

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460297

研究課題名(和文) シナプトタグミンが過渡的スネア複合体形成と膜融合に及ぼす影響の FRET による解析

研究課題名(英文) Effects of synaptotagmin binding on SNARE-mediated fusion and trans-SNARE complex formation

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜融合装置過渡的スネア複合体に及ぼすシナプトタグミンの結合の影響を調べた。リポソーム間の過渡的スネア複合体に結合させたシナプトタグミンはCa²⁺により解離した。FRETを利用したリポソーム融合アッセイにおいて、スネアによる膜融合はシナプトタグミン存在下で抑制されCa²⁺により回復した。過渡的スネア複合体中のスネア同士の状態のFRET解析により、シナプトタグミン結合時でもスネアモチーフは第6層まで会合していることが示唆された。この結果は、シナプス小胞のドッキング後形成される過渡的スネア複合体は、スネアモチーフ同士が結合した状態でCa²⁺流入まで保持されているとする完全ジッパー仮説を支持する。

研究成果の概要(英文)：SNAREs (syntaxin/SNAP-25/synaptobrevin) and synaptotagmin play central roles during Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. In this study, we have studied the effects of synaptotagmin binding on SNARE-mediated fusion and its complex formation. Synaptotagmin stoichiometrically bound to syntaxin in the liposomes containing t-SNAREs (syntaxin, SNAP-25) and dissociated from it by Ca²⁺. The fusion between synaptobrevin-liposomes and t-SNARE liposomes was inhibited in the presence of synaptotagmin cytoplasmic fragment. This inhibition was reversed by Ca²⁺. FRET analysis of trans-SNARE complex formation showed that the assembly of SNARE motifs appears to proceed to +6th layers when synaptotagmin binds syntaxin. These results support the idea where synaptotagmin suppresses SNARE-mediated membrane fusion through its syntaxin binding until Ca²⁺ influx without inhibiting the full assembly of the trans-SNARE complex.

研究分野：生理学

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 スネア (シンタキシン, SNAP-25) と V スネア (シナプトブレビン) と呼ばれる膜タンパク質のスネアモチーフ同士が、膜から遠い端からジッパーが閉まる様に順に結合し、複合体を形成することで膜が融合す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。

現在主流のモデルでは、 Ca^{2+} を感知したシナプトタグミンがスネアと結合し膜融合を誘発するとしている。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静止状態あるいは Ca^{2+} 非依存性にスネアによる小胞融合を阻害することが示唆されており、これらを説明できない従来の定説を疑問視する見解もあり、議論が続いているのが現状である。

私たちは、既存のモデルでは細胞からの伝達物質放出を上手く説明できないのは、その根拠となる結合実験で用いられている大腸菌発現組換えタンパクが溶液中では天然のタンパク質の機能を保持していないからだと考えた。そこで、ラット脳から可溶化したタンパク同士の結合実験を *in vitro* で行い、シナプトタグミンが T スネアの一つシンタキシンと Ca^{2+} 非存在下で結合すること、 Ca^{2+} により両者が解離することをこれまで明らかにし、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二つの膜の間に形成され始めた過渡的トランス型スネア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、スネア複合体の形成が再開され膜融合を引き起こす。

本研究ではこれまでの成果を発展させ、この仮説を裏付ける実験的証拠を得るため、シナプトタグミンが過渡的トランス型スネア複合体の形成を途中の状態に保持し、 Ca^{2+} と結合して解離するまでスネアの膜融合活性を抑制しているかどうかについて検証する。これが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) リポソーム間に形成させた過渡的トランス型スネア複合体に予め結合しているシナプトタグミンが、 Ca^{2+} 結合により解離することを定量的に明らかにする。

(2) シナプトタグミンの結合によりスネア媒介性の膜融合は抑制され、 Ca^{2+} による解離にともない膜融合が引き起こされることを明らかにする。

(3) シナプトタグミンの結合により過渡的トランス型スネア複合体の形成が、スネアモチーフの途中までが会合した状態で保持されているのか、あるいは膜貫通ドメイン直前のモチーフの第 8 層まで進行しているのか解析する。

(4) スネアによる小胞の開口放出において、速い同期性放出がシナプトタグミンにより制御されているのに対し、遅い非同期性放出はその類似タンパク質 Doc2 により制御されている可能性がある。Doc2 によるスネア制御機構の解析に先立ち、同タンパク質がシナプス前終末に局在することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 過渡的トランス型スネア複合体に結合したシナプトタグミンの Ca^{2+} 依存性解離

実験に用いた組換えタンパク質は、大腸菌で発現させ、精製した。V および T スネアを再構成したリポソームを 4 で終夜反応させ過渡的トランス型スネア複合体を形成させた。その際、シナプトタグミンの細胞質フラグメントを共存させ、過渡的トランス型スネア複合体に結合させた。1 mM Ca^{2+} または EGTA を添加後、37 度で 3 分間反応させた試料を密度勾配遠心により分離し、リポソームとともに上層に回収されたシナプトタグミンをイムノプロットングにより定量的に解析した。

(2) シナプトタグミンがスネア媒介性膜融合に及ぼす影響

スネアによる膜融合は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を応用した既報の脂質膜融合アッセイで測定した。シナプトタグミンの解離の影響を調べるため、中性リン脂質ホスファチジルコリンのリポソームを用いた。ローダミンおよび NBD で標識したリポソームに V スネアを、未標識のリポソームに T スネアをそれぞれ再構成した。両者を 96 穴プレート中で混和し、蛍光プレートリーダー中で NBD を励起しその蛍光を測定し膜融合率を算出した。

(3) スネア複合体形成に及ぼすシナプトタグミン結合の影響の FRET による解析

シンタキシンおよびシナプトブレビンのスネアモチーフのアミノ (N) 末端およびカルボキシル (C) 末端に位置するセリン (シンタキシン, Ser¹⁸⁸, Ser²⁴⁹; シナプトブレビン, Ser²⁸, Ser⁸⁰) を各々システインに置換する変異遺伝子を作製した。その際、スネアの内在性システインをセリンに置換した。発現ベクターに挿入した蛍光標識用組換え変異スネア遺伝子が大腸菌で発現させ精製した。

T スネア二量体中のシンタキシンは蛍光色素 Cy3 と、V スネアは Cy5 と、セリンを置換したシステイン残基にマレイミド反応によ

り共有結合させた。Cy3 標識 T スネアを再構成したりポソームと Cy5 標識シナプトプレビを再構成したりポソームとをシナプトタグミン存在下および非存在下で 96 穴プレート中で混和し、蛍光プレートリーダー中で Cy3 を励起した時に生じる Cy5 の蛍光を測定し、FRET 効率を算出した。

(4) シナプトタグミン類似タンパク質 Doc2 の免疫蛍光染色

抗 Doc2 抗体は同タンパク質の C 末端アミノ酸配列に相応な合成ペプチドに対するウサギ抗血清からアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。マウス海馬から初代培養した神経細胞を 9-13 日間、培養液中で維持し、定法に従い抗 Doc2 抗体とシナプス前終末マーカーシナプトタグミンあるいはシナプス後膜マーカー PSD95 に対する抗体を用いて間接二重免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

(1) 2 種類のリポソームの間で形成させたトランス型スネア複合体に予め結合させたシナプトタグミンは、続く Ca^{2+} の添加により約 50% が解離した。

(2) 先行研究では、シナプトタグミンがスネア媒介性膜融合に及ぼす影響について、 Ca^{2+} に依存したシナプトタグミンの脂質膜への刺入に焦点を当て、酸性リン脂質をリポソームに加え解析しているため、シナプトタグミンのスネアへの結合・解離の影響は不明である。本研究では、シナプトタグミンの結合・解離の影響を調べるため、スネアを中性リン脂質ホスファチジルコリンのリポソームに再構成し、FRET 法を利用した脂質膜融合アッセイを行った。その結果、スネアによる膜融合がシナプトタグミン存在下で抑制され Ca^{2+} により回復することが示された。

(3) シナプトタグミン結合が、リポソーム間での過渡的トランス型スネア複合体形成に及ぼす影響を調べた。シナプトタグミン存在下での N 末端標識ペアの FRET 効率は非存在下と同程度であった。シナプトタグミン存在下での C 末端標識ペアの FFRET 効率は非存在下に比べ約 20% 低かったが、有意差は認められなかった。

C 末端標識ペアのシナキシンおよびシナプトプレビの蛍光標識部位はともにスネアモチーフの第 6 層と第 7 層の間に位置する。小胞のドッキング後、T スネアと V スネアは、膜から遠い N 末端側のマイナス第 7 層からゼロ層へ、続いて第 1 層から膜近傍の 8 層へとジッパーが閉まるように結合すると考えられている。これらのことを考え合わせると、シナプトタグミンが結合してもスネア複合体は少なくともモチーフの第 6 層、おそらく第 7 層の直前まで会合していることが示唆された。この結果は、静止状態の神経終末

において、ドッキングしたシナプス小胞とシナプス前膜間で形成される過渡的トランス型スネア複合体のスネアモチーフ同士が C 末端まで結合した状態で Ca^{2+} 流入まで保持されているとする完全ジッパー仮説を支持する。

本研究で得られた成果と既報の知見を考え合わせると、スネア媒介性の膜融合においてシナプトタグミンがクランプとして作用する際に、スネアモチーフ同士の結合を阻害するのではなく、別のしくみでスネアによる膜融合を Ca^{2+} 流入まで抑制している可能性が考えられる。

(4) 副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出において、完全にジッパー結合した過渡的トランス型スネア複合体をもつ小胞からは速い成分が、ゼロ層付近まで部分的にジッパー結合したものは遅い成分がそれぞれ放出されることが示唆されている。N 末端半分がジッパー結合したトランス型スネア複合体を持つ小胞は、シナプトタグミンとは異なるクランプ機構によって遅い非同期性の成分として放出される可能性が考えられる。非同期性放出の Ca センサーの候補の一つ Doc2 は、シナプトタグミンの細胞質領域と類似した構造をもつ。しかし、Doc2 の神経系における局在は不明であった。そこで、組織染色に使用可能な特異抗体を精製し、初代培養マウス海馬神経細胞における分布を調べたところ、Doc2 がシナプス前終末に局在することが明らかとなった。

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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 1 件)

Iwafuji R, Fujino K, Matsushita H, Michiue H, Takahashi M, Nishiki T, Matsui H, Distribution of Doc2A and 2B in the central nervous tissue of rodents. 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Nishiki T, Kuroki K., Masumoto T., Matsui H., Springer, Ca^{2+} sensors: synaptotagmins. In Presynaptic Terminals. 2015, pp167-194.

〔産業財産権〕(計 0 件)

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

(4)研究協力者
藤野 加奈子 (FUJINO, Kanako)
岩藤 亮太 (IWAFUJI, Ryota)