

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700385

研究課題名(和文) SNAP-25 タンパク質のリン酸化の分子的役割とストレス適応機構の関連性の解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanisms and the physiological significance of SNAP-25 phosphorylation in mouse brain.

研究代表者

山森 早織 (Yamamori, Saori)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30464803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスの機能はタンパク質のリン酸によって様々に制御されているが、その制御が脳の機能にどのように関わっているかについては未だ明らかではない。SNAP-25は開口放出による神経伝達物質放出や、細胞膜へのイオンチャネルの組み込みなどに不可欠なタンパク質で、PKC依存的にリン酸化される。

本研究では脳でのSNAP-25のリン酸化の制御機構や役割を明らかにすることを目的とした。そして、マウス脳内のSNAP-25のリン酸化が拘束浸水ストレスにより上昇すること、SNAP-25の脱リン酸化にPP2Aが関与すること、SNAP-25のリン酸化がドーパミンの放出を促進的に制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：SNAP-25 plays a crucial role in neurotransmitter release by exocytosis. Protein kinase C phosphorylates SNAP-25 at Ser187, however the physiological significance of this phosphorylation event in brain function remains unclear. We found that SNAP-25 phosphorylation increased rapidly in the mouse brain following cold-water restraint stress. Both basal and stress-induced phosphorylation of SNAP-25 were high in stress-related brain regions and the extent of phosphorylation increased with increasing amounts of stress. Intravenous administration of adrenaline increased SNAP-25 phosphorylation, although stress-induced phosphorylation was still observed in adrenalectomized mice. These results indicate that SNAP-25 phosphorylation is regulated in a stress-dependent manner through both central and peripheral mechanisms. We also investigated SNAP-25 dephosphorylation, and found that protein phosphatase 2A participates in SNAP-25 dephosphorylation through Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent mechanisms.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：リン酸化 神経伝達物質放出 ストレス SNAREタンパク質 プレシナプス ドーパミン SNAP-25 PKC

## 1. 研究開始当初の背景

SNAP-25 はシナプスで多様な役割を担っている

Synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) は神経細胞と内分泌細胞に発現するタンパク質で、Syntaxin やシナプス小胞に局在する VMAP-2 と共に SNARE タンパク質として開口放出による神経伝達物質の放出に不可欠な役割を果たしている。さらに近年、SNAP-25 がレセプターやイオンチャネル、トランスポーターなどの細胞膜への組み込みにも関与していることや、Ca<sup>2+</sup>チャネルやK<sup>+</sup>チャネルに直接結合し、それらの機能を変化させることなども示され、シナプスで多様な役割を担っていることが明らかとなってきている。

SNAP-25 は PKC でリン酸化されるが、脳での生理的な意義は明らかではない

SNAP-25 の Ser<sup>187</sup> は Protein kinase C (PKC) によりリン酸化され、内分泌細胞ではそのリン酸化が PKC 依存的な分泌促進に関わっていることが明らかにされている。SNAP-25 のリン酸化は脳内でも起こっているが、それがシナプスからの神経伝達物質の放出制御に関わるかは未だ明らかにはなっていない。さらに脳内で SNAP-25 のリン酸化がどのようなシグナル系で制御され、どのような脳機能の制御に関わっているかなどの問題についても未解決のまま残されている。

### <着想に至った経緯>

脳内での SNAP-25 リン酸化が、ストレスで上昇することを見出した

我々は脳での SNAP-25 のリン酸化が生理的な刺激で変化するかを探索した結果、マウスを冷水中で拘束ストレスに晒すと大脳皮質や海馬、扁桃体などのストレス応答に関わるといわれている部位で SNAP-25 のリン酸化が大きく上昇することを見出している。また、SNAP-25 がリン酸化される度合いはストレスの強さに依存して増大すること、調べた 14 種類のリン酸化されるシナプスタンパク質の中で SNAP-25 を含む 3 種類のみがリン酸化されることも明らかとなっていた (yamamori et al., 2014; 本研究期間に投稿)。さらに我々が作成した SNAP-25 のリン酸化が起こらないノックインマウス (Kataoka, Yamamori et al., 2011) は高ストレス環境下で飼育すると、野生型マウスとは異なり高ストレス環境に適応できず拒食を続けることも見出し、SNAP-25 のリン酸化がストレスへの適応機構に関わる可能性も見出していた (未発表)。

SNAP-25 リン酸化が起こらない変異マウスでは、扁桃体でのモノアミン放出の低下や不安様行動の表出が起きることを見出した

脳での SNAP-25 のリン酸化の役割を探るために作成された SNAP-25 のリン酸化部位の Ser<sup>187</sup> を Ala に置換したノックインマウスの解析を行ったところ、扁桃体でのドーパミ

ンやセロトニン放出が顕著に低下し、オープンフィールド試験や明暗選択試験で強い不安様行動が現れることを見出した (Kataoka, Yamamori et al., 2011)。さらに変異マウスから調製したシナプトゾームを用いた予備的な実験を行った結果、野生型マウスとは異なり SNAP-25 のリン酸化が起こらない変異マウスでは、PKC 依存的なドーパミン放出の有意な促進が起こらない可能性も見出していた (2013, 本研究期間に学会発表)。

SNAP-25 のリン酸化に関する多くの重要な問題が未解決のまま残されている

以上述べてきたように、我々のこれまでの研究の結果、SNAP-25 のリン酸化が脳内でのモノアミン放出の制御を介して、情動やストレス応答に関わる可能性が考えられるが、さらに精査が必要で、まだ解決すべき多くの問題が残されている。

## 2. 研究の目的

脳での SNAP-25 のリン酸化の制御機構や役割を明らかにすることを目的とし、以下を明らかにすることを目指した。

(1) シナプス前機構への SNAP-25 のリン酸化の役割を明らかにする

野生型マウスの脳から調製したシナプトゾームを用い、SNAP-25 のリン酸化を変化させるホスファターゼ阻害剤のスクリーニングにより、リン酸化の制御に関わるホスファターゼを明らかにする。

ノックインマウスの脳から調製したシナプトゾームを用い、SNAP-25 のリン酸化を介した放出促進などが、ドーパミンなどの神経伝達物質において起こっているのかを明らかにする。

(2) 脳内ストレス機構と SNAP-25 のリン酸化の関係性を明らかにする

SNAP-25 のリン酸化とストレスの関係性を明らかにする。

さらに、SNAP-25 のリン酸化が起こる脳内部位を、抗リン酸化抗体を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) シナプス前機構への SNAP-25 のリン酸化の役割を明らかにする

SNAP-25 のリン酸化を制御するシグナル系の解明

**目的** SNAP-25 のリン酸化は非生理的なホルボールエステル処理により誘発される。本研究では、SNAP-25 の脱リン酸化が、どのような内在性のホスファターゼによって引き起こされているのかを明らかにする。

**方法** 野生型マウスの脳から調製したシナプトゾームに、活性化型ホルボールエステル (PDB) を処理して SNAP-25 のリン酸化を誘発させ、同時に様々なホスファターゼ阻害剤を作用させて、SNAP-25 のリン酸化の変化を抗 SNAP-25 リン酸化抗体を用いた定量的

イムノプロット法により解析し、脱リン酸化の作用機序を解析した。用いたホスファターゼ阻害剤は、FK506 と cyclosporin A (カルシウム依存性ホスファターゼ calcineurin/PP2B の阻害剤)、calyculin A (PP1 と PP2A の阻害剤)、tautomycin (PP1 特異的な阻害剤)、オカダ酸 (PP2A 特異的な阻害剤) の 5 種である。

#### PKC 依存的な神経伝達物質放出促進制御における SNAP-25 のリン酸化の役割の解明

**目的** SNAP-25 のリン酸化部位を欠失したノックインマウスの脳から調製したシナプトゾームでは、PKC 依存的なドーパミン放出の増強が起こらない可能性が見いだされている。本研究期間にこれをさらに精査すること、SNAP-25 のリン酸化を介した制御がドーパミン以外の神経伝達物質でも見られるかを調査する。

**方法** 野生型およびノックインマウスの脳から調製したシナプトゾームを、37 酸素通気下でグルコースおよび<sup>3</sup>H]標識した神経伝達物質 (ドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン、グルタミン酸、GABA など) をインキュベートして取り込ませた後、メンブレンフィルター上にトラップして灌流系にセットする。生理的塩溶液 (5mM Low-K<sup>+</sup> buffer) を灌流して洗浄後、経時的にサンプルを回収しながら高カリウム (15mM High-K<sup>+</sup> buffer) による脱分極を誘導し、放出される放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。高カリウム処理に先立って行う 15 分間の活性化型ホルボールエステル (PDB) 処理の有無により、脱分極依存性の放出に違いが生じるかを、野生型およびノックインマウスのシナプトゾームを用いて調べた。

なお、<sup>3</sup>H]標識した神経伝達物質の取り込みは、各モノアミン含有神経に発現する各モノアミンのトランスポーターを主に介して行われるが、交差性もあるため、ロードするモノアミン以外のモノアミントランスポーターの阻害剤を作用させようとして、目的の神経伝達物質の取り込みを行わせるように検討を行った。

#### (2) 脳内ストレス機構と SNAP-25 のリン酸化の関係性を明らかにする

##### 抗リン酸化抗体を用いた SNAP-25 のリン酸化が起こる脳内部位の解明

**目的** 研究代表者らはストレスによって脳内で SNAP-25 のリン酸化が引き起こされることを見出し、リン酸化亢進についての脳内部位差などについてさらに精査することを目的とする。

**方法** 野生型マウスを用いて、冷水拘束ストレスや、室温での拘束ストレス、水泳ストレスなどを加えた場合に起こる SNAP-25 のリン酸化の脳内部位特異性を、脳を領域ごとに手早く切り出し、抗リン酸化 SNAP-25 抗体を用いたイムノプロットを行って比較した。

また、脳がストレスを感知すると、HPA 軸や交感神経系を介した連絡により、末梢の副腎からコルチコステロンやアドレナリンが放出されることが知られている。脳内の SNAP-25 のリン酸化と副腎の関係性を調べるために、ストレスは与えずに副腎髄質から放出されるアドレナリンを投与したマウスと、副腎摘出手術を受けた後にストレス刺激を与えたマウスを用いて、脳内の SNAP-25 のリン酸化の変化を解析した。

#### 免疫組織化学法による脳内 SNAP-25 のリン酸化部位の可視化法の確立

**目的** SNAP-25 のリン酸化を介した脳機能の調節に関わる脳内部位をさらに詳細に特定するため、抗リン酸化 SNAP-25 抗体を用いた免疫組織化学法を確立する。

**方法** 研究代表者らはこれまでウサギで作成した抗 SNAP-25 リン酸化ポリクローナル抗体を用いてきたが、この抗体は脳の免疫組織化学では良い結果が得られない。本研究期間に免疫組織化学に用いることが出来るマウス抗リン酸化 SNAP-25 モノクローナル抗体を作成し、様々な固定法や抗原賦活化法を試みて、マウス脳内でのリン酸化部位の可視化を目指した。

## 4. 研究成果

本研究期間に 3 項目の進展が得られ、論文や学会発表のかたちで報告した。

#### (1) SNAP-25 の脱リン酸化には PP2A がホスファターゼの 1 つとして関与する

PKC によりリン酸化を受け、前シナプスに存在する SNAP-25 と GAP-43 タンパク質のリン酸化の制御機構について、野生型マウスのシナプトゾームを用いて調べた。

SNAP-25 と GAP-43 は、PKC 活性化剤であるホルボールエステル (PDB) の処理により有意にリン酸化が亢進し、カルシウムイオンフォアである ionomycin の処理時間に依存して脱リン酸化された。この脱リン酸化は細胞外カルシウム存在下でのみ生じたことから、カルシウム依存性のホスファターゼが関与することが考えられた。しかしながら、カルシウム依存性ホスファターゼ calcineurin/PP2B の阻害剤である FK506 と cyclosporin A は、両者のタンパク質の脱リン酸化を阻害しなかった。そして、SNAP-25 の脱リン酸化は、PP1 と PP2A の非特異的な阻害剤である calyculin A と、PP2A 特異的な阻害剤であるオカダ酸により阻害され、PP1 特異的な阻害剤である tautomycin には阻害を受けなかった。一方、GAP-43 の脱リン酸化には、これらの阻害剤は効果を示さなかった。また、PDB による SNAP-25 のリン酸化は、オカダ酸により濃度依存的にさらに増強された (図. 1)。

これらの結果は、PP2A が SNAP-25 の脱リン酸化にカルシウム依存のもしくは非依存の機構で関わっていること。そして、

GAP-43 の脱リン酸化は SNAP-25 の脱リン酸化とは異なる機構で制御をうけているという可能性を示唆している (Iida et al., Neurosci Res., 2013)。

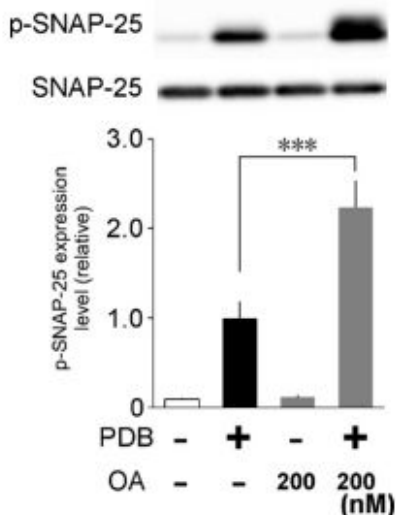


図.1 SNAP-25 はホルボールエステル(PDB)によりリン酸化を受けるが、PP2A 阻害剤(OA)が加わると脱リン酸化が抑制され更にリン酸化が高まる。(Iida et al., Neurosci. Res., 2013)

(2) ドーパミンの放出は SNAP-25 のリン酸化により促進的に制御される

野生型マウスあるいは SNAP-25 変異マウスの脳から調製したシナプトゾームに [<sup>3</sup>H] 標識したドーパミンを取り込ませて、高カリウムによる脱分極刺激で放出される [<sup>3</sup>H] ドーパミンの量を測定した。

野生型マウスのシナプトゾームでは、PKC 活性化剤であるホルボールエステル(PDB)を処理すると、高カリウム刺激依存的なドーパミンの放出が増加した(図2左)。同じ処理を行った野生型マウスのシナプトゾームを、抗リン酸化 SNAP-25 抗体でイムノプロットすると、PDB 処理によってリン酸化が大きく亢進する様子が確認された。この PDB による SNAP-25 のリン酸化とドーパミン放出の増強は、PKC 阻害剤である bisindolylmaleimid の処理により抑制された。

一方、SNAP-25 のリン酸化が生じない *Snap-25<sup>S187A/S187A</sup>* 変異マウスのシナプトゾームでドーパミンの放出を調べると、PDB 処理によって放出はわずかには高まるが有意な差は生じなかった(図2右)。

以上の結果から、SNAP-25 のリン酸化がドーパミン放出を促進的に制御していることが示唆された。なお、PKC により Munc13 などがリン酸化され、神経伝達物質放出を促進的に制御するということがすでに報告されており、本研究において SNAP-25 のリン酸化変異マウスのシナプトゾームのドーパミン放出が PDB 処理によりやや高まってみ

えたのは、Munc13 などの機能を反映しているのではないかと考えられた。(北米神経科学会, 2013)。

なお、他の神経伝達物質(GABA、セロトニン、ノルアドレナリン、グルタミン酸)についての解析も行ったところ、SNAP-25 のリン酸化による放出制御は神経伝達物質によって異なる可能性も出現している。だが明らかにするには、今後さらに精査が必要な段階である。

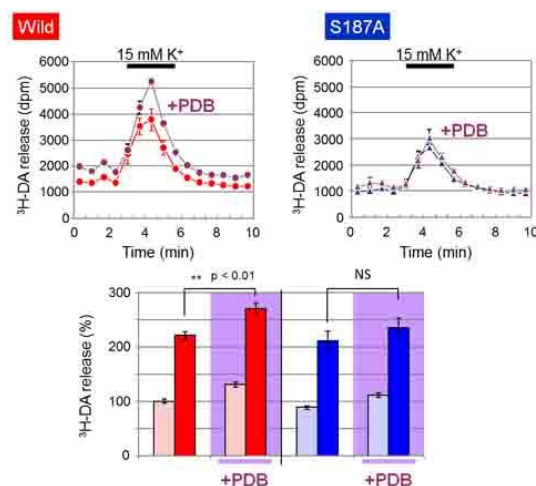


図.2 野生型マウス(Wild)のシナプトゾームはホルボールエステル(PDB)処理をうけると高カリウム(15mM K<sup>+</sup>)刺激によるドーパミン(DA)の放出が増強されるが、SNAP-25 のリン酸化が生じない変異マウス(S187A)のシナプトゾームでは、PDB による放出の増強はみられない。下図の棒グラフでは、野生型マウス(赤系)と変異マウス(青系)の、basal 放出量(桃色・水色)と高カリウム刺激時の放出量(赤・青)を、PDB 処理の有無ごとに比較(Yamamori et al., 北米神経科学会発表, 2013)。

(3) マウス脳内の SNAP-25 のリン酸化は、ストレス刺激により急上昇し、ストレス除去により急低下する

抗リン酸化 SNAP-25 モノクローナル抗体をいくつか作成したが、イムノプロットでは良好な結果が得られるが、免疫組織化学に使用することができるものは残念ながら得られなかった。そこで、マウスの脳を手早く領域ごとに切り出して抗リン酸化 SNAP-25 抗体(pi-SNAP-25)と、すべての SNAP-25 を認識する抗体(pan-SNAP-25)によるイムノプロットを行ってリン酸化を受けた SNAP-25 の割合を求めて(pi-SNAP-25 / pan-SNAP-25)、脳の各部位でのストレスによる SNAP-25 のリン酸化の変化を解析した。

我々は、マウス脳内の SNAP-25 のリン酸化と血中コルチコステロン濃度は拘束浸水ストレスによりよりただちに上昇し、ストレス除去により低下することを見出した(図3)。平常時とストレス刺激時における脳内の SNAP-25 のリン酸化は、いずれもストレ

スに關与する脳内部位（大脳皮質、海馬、扁桃體）で特に高く、ストレスにさらされる時間やストレスの強さに応じて高まることが明らかになった。

ストレス刺激をうけて脳から交感神経系を介した連絡により、副腎髄質からアドレナリンが放出されるが、アドレナリンをマウスの腹腔内に投与しても脳内の SNAP-25 のリン酸化は亢進した。一方で、副腎摘出を受けたマウスでも、拘束浸水ストレスにより脳内の SNAP-25 のリン酸化が亢進することも確認され、HPA 軸や交感神経系などの副腎を介した経路を介さなくても、脳内で直接的にストレスを感知して SNAP-25 のリン酸化が生じることが明らかとなった(Yamamori et al., 北米神経科学学会発表, 2012; Yamamori et al., Neuroscience letters, 2014)。

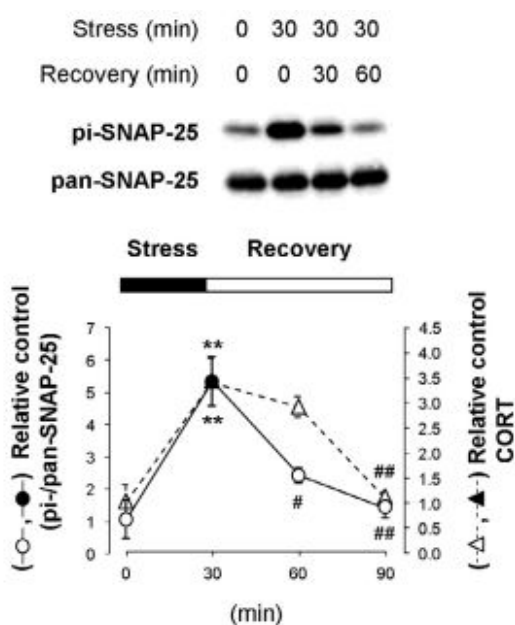


図3. マウスに拘束浸水ストレスを30分間与え(Stress)、ホームケージで各時間の休息(Recovery)をとらせた。各時点でのイムノプロットの結果(上図)と、脳内のリン酸化されている SNAP-25 の割合と血中コルチコステロン(CORT)の値の変動(下グラフ)。両値はストレスにより増加し、ストレス除去で低下する (Yamamori et al., Neurosci. Letters, 2014)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamamori S, Sugaya D, Iida Y, Kokubo H, Itakura M, Suzuki E, Kataoka M, Miyaoka H, Takahashi M. : Stress-induced phosphorylation of SNAP-25. Neuroscience Letters 2014, (561) 182-187. doi: 10.1016/j., 査読有  
Iida Y, Yamamori S, Itakura M, Miyaoka H, Takahashi M.: Protein phosphatase 2A dephosphorylates SNAP-25 through two distinct

mechanisms in mouse brain synaptosomes. Neurosci Reserch 2013, (75) 184-189. doi: 10.1016/j., 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Yamamori S, Kanno S, Takahashi M.: PKC-dependent phosphorylation of SNAP-25 is essential for the positive regulation of dopamine release in mouse brain, 北米神経科学学会, 2013 年 11 月 11 日, アメリカ San Diego.

Yamamori S, Sugaya D, Iida Y, Kokubo H, Itakura M, Suzuki E, Kataoka M, Miyaoka H, Takahashi M.: Stress induced phosphorylation of Snap-25, 北米神経化学学会, 2012 年 10 月 17 日, アメリカ New Orleans.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山森 早織 (Yamamori, Saori)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30464803