

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008-2010

課題番号：20700343

研究課題名（和文）コンプレキシンによる SNARE 複合体集合体化とその意義

研究課題名（英文）Oligomerization of SNARE complex by complexin

研究代表者 清水 千草

(SHIMIZU CHIGUSA)

徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：70435072

研究成果の概要（和文）：運動や記憶等の脳の働きは、多くの神経細胞間の情報伝達により成立している。その神経細胞間のつなぎ目をシナプスと呼び、神経情報伝達は、アセチルコリン等の神経伝達物質により行われる。神経伝達物質の放出は、神経伝達物質が蓄えられているシナプス小胞の膜とシナプス前膜が融合することにより数ミリ秒以内で完結する迅速な反応である。この仕組みには、膜を融合させる SNARE 複合体が必須である。さらに、神経の興奮により細胞外から流入する Ca^{2+} を感知するシナプトタグミンが必要であるとされる。両者が強く結合することにより、神経の興奮に続いて起こる Ca^{2+} 依存性の神経伝達物質の放出が起こると考えられる。しかし、両者の結合親和性は低いため、この結合を仲介する分子が必要である。そこで申請者は、シナフィンに着目し、研究を行ったところシナフィンの中央部分に SNARE 複合体と、C 末端部分にシナプトタグミンを結合することを見いだした。この結果から、SNARE 複合体とシナプトタグミンの結合をシナフィンが仲介することにより、 Ca^{2+} 依存的な神経伝達物質の放出が行われている可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Fast, submillisecond synaptic transmission is critical for brain function. Synaptic transmission is mediated by neurotransmitters that are exocytotically discharged by the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane. The SNARE complex is a key step in vesicle fusion. On the other hand, synaptotagmin 1 is essential as a Ca^{2+} sensor. For Ca^{2+} -dependent exocytosis, the strong binding of SNARE complex and synaptotagmin1 is important. However, the affinity between SNARE complex and synaptotagmin1 is very low. The additional factors are needed for this interaction. One candidate for such factors includes synaphins. I reported that synaphin bound to SNARE complex in its central region and synaptotagmin 1 in C-terminal region. These results suggested that synaphin mediated the interaction between SNARE complex and synaptotagmin for Ca^{2+} -dependent exocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：シナフィン・コンプレキシン、シナプトタグミン、SNARE 複合体

1. 研究開始当初の背景

運動や記憶等の脳の働きは、多くの神経細胞間の情報伝達により成立している。その神経細胞間のつなぎ目をシナプスと呼び、神経情報伝達は、神経伝達物質により行われる。神経伝達物質の放出は、神経伝達物質が蓄えられているシナプス小胞の膜とシナプス前膜が融合することにより数ミリ秒以内で完結する迅速な反応である。シナプス小胞とシナプス前膜が融合し、神経伝達物質が放出されるためには、SNARE 複合体が必須である。しかし、SNARE 複合体だけでは、生体内で見られる迅速な開口放出は見られない。そこで、膜融合を速める因子等、SNARE 複合体の機能を修飾する因子が必要である。申請者はその因子として、コンプレキシンに着目した。コンプレキシンは中央部分(SBD)でSNARE 複合体と結合すること及びSNARE 複合体を会合させることが報告されている。また、コンプレキシンにより生じるSNARE 複合体の会合は速い膜融合の実現に重要な役割を果たしているのではないかと示唆されている。しかし、コンプレキシンの生理的役割については不明な点が多い。そこで、申請者は、コンプレキシンの全長とSBDの相違について着目し、以下の結果を得た。(1)コンプレキシンの全長がシナプス伝達を仲介できるが、SBD だけでは仲介できない。(2)コンプレキシンの全長にはSNARE 複合体と会合したSNARE 複合体が結合するが、SBD にはSNARE 複合体のみが結合していた。これらのことから、コンプレキシンのSBD 以外の部分がSNARE 複合体の会合化に関与し、シナプス伝達に影響を与えていることが考えられた。

2. 研究の目的

コンプレキシンが仲介するSNARE 複合体会合化のメカニズムの解明を行うことを当初の目的とした。この研究中に、コンプレキシンのSBD よりもC 末端部分がSNARE 複合体会合化に関与することを見いだすと同時にC 末端部分に、シナプトタグミンが結合することを発見した。シナプトタグミンは、神経細胞の興奮に伴い、細胞外からのCa²⁺イオンの流入を感知し、開口放出を起こさせるCa²⁺センサーとして働いていると考えられている。そこで、コンプレキシンのC 末端の機能に着目し、神経伝達物質の放出に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

脳膜分画抽出液にGST タグをつけたコンプレキシン及びグルタチオンゲルを混合し、GST コンプレキシンに結合した蛋白質をウェスタンブローディングにて検出した。また、抗シナキシン抗体で脳膜分画抽出液について免疫沈降し、結合した蛋白質についてウェスタンブローディングで解析した。

4. 研究成果

脳膜分画抽出液を用いた実験の結果、コンプレキシンのSBD 部分にはSNARE 複合体は結合するが、全長にはSNARE 複合体だけでなく、シナプトタグミンは結合した。この結果から、N 末端側あるいはC 末端側にシナプトタグミンの結合部位があると推測された。そこで、コンプレキシンの欠失変異体を用いて実験を行った結果、C 末端部分のみでもシナプトタグミンは結合することを見いだした(図1左。Tokumaru, Shimizu-Okabe et al. *Brain Cell Biol.* 2008, Shimizu-Okabe et al. 第52回日本神経化学会, 2009 他)。また、コンプレキシンとシナプトタグミンの結合は高い塩濃度で阻害されることから、蛋白質の電荷が両者の結合に重要であると考えられた。コンプレキシンはC 末端にグルタミン酸が7つ連続した配列を有していることから、すべてアラニンに置換したところ、シナプトタグミンの結合は50%以下となった。さらにSBD 部分のペプチドを用いて、SNARE 複合体とコンプレキシンの結合を阻害したところ、シナプトタグミンとコンプレキシンの結合は著しく減少した。このことから、コンプレキシンとシナプトタグミンはSNARE 複合体を介してではなく、直接結合していることが示唆された(図1右。Tokumaru, Shimizu-Okabe et al. *Brain Cell Biol.* 2008, Shimizu-Okabe et al. 第52回日本神経化学会, 2009 他)。これらのことから、コンプレキシンは、SNARE 複合体へのシナプトタグミンの動員を仲介することで、神経伝達物質放出に関与しているのではないかと考えられた(図2)。

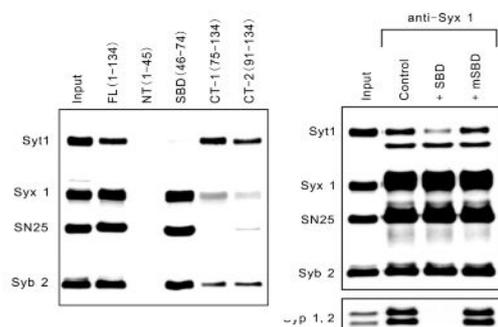


図 1. シナプトタグミンは、コンプレキシンの C 末端に直接結合する。(左) コンプレキシンの欠失変異体を用いた結合実験。C 末端部分のみでもシナプトタグミンは結合した。(右) 抗シンタキシン抗体で免疫沈降した際に SBD ペプチドを添加すると、コンプレキシンと SNARE 複合体の結合がなくなり、シナプトタグミンの結合も著しく減少した。Syt1: シナプトタグミン、Syx: シンタキシン、SN25:SNAP25、Syb2:シナプトブレビン 2、Syp: コンプレキシン

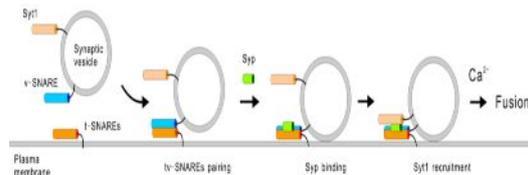


図 2. SNARE 複合体にシナプトタグミンが動員されるためにはコンプレキシンが必要である。

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 4 件)

1. **Shimizu-Okabe C.**, Tanaka M., Matsuda K., Mihara T., Okabe A., Sato K., Inoue Y., Fujiwara T., Yagi K., and Fukuda A. (2011): KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res.* 査読あり、93,177-184
2. Takahashi T., Zhu Y., Hata T., **Shimizu-Okabe C.**, Suzuki K., and Nakahara D. (2009): Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. *Neuroscience.* 査読あり、158. 402-11.
3. Tokumaru H., **Shimizu-Okabe C.**, and Abe T. (2008): Direct interaction of SNARE complex binding protein synaphin/complexin with calcium sensor

synaptotagmin 1. *Brain Cell Biol.* 査読あり、36, 173-89.

4. Kilb W., Hanganu I.L., Okabe A., Sava B.A., **Shimizu-Okabe C.**, Fukuda A., and Luhmann H.J. (2008): Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 査読あり、100, 698-707.

[学会発表] (計 6 件)

1. **清水-岡部 千草**、篠原 巧、阿部 輝雄、得丸 博史 (2010): シナーフィン/コンプレキシンが仲介するシナプトタグミン 1 と SNARE complex の結合は、PC12 細胞における Ca^{2+} 依存的な開口放出に重要である。第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 3 月 28 日-30 日、横浜
2. 篠原 巧、**清水-岡部 千草**、阿部 輝雄、得丸 博史 (2010): 神経伝達物質放出過程におけるシナーフィン/コンプレキシン機能の解明 第 130 回日本薬学会、3 月 28-30 日、岡山
3. **Shimizu-Okabe C.**, Shinohara T., Abe T., and Tokumaru H. (2009): Complexin directly binds with calcium sensor synaptotagmin 1. 第 52 回日本神経化学会、6 月 21-24 日、伊香保温泉
4. Tokumaru H. **Shimizu-Okabe C.**, Shinohara T., and Abe T. (2009): Synaphin/complexin recruits calcium sensor synaptotagmin 1 to the SNARE -driven fusion machinery for synaptic vesicle exocytosis. 第 32 回日本神経科学会、9 月 16 日~9 月 18 日、名古屋
5. Luhmann H.J., Kilb W., Hanganu-Opatz I.L., Okabe A, Sava B.A., **Shimizu-Okabe C.**, and Atsuo Fukuda (2009) : Function of ligand-gated chloride channels in the

newborn rodent cerebral cortex, 40th NIPS
International Symposium - International Joint
Symposium : PAT-CVR、8月4日～6日、岡
崎

6. 得丸 博史、清水 千草、伊藤康一、篠原
巧、阿部 輝雄、(2008): Synaphin
/Complexin directly associates with
calcium sensor synaptotagmin 1、第
回北米神経科学会、2008年11月15日～19
日、ワシントンD.C.

[図書] (計 2件)

1. **Shimizu-Okabe C, Okabe A, and Fukuda A:**
Dose high intracellular chloride
concentration cause epilepsy in focal cortical
dysplasia? *Dysplasia: Causes, Types and
Treatment Options*, Nova Science
Publishers, Inc. 査読あり、*in press*
2. 得丸博史、清水-岡部千草、阿部輝雄
(2010): シナプス小胞の開口放出におけ
るシナフィンの機能. 査読なし、*生体の
科学*、**61**, 247-251.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bunri-u.ac.jp>

清水-岡部千草、岡部 明仁、「日本神経科学
大会 託児室を利用して」神経科学ニュース、
2009年 11月 No.6

6. 研究組織

(1) 研究代表者 清水 千草
(SHIMIZU CHIGUSA)

徳島文理大学 香川薬学部

研究者番号 : 70435072