

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590259

研究課題名(和文) 神経伝達物質放出カルシウムセンサーの膜融合タンパク質複合体からの解離

研究課題名(英文) Dissociation of synaptotagmin from SNARE complexes

研究代表者

西木 禎一 (Nishiki, Teiichi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70423340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質放出にはカルシウムセンサーであるシナプトタグミンと膜融合能を持つスネア複合体が必須であるが、両者の相互作用は不明である。本研究では、伝達物質放出の分子機構を解明するため両者の相互作用を解析した。ラット脳から可溶化した天然のタンパク質、哺乳動物細胞で発現させた組換えタンパク質、脂質膜に組み込んだ大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いたいずれの結合実験において、スネアに結合したシナプトタグミンは、カルシウムが結合するとスネアから解離した。これらの結果は、カルシウムによるシナプトタグミンのスネア複合体からの解離が伝達物質放出を引き起こすことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Synaptotagmin, a synaptic vesicle protein containing two C2 domains (C2A, C2B), is a putative Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release that cooperates with SNARE complexes. Whereas experiments using soluble fragments have shown that synaptotagmin-SNARE interactions require Ca²⁺ binding to both C2 domains, Ca²⁺ binding to C2B is more critical for release. Therefore, it is still unknown how synaptotagmin transduces Ca²⁺ signals to SNARE-mediated exocytosis. In this study, we showed that Ca²⁺ binding to the C2B domain released synaptotagmin from syntaxin within SNARE complexes at 37 degrees Celsius when using native proteins, proteins expressed in mammalian cells, or bacterial-expressed proteins reconstituted in liposomes. Together with the previous functional analysis, our findings indicate that synaptotagmin dissociates from SNARE complexes by Ca²⁺ during transmitter release and, thus, acts as a clamp that suppresses SNARE activity until Ca²⁺ influx.

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 刺激分泌連関 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

神経伝達物質の開口放出はシナプス小胞膜とシナプス前膜の融合により起こる。二つの膜の間で t-SNARE (SNAP-25, シンタキシン) と v-SNARE (VAMP-2) と呼ばれる膜タンパク質が複合体を形成することが膜融合に必須であると考えられている。一方、伝達物質放出の Ca^{2+} センサーはシナプトタグミンであると考えられている。したがって、次に解明すべき問題は「 Ca^{2+} と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か」である。

現在広く受け入れられているモデルでは、シナプトタグミンが Ca^{2+} 依存的に SNARE と結合し膜融合を引き起こすとされている。しかし、生きた神経細胞や *in vitro* 膜融合アッセイ系では、シナプトタグミンが Ca^{2+} 非依存的に SNARE による膜融合を阻害することが報告されており、現行のモデルではこれらの現象を説明できない。このモデルは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の結果にもとづくが、実験材料や測定方法の違いなどから結果が異なり、未だ統一した見解が得られていないのが現状である。

私たちは、既存のモデルがいくつかの実験結果と一致しないのは、大腸菌で発現させた組換えタンパク質が天然のタンパク質の機能を保持していないからではないかと考えた。そこで、ラット脳からシナプトタグミンと SNARE を可溶化し両者の結合を改めて調べたところ、 Ca^{2+} が存在しなくても SNARE と結合することを明らかにした。この結果をふまえ、 Ca^{2+} を必要としないシナプトタグミンの SNARE 依存性膜融合抑制作用と、 Ca^{2+} 結合によるシナプトタグミンの膜融合誘発作用の両方を説明するために次のような仮説を立てた。

静止状態の神経終末において、シナプス小胞のシナプス前膜へのドッキング後に形成され始めた SNARE 複合体にシナプトタグミンが結合し、複合体の形成を一時停止させる。細胞の興奮に伴い終末内に流入した Ca^{2+} が結合するとシナプトタグミンが解離し、SNARE 複合体の形成が再開され膜融合を引き起こす。この仮説を立証するために、シナプトタグミンに Ca^{2+} が結合すると SNARE 複合体から解離することを示し、神経伝達物質放出の分子機構の一端を解明することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) 天然のシナプトタグミンと SNARE 複合体が Ca^{2+} 依存性に解離することを明らかにする。

(2) シナプトタグミンのもつ二つの Ca^{2+} 結合ドメインのうち、 C_2A ではなく神経伝達物質放出に重要な C_2B への Ca^{2+} 結合が解離に必須であることを明らかにする。

(3) 脂質膜に組込んだ状態での両者の解離の

Ca^{2+} 感受性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 天然のシナプトタグミンと SNARE 複合体の Ca^{2+} 依存性解離

ラット脳から調整したシナプトソームから、シナプトタグミンおよび SNARE を界面活性剤 Triton X-100 で可溶化した。種々の濃度の CaCl_2 存在下において 37 °C で 1 時間反応させた後、抗シナプトタグミン抗体で免疫沈降し、シナプトタグミンに結合した SNARE を共沈させた。沈降物を SDS 電気泳動で分離後、定量的イムノブロットングにより解離の Ca^{2+} 濃度依存性を明らかにし EC_{50} を算出した。

EC_{50} の Ca^{2+} 添加後、4 から 37 °C の種々の温度で脳可溶化物を反応させ、上と同様に結合量を調べた。温度依存性の結果に基づき、 EC_{50} の Ca^{2+} 添加後 37 °C で時間間隔を変えて反応させた後、氷上で急冷し反応を止めた。4 °C で免疫沈降を行い、イムノブロットングにより結合量を定量し、両者の解離がプラトーに達する時間を調べた。

カルシウム以外に神経伝達物質を放出させることが知られているバリウムあるいはストロンチウムにより、シナプトタグミンと SNARE の解離が生じるか検証した。

(2) シナプトタグミン Ca^{2+} 結合部位に導入した変異の SNARE からの解離に及ぼす影響

組換えシナプトタグミンが天然のタンパクと同様の SNARE との結合・解離の性状を保持しているか調べた。ラット脳からイムノアフィニティークロマトグラフィーにより SNARE 複合体を精製した。精製した SNARE と野生型シナプトタグミンを発現させた HEK293 細胞の可溶化液を反応させた。 Ca^{2+} 添加後反応を続け、解離の Ca^{2+} 濃度依存性を調べた。

シナプトタグミンの細胞質領域には、二つの Ca^{2+} 結合ドメイン (C_2A 、 C_2B) が存在する。 C_2 ドメインの Ca^{2+} 結合部位は 5 つのアスパラギン酸 (D) から形成され、2 番目のアスパラギン酸 (D2) 残基をアスパラギン (N) に置換した変異 C_2 ドメインは Ca^{2+} 結合能が著しく阻害される。各ドメインの D2N 変異の Ca^{2+} 依存性解離への影響を調べるために、点突然変異法により変異シナプトタグミン遺伝子を作製し哺乳動物細胞発現ベクターにサブクローニングした。ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に発現させた C_2A D2N あるいは C_2B D2N 変異シナプトタグミンを、脳から精製した SNARE と反応させ、変異の Ca^{2+} 依存性の解離に対する影響を野生型と比較して調べた。

(3) シナプトタグミンのシンタキシンからの Ca^{2+} 依存性解離

私たちは、シナプトタグミンの Ca^{2+} 非依存的 SNARE 複合体への結合が、3 種類の構成タンパク質のうちシンタキシンであることを示す結果を得ている。そこで、シナプトタグミンの SNARE

複合体からの解離がシタキシンからの解離であることを示すために、HEK293 細胞で発現させたシタキシンからの野生型シナプトタグミンの Ca^{2+} 依存性解離が SNARE 複合体の場合と同様に起こることを示した。

(4) 脂質膜に再構成した SNARE からのシナプトタグミンの Ca^{2+} 依存性解離

t-SNARE はシナプス前膜に v-SNARE はシナプス小胞膜に存在する。そのため小胞ドッキング後、SNARE は膜近傍領域が離れたトランス型複合体を形成し、膜融合後シス型へと移行する。溶液中ではシス型が再現できるのみである。これらを踏まえ、より生理的環境に近い条件下で解析するために、t-SNARE と v-SNARE を別々に組込んだリポソーム同士を反応させ *trans*-SNARE を形成させ、シナプトタグミンとの結合・解離について密度勾配遠心法により調べた。

4. 研究成果

(1) ラット脳可溶性画分を $CaCl_2$ 存在下において 37 ° で反応させた後、抗シナプトタグミン抗体で免疫沈降しイムノプロットングにより解析した。シナプトタグミンと共沈する SNARE は Ca^{2+} 濃度依存性 ($IC_{50}=0.65$ mM) に減少したことから、両者は Ca^{2+} により解離することが明らかとなった。 Ca^{2+} を添加後、種々の温度で脳可溶化物を反応させたところ、4 ° では解離は生じず、10 ° で解離し始め、37 ° まで温度を上げるに従い解離が増加した。両者の解離は本研究で用いている結合実験法の解析時間の限界である 5 分以内にプラトーに達した。シナプトタグミンと SNARE の解離は、*in vitro* において伝達物質を放出させる Ba^{2+} でも生じたが、正常な放出を阻害する Sr^{2+} では生じなかった。以上の結果から、天然のシナプトタグミンと SNARE 複合体は Ca^{2+} 依存性に解離することが明らかとなった。

(2) HEK293 細胞で発現させた組換えシナプトタグミンは、脳から精製したスネア複合体とカルシウム非存在下で結合し、カルシウム濃度依存性に解離した ($IC_{50}=0.9$ mM)。組換えシナプトタグミンとシタキシンの結合も、カルシウム濃度依存性に阻害された ($IC_{50}=0.6$ mM)。シナプトタグミンの二つのカルシウム結合ドメイン、 C_2A と C_2B のカルシウム結合に重要なアスパラギン酸に変異を導入し、スネアからのカルシウム依存性解離に対する影響を調べたところ、シナプトタグミンの C_2A ではなく C_2B ドメインへのカルシウム結合が必須であることが明らかとなった。

(3) t-SNARE と v-SNARE を別々に再構成したりリポソームを反応させ、脂質膜間で *trans*-SNARE 複合体を形成させたところ、シナプトタグミンは Ca^{2+} 非存在下で結合した。両者の結合はカルシウムの添加により阻害された。

(4) 神経細胞からの伝達物質放出には C_2A よりも C_2B ドメインへのカルシウム結合が必須である

こと明らかにされている。したがって、本研究で得られた両者の解離に C_2B ドメインの Ca^{2+} 結合部位が必須であるという成果は、 Ca^{2+} によるシナプトタグミンのスネア複合体からの解離が伝達物質放出を引き起こすことを示唆する。このことは、これまで報告されている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の結果とは全く異なり、それらを基にした従来のモデルに替わる新しい仮説の提唱につながる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masumoto T, Suzuki K, Ohmori I, Michiue H, Tomizawa K, Fujimura A, Nishiki T, Matsui H., Ca^{2+} -independent syntaxin binding to the C_2B effector region of synaptotagmin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 査読有, 49 巻, 2012, 1-8, DOI 10.1016/j.mcn.2011.09.007

〔学会発表〕(計 11 件)

Masumoto, Nishiki ら, Requirement of Ca^{2+} binding to the C_2B for dissociation of synaptotagmin from *trans*-SNARE complexes. 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012 年 10 月 15 日, New Orleans, LA, USA.

Nishiki, Masumoto ら, Ca^{2+} -independent binding of synaptotagmin to syntaxin via its C_2B effector region. 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012 年 10 月 15 日, New Orleans, LA, USA.

Masumoto, Nishiki ら, Dissociation of synaptotagmin from *trans*-SDNARE complexes by Ca^{2+} -binding to the C_2B domain. 第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 29 日, 松本市.

鈴木, 西木ら, 神経伝達物質放出を司る SNARE 複合体からの Ca^{2+} センサーシナプトタグミンの解離. 第 63 回日本生理学会中国四国地方大会, 2011 年 10 月 22 日, 広島市.

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

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・
准教授

研究者番号: 70423340

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者
該当なし