H, Negatively charged amino acid residues of syntaxin

l critical for synaptotagmin I binding, *Neurosci Res*, 査読無, **65**:S79, 2009.

- ⑤ Masumoto T, Nishiki T, Omori I, Tomizawa K, Matsui H, Ca²⁺-Independent SNARE Binding of Synaptotagmin I through Interaction between its C₂B Domain and Syntaxin 1, *J Physiol Sci*, 査読無, **59**:141, 2009.

〔学会発表〕(計6件)

- ① 増本年男ら, 大腸菌で発現させた組換え SNARE の天然のタンパク質とは異なるシナプトタグミンへの結合. 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月, 東日本大震災の発生により誌上開催.
- ② 増本年男ら, シナプトタグミン 1 とシンタキシン 1 の生理的条件下における会合と解離. 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 3 日, 神戸コンベンションセンター (神戸市).
- ③ 増本年男ら, シナプトタグミン 1 は Ca²⁺ 依存的にシンタキシン 1 から解離する. 第 87 回日本生理学会大会, 2010 年 5 月 19 日, 盛岡市民文化ホール (盛岡市).
- ④ 西木禎一ら, 神経伝達物質放出に関わるシナプトタグミン 1 と SNARE 複合体の結合部位の同定. 第 61 回 日本生理学会中国四国地方会, 2009 年 11 月 22 日, 山口大学医学部霜仁会館 (宇部市).

- ⑤ 増本年男ら, シンタキシンの負電荷を持つアミノ酸を介したシナプトタグミン 1 との Ca²⁺非依存的結合. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16 日, 名古屋国際会議場 (名古屋).

- ⑥ Masumoto T et al., Ca²⁺-Independent SNARE Binding of Synaptotagmin I through Interaction between its C₂B Domain and Syntaxin 1. 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009 年 7 月 28 日, 国立京都国際会館 (京都).

〔その他〕

ホームページ等

<http://seiril.med.okayama-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西木 禎一 (NISHIKI TEIICHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70423340

(2) 研究協力者

増本 年男 (MASUMOTO TOSHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生
鈴木 孝一郎 (SUZUKI KOICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生