

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22500334

研究課題名（和文） 神経伝達物質放出機構における全く新しい素過程の解明

研究課題名（英文） Elucidation of a novel process in neurotransmitter release

研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIKI)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80359843

研究成果の概要（和文）：

神経細胞が次の神経細胞に情報を伝えるシナプス伝達の主たる過程は、神経伝達物質の放出により行われている。従って、神経伝達物質の放出の過程を解明していくことは、シナプスの可塑性ひいては記憶形成の過程を理解する上で重要である。これまで、私共は、神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。本研究により、トモシンが Ca^{2+} センサータンパク質シナプトタグミンと結合することにより、神経伝達物質の放出を抑制することを明らかにした。トモシン-シナプトタグミン複合体が新規素過程クローズングを形成することにより、神経伝達物質の連続した放出を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The main process in synaptic transmission is neurotransmitter release. It is important to elucidate the processes of neurotransmitter release for understanding synaptic plasticity and memory formation. So far, we have revealed that a SNARE regulator protein named tomosyn negatively regulates neurotransmitter release. In this study, we showed that tomosyn directly binds to Ca^{2+} sensor protein named synaptotagmin-1 in a Ca^{2+} -dependent manner. Tomosyn negatively regulates synaptotagmin-1-mediated step of Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release. Tomosyn-synaptotagmin1 complex forms a novel process named closing and regulates continuous neurotransmitter release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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

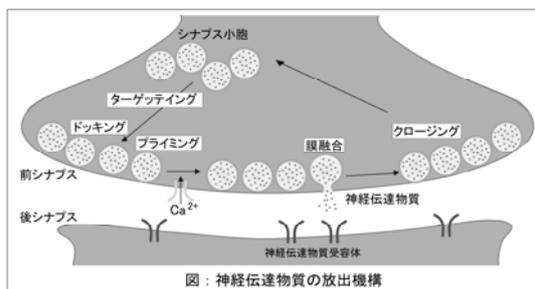
キーワード：神経伝達物質の放出機構、SNARE 複合体、トモシン

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質を含んだシナプス小胞は、シナプス前膜に運ばれる（ターゲティング）。

シナプス小胞は、アクティブゾーンにおいて、シナプス前膜にドッキングした状態になり、さらに Ca^{2+} 濃度の上昇に反応できる状態に成

熟する（プライミング）。局所的に上昇した Ca^{2+} 濃度に依存して、シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり、シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される（下図）。



これまで、神経伝達物質放出機構における3つの素過程（ターゲッティング、ドッキング、プライミング）を構成する分子が多数単離され、構成要素は明らかになりつつあるが、それぞれの素過程の膜構造やその形成機構はほとんど解明されていない。Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor (SNARE) 系の活性制御タンパク質トモシンは、シンタキシン-1 に結合するタンパク質として私共が単離、同定したタンパク質であり、N 末側領域に14個のWD40 リピード配列からなる2つのβ-プロペラ、その後 Tail 領域と呼ばれる保存された領域、C 末側領域に VAMP2 と似た SNARE モチーフ様の領域を有する (Fujita *et al.* Neuron 1998)。トモシンの C 末端 VAMP 様領域はシンタキシン-1、SNAP-25 と結合し、SNARE 複合体に似た構造の複合体（トモシン複合体）を形成する。トモシンは、トモシン複合体を形成することにより SNARE 複合体の形成を阻害する。トモシンの活性調節は、ROCK によるシンタキシンのリン酸化によりトモシン複合体形成が促進され (Sakisaka *et al.* Journal of Cell Biology 2004)、逆に PKA によるトモシンのリン酸化によりトモシン複合体形成が抑制されることを明らかにしていた (Baba *et al.* Journal of Cell Biology 2005)。トモシンノックアウトマウスを世界に先駆けて作製し、トモシンノックアウトマウスでは、神経伝達物質の放出量が顕著に増加していた (Sakisaka *et al.* Journal of Cell Biology 2008)。トモシンが神経伝達物質の放出を強力に抑制するタンパク質であることを確立した。世界で最初の神経伝達物質の放出を抑制するタンパク質となった。

2. 研究の目的

トモシンは C 末端 VAMP 様領域を介してシナプス前膜の target-SNARE (t-SNARE) であるシンタキシン-1、SNAP-25 と3者複合体、トモシン複合体を形成し、SNARE 複合体の形成を阻害することで、神経伝達に対して抑制的に機能することが分かっている。トモシン複

合体は Ca^{2+} 非依存的に形成されることから、トモシンの Ca^{2+} 依存的な神経伝達への抑制機構の分子メカニズムは不明であった。また、その抑制効果の生理的作用点も不明であった。そこで、 Ca^{2+} 依存的にトモシンに結合する因子の同定とその生理作用の解明を目的とした。

3. 研究の方法

トモシンの Ca^{2+} 依存的な抑制効果の分子メカニズムを明らかにするために、以下の解析をした。

(1) トモシンに Ca^{2+} 依存的に結合するタンパク質を、ラットシナプトソーム抽出液からのトモシン抗体による免疫沈降法により調べた。共沈するタンパク質を、さまざまなシナプス小胞タンパク質の抗体を用いたウエスタンブロッティング調べた。

(2) 結合タンパク質として同定したシナプトタグミン-1 とトモシンの結合を詳細に検討した。トモシンを N 末WD40 リピード領域と C 末の Tail 領域と VAMP 様領域を含むフラグメントの maltose binding protein (MBP) 融合タンパク質を作製した。 Ca^{2+} のその結合に与える影響を調べた。

(3) トモシンがシナプトタグミン-1 の活性に与える影響を liposome fusion assay を用いて検討した。トモシンによるシナプトタグミン-1 の膜変形効果への影響をそれぞれのリコンビナントタンパク質とリポソームを用いて再構成した。シナプトタグミン-1 は target membrane を変形することで、膜融合反応を促進することが知られている。そこで、トモシンによるシナプトタグミン-1 の膜変形効果を電子顕微鏡により観察した。

(4) シナプトタグミン-1 のトモシン複合体形成に与える効果を調べた。固相化した MBP-トモシンを様々な濃度のシナプトタグミン-1 と反応させ、その後シンタキシン-1 と SNAP-25 を加えた。

(5) 培養ラット上頸交感神経節ニューロンを用いて、トモシン-シナプトタグミン-1 複合体のアセチルコリン放出に与える効果を電気生理学的に検討した。①MBP-トモシンの N 末WD40 リピード領域、②シナプトタグミン-1 の細胞内領域、③N 末WD40 リピード領域とシナプトタグミン-1 の細胞内領域をそれぞれ培養ラット上頸交感神経節ニューロンにマイクロインジェクションし、アセチルコリンの放出に与える効果を興奮性シナプス後電位として測定した。

4. 研究成果

トモシンの Ca^{2+} 依存的な抑制効果について解析した。また、トモシン-シナプトタグミン-1 複合体の神経伝達物質放出機構における作用点を解析し、以下の結果を得た。

(1) Ca²⁺結合タンパク質であるシナプトタグミン-1が優位に共沈した。

(2) シナプトタグミン-1はトモシンのN末WD40リピート領域に結合した。次にCa²⁺の影響を調べたところ、Ca²⁺は結合を増強した。これらの結果から、シナプトタグミン-1はCa²⁺依存的にトモシンのN末WD40リピート領域に結合することが明らかとなった。

(3) t-SNAREを組み込んだ liposome と vesicular SNARE (v-SNARE) を組み込んだ liposome を混合すると liposome 間で SNARE 複合体が形成され、liposome が反応時間依存的に融合した。Ca²⁺存在下で、シナプトタグミン-1の細胞内領域はSNARE複合体による膜融合反応を加速したトモシンのN末WD40リピート領域は融合反応に影響を与えなかった。これに対し、トモシンのN末WD40リピート領域存在下では、シナプトタグミン-1は膜融合反応を促進しなかった。Ca²⁺存在下で、liposome にシナプトタグミン-1の細胞内領域を加えると、liposome をチューブ状に変形した。トモシンのN末WD40リピート領域は liposome を変形させなかった。N末WD40リピート領域存在下では、シナプトタグミン-1は liposome を変形しなかった。これらの結果から、トモシンのシナプトタグミン-1への結合は、シナプトタグミン-1の膜変形活性を阻害することで、膜融合反応の促進を阻害することが明らかとなった。

(4) 固相化したMBP-トモシンを様々な濃度のシナプトタグミン-1と反応させ、その後シタキシン-1とSNAP-25を加えたところ、シナプトタグミン-1の量依存的にシタキシン-1、SNAP-25の結合量が増加した。以上の結果から、シナプトタグミン-1のトモシンへの結合は、トモシンのC末VAMP様領域によるトモシン複合体形成を促進することが明らかとなった。

(5) 培養ラット上頸交感神経節ニューロンにおいて、①MBP-トモシンのN末WD40リピート領域、②シナプトタグミン-1の細胞内領域がアセチルコリンの放出を抑制した。③N末WD40リピート領域とシナプトタグミン-1の細胞内領域は、アセチルコリンの放出に影響を与えなかった。これらのことから、トモシンがシナプトタグミン-1を介してアセチルコリンの放出を抑制することが明らかとなった。
トモシン-シナプトタグミン-1複合体がシナプス小胞の融合効率を決定していると考えている。Primed vesiclesの融合が終了したCa²⁺流入後応答後期に融合する小胞では、すでにCa²⁺が結合して活性化状態にあるシナプトタグミン-1が膜を変形し、同時にSNARE複合体形成と協調することで迅速な膜融合をひき起こし、神経伝達物質を放出する。一方融合しない小胞では、活性化状態にあるシナプトタグミン-1はトモシンのN末WD40リピート領域と結合し、自身の膜融合促進活性を阻害す

る。この結合はさらにトモシンのC末VAMP様領域によるトモシン複合体形成を促進し、t-SNAREの機能を阻害する。シナプトタグミン-1がトモシンと結合することにより、小胞融合を抑制するCa²⁺センサーとして機能し、シナプス小胞の融合効率を決定する。その結果、シナプス終末に適切な数の小胞が絶えずプールされ、繰り返し刺激に対する迅速な応答を調節していると考えられる。

シナプスへのCa²⁺の流入によりプライミングされたシナプス小胞が融合する。その後、トモシンがシナプトタグミン-1と結合することにより、残ったシナプス小胞の融合を抑制した。新規素過程クロージングの存在が明らかになった。

以上の結果から、トモシン-シナプトタグミン-1複合体が新規素過程クロージングを形成した。この新規素過程クロージングによりシナプス終末に適切な数の小胞が絶えずプールされ、神経活動に依存した神経伝達物質の連続した放出を可能にした。

このように2年間の研究で、トモシンのCa²⁺依存的な作用機構について、当初の計画以上の成果をあげることが出来た。

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3件)

①Kurooka, T., Yamamoto, Y., Takai, Y., and **Sakisaka, T.**

Dual regulation of RA-RhoGAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth.

(J. Biol. Chem. 286巻, 6832-6848, 2011) 査読有

②Yamamoto, Y., Mochida, S., Miyazaki, N., Kawai, K., Fujikura, K., Kurooka, T., Iwasaki, K., and **Sakisaka, T.**

Tomosyn inhibits synaptotagmin-1-mediated step of Ca²⁺-dependent neurotransmitter release through its N-terminal WD40 repeats.

(J. Biol. Chem. 285巻, 40943-40955, 2010) 査読有

③Yamamoto, Y., Fujikura, K., Sakaue, M., Okimura, K., Kobayashi, Y., Nakamura, T., and **Sakisaka, T.**

The tail domain of tomosyn controls membrane fusion through tomosyn displacement by VAMP2.

(Biochem. Biophys. Res. Commun. 399巻, 24-30, 2010) 査読有

[学会発表] (計2件)

①山本泰憲、匂坂敏朗

小胞体局在タンパク質p38による尾部アンカー型膜タンパク質の生合成調節機構
第84回日本生化学会大会
2011年9月24日
京都国際会館

②山本泰憲、藤倉航平、阪上海央、置村健二郎、小林雄太、中村俊宏、匂坂敏朗

シナプス小胞エキソサイトーシスにおけるSNARE制御分子トモシンの役割
BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会
2010年12月7日
神戸国際展示場

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA TOSHIAKI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80359848

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者