



Title	神経活動依存的に発現制御される2つのC2-domainを持つ新規蛋白質N-copineの解析
Author(s)	中山, 隆志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169590
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

神経活動依存的に発現制御される 2 つの C2-domain を持つ
新規蛋白質 N-copine の解析

中山 隆志

神経活動依存的に発現制御される 2 つの C2-domain を持つ
新規蛋白質 N-copine の解析

中山 隆志

目次

緒論	1
本論	
第一章 RLCS system を利用したシナプス可塑性関連遺伝子の探索	3
第一節 RLCS system を利用したカイニン酸処理マウスの海馬 における遺伝子発現の解析	3
第二節 神経活動依存的に制御される N-copine mRNA の発現	5
第三節 マウスとヒトの完全長 N-copine cDNA の分離	7
第四節 N-copine の脳特異的発現	10
第五節 考察および小括	13
第二章 マウス脳における N-copine の発現分布および細胞内局在	15
第一節 マウス脳における N-copine mRNA の In situ ハイブリ ダイゼーション解析	15
第二節 マウス脳における N-copine 蛋白質の免疫組織染色解析	16
第三節 N-copine の Ca^{2+} 依存的な膜画分への結合	20
第四節 N-copine の 2 番目の C2-domain による Ca^{2+} 依存的リン 脂質結合	21
第五節 考察および小括	22
第三章 N-copine とヒト骨肉腫で高頻度に増幅される遺伝子の産物 OS-9 との Ca^{2+} 依存的結合	24
第一節 酵母 two-hybrid system を利用した N-copine 結合蛋白質 の探索	24
第二節 N-copine と OS-9 の in vivo での結合	26
第三節 N-copine と OS-9 の Ca^{2+} 依存的結合	27
第四節 N-copine と OS-9m RNA のヒト脳における発現分布	28
第五節 考察および小括	30

総括	31
結論	33
謝辞	34
引用文献	35

Abbreviations

Aa: amino acids
Asp: aspartate
bp: base pair
GST: glutathione-*S*-transferase
HA: hemagglutinin
IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb: kilobase
Leu: leucine
LTP: Long-term potentiation
NMDA-R: *N*-methyl-D-aspartate receptor
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerease chain reaction
PKC- γ : protein kinase C- γ
PLC- γ : phospholipase C- γ
RLCS: restriction landmark cDNA scanning
SSC: saline-sodium citrate
SDS: sodium dodecyl sulfate

緒 論

記憶、学習などに代表される脳の適応変化の基盤は、神経ネットワークをつなぐシナプス情報伝達効率の変化、すなわちシナプス可塑性であると考えられる。海馬 CA1 領域の長期増強(Long-term potentiation; LTP)は最もよく研究されているシナプス可塑性のモデルである(1)(Fig. 1)。海馬 CA1-LTP の誘導には NMDA 型グルタミン酸(NMDA)受容体を介した細胞内への Ca^{2+} 流入が必須である(2)。さらに長時間持続するような CA1-LTP が成立するためには新たな遺伝子発現が必要である(3-5)。ここで新たに合成される遺伝子産物は LTP により誘導されるシナプスの機能的変化あるいは形態的变化に関与していると考えられる。

これまでにシナプス可塑性成立に伴い発現誘導される遺伝子として、転写因子、増殖因子、シナプス小胞蛋白質、細胞外プロテアーゼ等が同定されている(6-12)。しかしながら、これらの遺伝子産物のシナプス可塑性における働きについては殆ど報告されておらず、シナプス可塑性の成立、維持機構に関してはまだ十分な解析がなされていない。また、Fazeli らはシナプス可塑性成立に伴って約 1%もの遺伝子が発現誘導されることを報告しており(13)、さらに多くのシナプス可塑性に関連する遺伝子が存在すると考えられる。

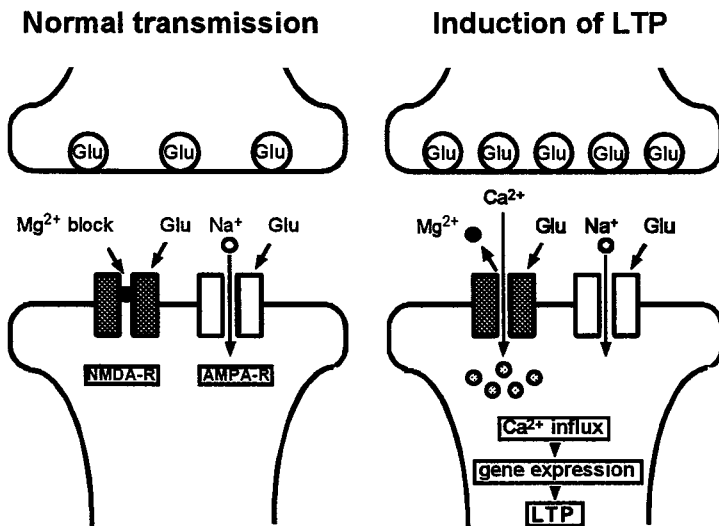


Fig. 1. Model for the induction of LTP in the CA1 region of the hippocampus. During normal transmission, glutamate(Glu) acts on both NMDA-R and AMPA-R. Na^+ flows through the AMPA-R but not through the NMDA-R because of the Mg^{2+} block of this receptor. Depolarization of the postsynaptic cell relieves the Mg^{2+} block of NMDA-R, allowing Ca^{2+} to flow through this receptor. The Ca^{2+} influx is a necessary trigger for gene expression leading to LTP.

カイニン酸は神経伝達物質グルタミン酸のアナログであり、マウスへのカイニン酸投与は海馬においてLTP様のシナプス増強を誘導することが知られている(14)。そこでシナプス可塑性に関わる遺伝子を同定するため、カイニン酸投与によりマウス海馬で発現増強し、NMDA受容体拮抗薬MK801の前投与によりその増強が阻害される遺伝子、すなわちカイニン酸投与によりマウス海馬においてNMDA-R依存的に発現増強する遺伝子の探索を行った。方法としては、鈴木らが開発した新しい2次元cDNA-display systemであるRLCS(restriction landmark cDNA scanning)を利用した(15)。その結果、カイニン酸投与マウスの解析により、カイニン酸投与により海馬でNMDA-R依存的に発現増強する22の既知及び11の新規遺伝子を同定することに成功した。本研究では、RLCS解析により同定された遺伝子の中から、脳特異的な発現を示し、2つのC2-domainを持つ蛋白質をコードする新規遺伝子、N-copineの機能解析を行った。N-copineはヒトCopine I(16)と高い相同性を示し、新しい蛋白質ファミリーを形成している。N-copineの中樞神経系での役割を明かすため、マウス脳における発現分布と細胞内局在を調べた。さらに、N-copineの機能を解明するため、酵母two-hybridスクリーニングによりN-copineに結合する蛋白質を同定し、その発現及び機能解析を行った。

本 論

第一章 RLCS system を利用したシナプス可塑性関連遺伝子の探索

シナプス可塑性成立に伴い発現誘導される遺伝子が同定されているがその数は少なく、またそのような発現遺伝子産物のシナプス可塑性における役割についても殆ど報告されていない。そこで、さらにシナプス可塑性に関連する遺伝子を同定するため、カイニン酸投与によりマウス海馬において発現増強する遺伝子を探索した。カイニン酸は神経伝達物質グルタミン酸のアナログであり、マウスへのカイニン酸投与は海馬において LTP 様のシナプス増強を誘導することが知られている(14)。カイニン酸投与により海馬で NMDA-R 依存的に発現増強する遺伝子群を同定するために、鈴木らが開発した新しい 2 次元 cDNA-display system である RLCS(restriction landmark cDNA scanning)を利用した(15)。RLCS においてそれぞれの cDNA は 2 次元ゲルの特定の位置にスポットとして検出される。また、異なる条件下におけるそれぞれのスポットの強度の変化はその対応する遺伝子の発現変動を反映し、一度に 1000~2000 遺伝子の発現変動を解析することが可能である。カイニン酸投与マウスの RLCS 解析により、カイニン酸投与により海馬で NMDA-R 依存的に発現増強する 33 のスポットを同定することに成功した。それぞれのスポットから cDNA 断片を回収して塩基配列を決定した結果、そのうち 11 が新規の遺伝子であった。それらの中で、脳特異的な発現を示す 1 つの新規遺伝子に着目して解析を行った。その新規遺伝子にコードされた蛋白質は、Protein kinase C で同定された Ca^{2+} 結合領域である C2-domain を 2 つ持っていた。また、ヒトの Copine I(16)と相同性を示すことから、この蛋白質を N-copine(Neuronal-copine)と命名した。

第一節 RLCS(restriction landmark cDNA scanning)を利用したカイニン酸投与マウスの海馬における遺伝子発現の解析

(1) 実験材料および実験方法

動物

すべての動物は Shionogi Animal Use and Care Committee の基準に従い倫理的に処置した。カイニン酸(Sigma)は BALB/c 雌性マウス(6-7 週齢)に腹腔内投与(8 mg/kg)した。NMDA 受容体拮抗薬 MK801(RBI)はカイニン酸投与の 30 分前に腹腔内投与(5 mg/kg)した。マウスは頸椎脱臼により安楽死させ脳を摘出した。

RLCS

RLCS は既に報告されている方法に従って行った(15)。1次元目の制限酵素として *Bam*HI と *Bgl*III を用い、2次元目の制限酵素として *Hinf*I を用いた。

(2) 実験結果

カイニン酸投与によりマウス海馬で発現増強する遺伝子を同定するために、我々の開発した新しい2次元 cDNA-display system である RLCS を利用した(15)。RLCS においてそれぞれの cDNA は2次元ゲルの特定の位置にスポットとして検出される。また、異なる条件下におけるそれぞれのスポット強度の変化はその対応する遺伝子の発現変動を反映する。

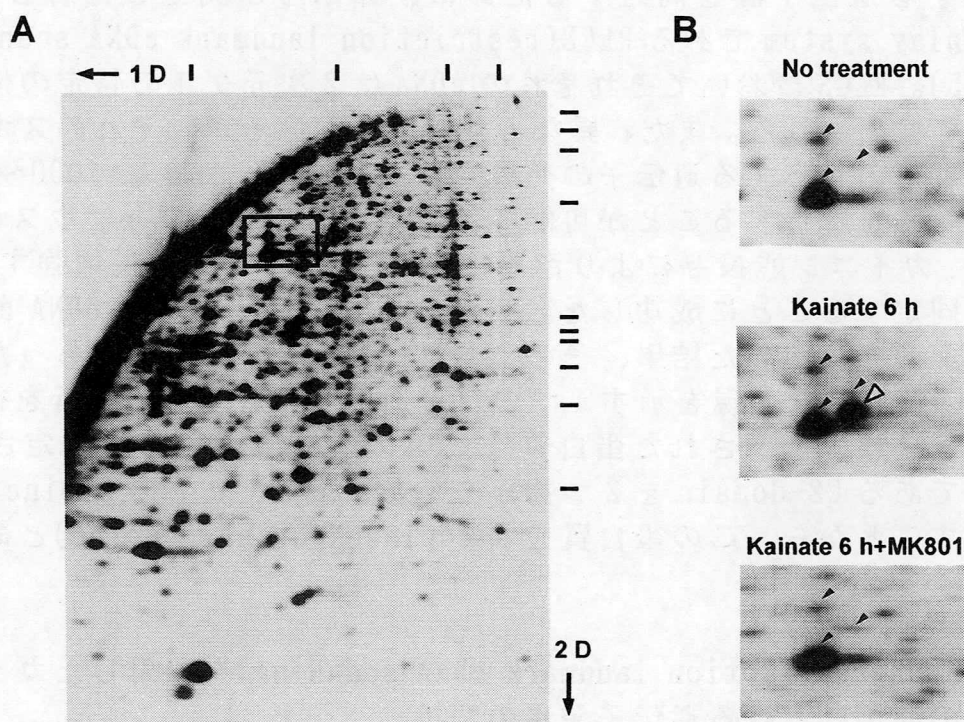


Fig. 2. RLCS analysis of hippocampus cDNA from kainate-injected mice. (A) Whole profile of non-treated mice. Arrows show the directions of 1st- and 2nd-dimensional electrophoresis (1D and 2D, respectively). The scales are 1.88, 1.49, 0.93, and 0.42 kbp (from right to left) in 1D, and 1357, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118 and 72 bp (from top to bottom) in 2D. The region around spot 50 (surrounded by a square) is zoomed up in (B). (B) Profiles around spot 50 from mice not treated, 6 h after kainate injection and 6 h after kainate injection with MK801 pretreatment. Open arrowhead shows spot 50. Closed arrowheads show the spots whose intensities are not changed.

カイニン酸投与したマウス海馬と無処置のマウス海馬の間で RLCS のスポットを比較し、カイニン酸投与により強度の増強するスポットを同定した (Fig. 2A)。N-copine cDNA 断片はそれらの中の 1 つ、スポット 50 から単離された。スポット 50 の強度はカイニン酸投与後 6 時間で増強されるが、2 時間、24 時間ではその増強は見られなかった。また、NMDA 受容体拮抗薬 MK801 の前投与はその増強を阻止した (Fig. 2B)。これらの結果は、N-copine mRNA の発現がカイニン酸投与により NMDA 受容体依存的に増強されることを示す。

第二節 神経活動依存的に制御される N-copine mRNA の発現

(1) 実験材料および実験方法

In situ ハイブリダイゼーション

In situ ハイブリダイゼーションは既に報告されている方法に従って行った (17)。カイニン酸投与、LTP 誘導有無のマウス脳組織から 8 μ m 厚の新鮮凍結切片を作製した。³⁵S ラベルしたリボプローブは定法に従って作製した。ジゴキシゲニンラベルしたリボプローブは SP6 and T7 polymerase kit (Boehringer) を用いて作製した。リボプローブ合成の鋳型には、pSPORT2 ベクター (GIBCO BRL) に挿入した N-copine cDNA のヌクレオチド 509-2019 に対応する DNA 断片と 5'-非翻訳領域に対応する DNA 断片を用いた。ハイブリダイゼーションは 55°C で 16 時間行い、洗浄は 55°C で 2 × SSC 溶液と 0.2 × SSC 溶液中で行った。用いた 2 つのリボプローブは、In situ ハイブリダイゼーション解析において、同じ結果を示した。陰性コントロールとしてはセンスプローブを用いた。

電気生理学的実験

BALB/c 雌性マウス (8 週齢) から海馬スライス (400 μ m) を作製し、電気生理学的実験は安居らの方法に従って行った (18)。テスト刺激 (0.1 msec、0.033 Hz) を CA3 領域の錐体細胞からのびるシャーフアー側枝に与え、CA1 領域の錐体細胞体層で細胞外のフィールド電位を記録した。LTP は、5 分おきに 3 回のテタヌス刺激 (1 sec、100 Hz) を与えることにより誘導した。LTP を誘導してから 6 時間まで、300% 以上のフィールド電位を記録した。

(2) 実験結果

In situ ハイブリダイゼーションにより、カイニン酸投与後 6 時間で N-copine mRNA が海馬、特に CA1 領域の錐体細胞において発現増強されることを確認した (Fig. 3A)。カイニン酸投与後 2 時間、24 時間ではその発現増強は見られなかった。また、グリア細胞ではシグナルが全く検出されなかったため、N-copine の発現が神経細胞特異的であると結論した。さらに海馬 CA1-LTP の誘導により N-copine mRNA の発現増強が見られるかどうかを調べた。マウス海馬スライス上で、高頻度刺激 (3 回のテタヌス刺激) により CA1-LTP を誘導し、CA1-LTP が 6 時間持続したことを確認した。その海馬スライスより切片を調製して In situ ハイブリダイゼーションを行った (Fig. 3B)。N-copine mRNA の発現は CA1 領域の錐体細胞で有意に増強していた。他の領域の神経細胞ではそのような発現増強は見られなかった。また、同じ海馬スライスより調製した隣接切片において、既に LTP 誘導に伴い発現増強されることが報告されている Proenkephalin mRNA (7) も同様に発現増強されることを確認した。これらの結果より、CA1 錐体細胞における N-copine mRNA の発現増強は CA1-LTP の成立とよく相関することを明かとした。

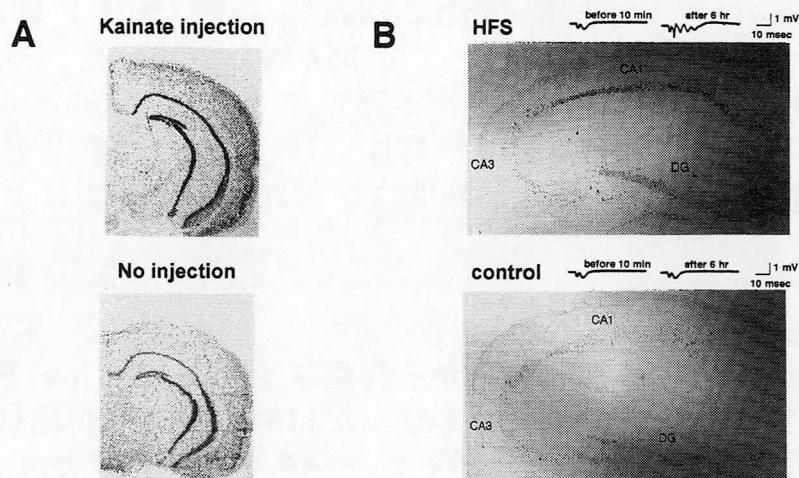


Fig. 3. Up-regulation of N-copine mRNA expression in hippocampus by neuronal activity. (A) *In situ* hybridization of brain frontal sections from mice 6 h after kainate injection or no injection. ^{35}S -labeled riboprobe specific for N-copine mRNA was used. (B) *In situ* hybridization of hippocampal slices 6 h after high-frequency stimulation (HFS) evoking CA1-LTP or no stimulation (control). Digoxigenin-labeled riboprobe specific for N-copine mRNA was used.

第三節 マウスとヒトの完全長 N-copine cDNA の単離

(1) 実験材料および実験方法

N-copine cDNA の単離

スポット 50 から回収した cDNA 断片は、PCR 法(15)により pSPORT2 ベクター(GIBCO BRL)に挿入した。この cDNA 断片をプローブとし、 λ gt10 マウス脳 cDNA ライブラリー(CLONTECH)をブランクハイブリダイゼーションでスクリーニングし、マウス N-copine の完全長 cDNA を単離した。ヒト N-copine の完全長 cDNA は PCR 法によりヒト脳 cDNA ライブラリー(GIBCO BRL)から単離した。用いたプライマーはマウス N-copine とヒト EST クローンの塩基配列(GenBank 登録番号 T15557; クローン T15557 はマウス N-copine の 3'-非翻訳領域に対応する)をもとに作製した。cDNA の塩基配列は両鎖ともに決定した。マウス N-copine cDNA の中には、RLCS 解析に用いた *Bgl*III と *Hinf*I の切断部位が RLCS プロファイルから予想される位置に存在していた。これらの塩基配列は DDBJ、EMBL と GenBank データベースに登録した(AB008893、AB009288)。

(2) 実験結果

スポット 50 から回収した cDNA 断片をプローブとして、マウス脳 cDNA ライブラリーより完全長の N-copine cDNA を単離した。そのサイズは 2.1 kb で、ノザンプロット解析により得られた転写産物のサイズとよく一致する(Fig. 6A)。また、ヒト脳 cDNA ライブラリーより完全長のヒト N-copine cDNA を単離した。ヒトとマウスの cDNA には、1つの長いオープンリーディングフレームが存在し、ともに 557 アミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。最初のメチオニン周囲の塩基配列は Kozak rule(19)に従い、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナルが存在していた。N-copine cDNA がコードする蛋白質は全体的に親水性であり、シグナル配列や膜貫通領域は存在しなかった(Fig. 4)。ヒトとマウスのアミノ酸配列の相同性は 98%であり、非常に保存性の高い蛋白質であった。GenBank データベース解析により、N-copine と最も高い相同性を示す蛋白質としてヒト Copine I(16)を同定した。ヒト N-copine とヒト Copine I のアミノ酸配列の相同性は 49%であった。このことより、N-copine は Copine ファミリーのメンバーであることが明かとなった。

```

m N-copine MSDPEMGWVPEPPAMTLGASRVELRVSCHGLLDRD TLTKPHP-CVLLKLYSDEQWVEVERTEV 62
h N-copine MSDPEMGWVPEPPTMTLGASRVELRVSCHGLLDRD TLTKPHP-CVLLKLYSDEQWVEVERTEV 62
h Copine I MAH-----CVTL----VQLSISCDHLIDKDIGSKSDPLCVLLQDVGGGSWAE LGRTER 49

```

C2A-domain

```

m N-copine LRSCSSPVFSRVLAI EYFFEEKQPLQFHVFDAEDGATSPSSDTFLGSTECTLGQIVSQT KVT K 130
h N-copine LRSCSSPVFSRVLAI EYFFEEKQPLQFHVFDAEDGATSPRNDTFLGSTECTLGQIVSQT KVT K 130
h Copine I VRNCSSPEFSKTLQLEYRFETVQKLRFGIYDIDNKTPELRDDDFLGGAEC SLGQIVSSQVLT L 117

```

C2B-domain

```

m N-copine PLLLNKGKTAGKSTITIVAEVSGTNDYVQLTFRAHKL DNKDLFSKSDPFMEIYKTNGDQSDQ 188
h N-copine PLLLNKGKTAGKSTITIVAEVSGTNDYVQLTFRAYKL DNKDLFSKSDPFMEIYKTNE DQSDQ 188
h Copine I PLMLKPGKPA GRGTITVSAQELKD-NRVVTMEVEARNLDKKDFLGKSDPFLEFFRQGDGKW-H 173

```

```

m N-copine LVWRTEVVKNNLNPSWEPFRLSLHSLCSCDIHRPLKFLVYDYDSSGKHDFIG EFTSTFQEMQE 251
h N-copine LVWRTEVVKNNLNPSWEPFRLSLHSLCSCDVHRPLKFLVYDYDSSGKHDFIG EFTSTFQEMQE 251
h Copine I LVYRSEVIKNNLNPTWKRFSVPVQHFCGGNPSTPIQVQCSDYDSGSDHDLIGTFHTSLAQLQ- 230

```

```

m N-copine GTANPGQEMQWDCINPKYRDKKKNYKSSGTVVLAQCTVEKVHTFLDYIMGGCQISFTVAIDFT 314
h N-copine GTANPGQEMQWDCINPKYRDKKKNYKSSGTVVLAQCTVEKVHTFLDYIMGGCQISFTVAIDFT 314
h Copine I --AVFA---EFECIHPEKQKKKSYKNSGTIRVKICRVETEYSFLDYVMGGCQINFTVGVDFT 293

```

```

m N-copine ASNGDPRSSQSLHCLSPRQPNHYLQALRTVGGICQDYDSDKRFP AFGFGARIPP NFEVSHDFA 377
h N-copine ASNGDPRSSQSLHCLSPRQPNHYLQALRAVGGICQDYDSDKRFP AFGFGARIPP NFEVSHDFA 377
h Copine I GSNGDPSSPDSLHYLSPTGVNEYLMALWSVGSVVQDYDSDKLFP AFGFGAQVPPDWQVSHEFA 356

```

```

m N-copine INFDPENPECEEISGVIASYRRCLPQIQLYGPTNVAPIINRVAEPAQREQSTGQATKYSVLLV 440
h N-copine INFDPENPECEEISGVIASYRRCLPQIQLYGPTNVAPIINRVAEPAQREQSTGQATKYSVLLV 440
h Copine I LNFNFSNPHYCAGIQGIVDAYRQALPQVRLYGPTNFAPIINHVARFAAQA AHQGTASQYFM LLL 419

```

```

m N-copine LTDGVVSDMAETRTAIVRASRLPMSIIIVGVGNADFS DMRLLDGDDGPLRC PKGVPAARDIVQ 503
h N-copine LTDGVVSDMAETRTAIVRASRLPMSIIIVGVGNADFS DMRLLDGDDGPLRC PKGVPAARDIVQ 503
h Copine I LTDGAVTDVEATREAVVRASNL PMSVIIIVGVGGADFEAMEQLDADGGPLH TRSQAAARDIVQ 482

```

```

m N-copine FVPFRDFKDAAPSALAKCVLAEVPROVVEYYASQGISPGAPRP-STPAMTFSPSP 557
h N-copine FVPFRDFKDAAPSALAKCVLAEVPROVVEYYASQGISPGAPRP-CTLATTFSPSP 557
h Copine I FVPYRRFQNA PREALAQT VLA EVPTQLVSYFRAQGWAPLKLP LPSAKDPAQAQFA 537

```

Fig. 4. Alignment of amino acid sequences of mouse and human N-copine (m, h N-copine), and of human copine I (h copine I). Identical amino acid residues are shaded. Hyphens show gaps. Solid lines show C2-domains.

A

N-copine A	20	SRVELRVSCHGELDRDTLT	KPHCECVLLK	YS-DEQWVEVERTEVLRSC-S
N-copine B	152	DYVQLTFRAYKLDNKDL	FSKSDPFMEIYKTNEGQSDQLVWRTEVVKNN-L	
Copine I A	6	TLVQLSISCDHLIDKD	IGSKSDPLCVLLQDVGGGSWAE	LGRTERVRNC-S
Copine I B	138	RVVTMEVEARNLDKKD	FLGKSDPFLEFFRQGDGKW-HLVYRSEVIKNN-L	
PLC-γ	1095	AISIEVLGARHLP-KDGR	GIVCFPFVEIEVAG-AEYDSTKQKTEFVVDNGL	
PKC-γ	172	EIHVTVGEARNLIPMD	PNGLSDPYVKIKLIP-DPRNLTKQKTRTVKAT-L	
Syt I A	158	QLLVGIIQAELPALD	MGGTSDPYVKVFLP---DKKKKFETKVHRKT-L	
Syt I B	289	KLTVVILEAKNLDKMD	VGGLSDPYVKIHLMO-NGKRLKFKKTTIKNT-L	
Doc2α A	103	TLHVCILRAKGLKPM	DFNGLADPYVKLHLLP-GACKANKLTKTQRNT-L	
Doc2α B	297	GLLVGILRCAHLAAMD	VNGYSDPYVKTYLRP-DVDKKS	SKHKTCVKKKT-L

• • •

N-copine A	67	SPVF-SRVLAL	E-YFFEEKQPLQFHVFDAEDGATSPRND	TLFGSTECTLG
N-copine B	200	NPSW--EPERLS	LHSLCSCDVHRPLKFLVYDYDSSGKH	D-FIGEFTSTFQ
Copine I A	55	SPEF-SKTLQ	LEYRFETVQKLRFGIYDIDNKTPELR	DD-FLGGAECSLG
Copine I B	186	NETW--KRFS	VPVQHFCGNGNPSTPIQVQCS	DYDSDGSHE-LIGTFHTSLA
PLC-γ	1142	NPVWPAKPFHFQ---	ISNPEFAFLRFVYEE	DMFSDQN-FLAQATFPVK
PKC-γ	218	NPVW-NETF	VFN--LKP	GDVERR-LSVEVWDWDRTSRND-FMGAMSFGVS
Syt I A	203	NPVF-NEQ	FTFK--VPYSELGGKTLVMAVYD	FRFSKHD-IIGEFKVPMN
Syt I B	336	NPYY-NES	SFSFE--VPFEIQKVQVVTVLDYDKIGND	-AIGKVFGYN
Doc2α A	152	NPVW-NED	LTYS-GITDDDI	THKVLRIAVCEDKLSHNE-FIGEIRVPLR
Doc2α B	314	NPEF-NEE	FFYE--IELSTLATKTLEVTVWDYD	IGKSND-FIGGVSLGPG

B

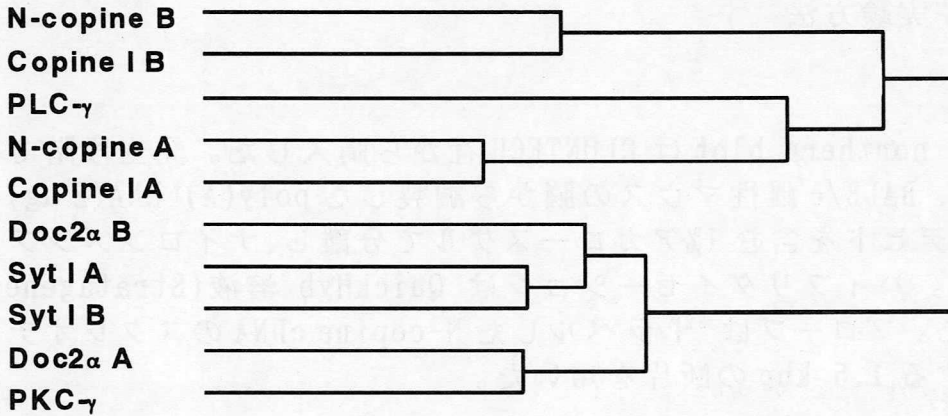


Fig. 5. Domain structure of N-copine. (A) Sequence alignment of two C2-domains (classified as A, B) present in N-copine, copine I, synaptotagmin I, Doc2α. The C2-domain in each phospholipase C-γ (PLC-γ) and protein kinase C-γ (PKC-γ) is also aligned. Amino acid residues conserved in more than five kinds of C2-domains are shown on black backgrounds. Dots show the five conserved aspartate residues that are considered to be important for Ca²⁺-binding. The asterisk shows the conserved threonine residue, which serves as a putative phosphorylation site. (B) Phylogenetic tree. Evolutionary distances between the C2-domains from various proteins were estimated with the Gene Works (IntelliGenetics).

N-copine のアミノ酸配列で最も特徴的なのは、Protein kinase C で Ca^{2+} 結合領域として同定された C2-domain(20)を 2 つ持っていることである。N-copine の C2-domain は他の蛋白質の C2-domain に典型的なアミノ酸を保存していた (Fig. 5A)。特に 2 番目の C2-domain は Ca^{2+} 結合に必須の 5 つのアスパラギン酸を保存していた (21)。2 つの C2-domain を持つ蛋白質ファミリーとして、Südhof らは Synaptotagmin、Rabphilin-3A、Doc2 等により形成される “Double C2-domain protein family” を提唱している (22)。しかし、N-copine と Copine I は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、“Double C2-domain protein family” には属しないと考えられる。第 1 に、C2-domain での系統解析から、N-copine と Copine I の 2 つの C2-domain は Synaptotagmin や Doc2 のそれよりもむしろ PLC- γ のそれに相同性が高い (Fig. 5B)。第 2 に、N-copine と Copine I の 2 つの C2-domain はアミノ末端側に存在しているが、“Double C2-domain protein family” の蛋白質では全てカルボキシ末端側に存在している。

第四節 N-copine の脳特異的発現

(1) 実験材料および実験方法

ノザンブロット解析

Multi-tissue northern blot は CLONTECH 社から購入した。発生段階での発現を調べるため、BALB/c 雌性マウスの脳から調製した poly(A)⁺ RNA (2 μg) は 0.66M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブランにブロットした。ハイブリダイゼーションは QuickHyb 溶液 (Stratagene 社製) を用いて行った。プローブは ^{32}P ラベルした N-copine cDNA のヌクレオチド 509-2019 に対応する 1.5 kbp の断片を用いた。

アフィニティ精製抗 N-copine ポリクローナル抗体の作製

マウス N-copine の 4-161 aa に対応する cDNA 断片を PCR により増幅し、GST 融合蛋白質発現ベクター、pGEX3T-3 (Pharmacia) に挿入した。GST 融合蛋白質は IPTG 誘導により *E. coli* (DH5 α) で産生させ、Glutathione-Sepharose 4B ビーズ (Pharmacia) を用いてアフィニティ精製した。精製した GST 融合 N-copine 蛋白質を定法に従ってウサギに免疫し、抗血清を得た。血清中の GST に対する抗体は GST を固定した Sepharose 4B カラムを用いて除去した。N-copine 蛋白質に特異的な抗体は、N-copine を固定した Sepharose 4B カラムを用いてアフィニティ精製した。

ウエスタンブロット解析

BALB/c 雌性マウスの脳は 5 倍容量の 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、10 µg/ml leupeptin を含む溶液中でテフロンポッター・ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートの SDS-PAGE(23)を行い、PVDF メンブラン(Millipore)にブロットした。10%スキนมilkを含む PBS 溶液でブロッキングした後、メンブランはウサギ抗 N-copine 抗体(70 ng/ml)と反応させ、それから 2000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識の抗ウサギ IgG 抗血清(CAPPEL)と反応させた。検出は ECL system(Amersham)を用いて行った。

(2) 実験結果

種々の組織における N-copine mRNA の発現をノザンブロット解析により調べた。ヒトとマウスで N-copine 特異的な 2.2 kb の転写産物は脳でのみ検出され、他の組織ではそのバンドは全く検出されなかった(Fig. 6A)。さらに、脳の発生段階における N-copine mRNA の発現を調べた。N-copine mRNA は胎児期の 19 日で初めて検出され、出生時まで徐々に上がった。出生後、その発現は劇的な上昇を示した(Fig. 6B)。マウス脳での N-copine 蛋白質の発現を確認するために、N-copine の 1 番目の C2-domain に対するアフィニティ精製ポリクローナル抗体を作製してウエスタンブロット解析を行った。マウス脳ホモジネート中に、約 62 kDa のシングルバンドが検出された(Fig. 6C)。このサイズは N-copine のアミノ酸配列より計算された値(61.7 kDa)とよく一致した。これらの結果より、ヒトとマウスにおける N-copine の発現は脳特異的であることが明かとなった。

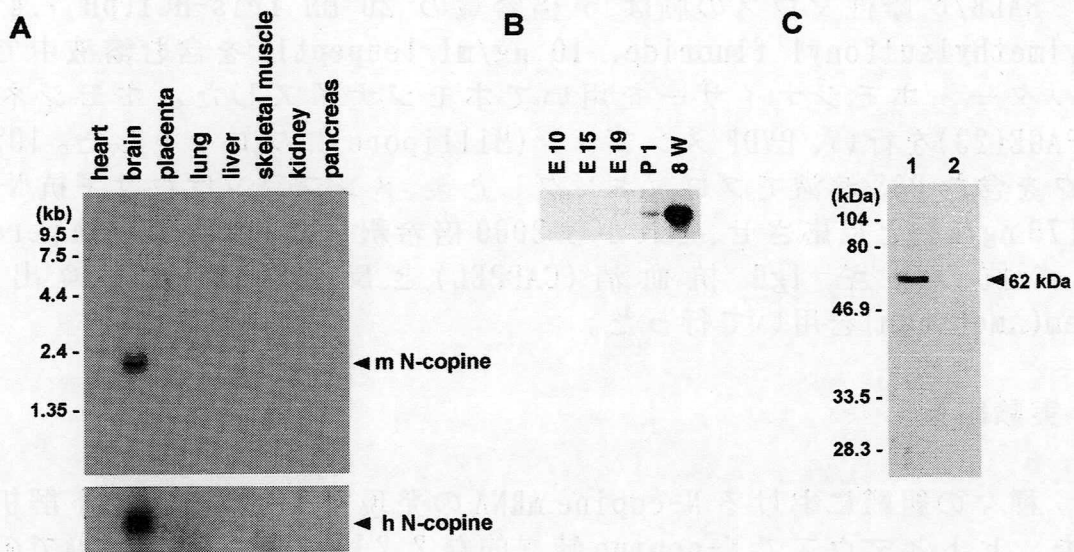


Fig. 6. Brain-specific expression of N-copine. (A) Multi-tissue northern blot analyses of N-copine mRNA expression in adult mouse (upper panel) and human (lower panel). (B) Developmental expression of N-copine mRNA in mouse brain. Poly(A)⁺ RNA derived from mice brain of embryonic day 10, 15, and 19 (E10, E15, and E19, respectively), and postnatal 1 day and 8 weeks (P1 and 8W, respectively) was used for the analysis. (C) Detection of N-copine in mouse brain homogenate with anti-N-copine antibody (lane 1). As a control the antibody was absorbed with the excess amount of N-copine (lane 2). Position of N-copine (62 kDa) is indicated.

第五節 考察および小括

(1) 考察

本研究において、RLCS を利用した発現遺伝子探索により、カイニン酸投与したマウス海馬で NMDA 受容体依存的に発現増強される脳特異的な新規遺伝子として N-copine を同定した。カイニン酸投与はマウス海馬において LTP 様のシナプス増強を誘導することが知られている(14)。また、LTP の誘導には NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入が必須である(2)。実際に N-copine mRNA の発現が CA1-LTP を誘導する高頻度刺激により増強されることを明かにした。これらの結果より、N-copine はシナプス可塑性に関与すると考えられる。カイニン酸による N-copine mRNA の発現増強は投与後 6 時間までは見られなかった。データは示していないが、この経時的変化は Proenkephalin mRNA の経時的変化と同様であった。対照的に最初期遺伝子である c-fos や Zif 268 はカイニン酸投与後 2 時間で発現誘導された。N-copine はシナプス可塑性の誘導というよりはむしろ、その維持に関与している可能性が考えられる。

N-copine は Ca^{2+} 依存的リン脂質結合蛋白質のヒト Copine I と有意の相同性を示した。EST データベース解析より、Copine がファミリーを形成し、少なくともヒトとマウスで 6 つ以上の Copine ファミリー蛋白質が存在することは明かである。また、Copine ファミリー蛋白質はゾウリムシからヒトに至るまで保存されている。N-copine はその発現分布から Copine ファミリーの脳特異的なメンバーであると考えられる。ヒト N-copine とヒト Copine I のアミノ酸配列の比較は、Copine ファミリーにおいて保存された領域を明かにした。N-copine と Copine I の C2-domain 領域の相同性は 40% であるのに対し、カルボキシ末端領域は 60% の相同性を示した。カルボキシ末端領域は Copine ファミリーに特異的な未知の機能を持っていることが示唆される。N-copine や Copine ファミリー蛋白質の生理的役割は殆どわかっていないが、ゾウリムシからヒトまで保存されている Copine ファミリーの蛋白質は生体内において重要な役割を果たしていると考えられる。

N-copine は Protein kinase C で Ca^{2+} 結合領域として同定された C2-domain(20)を 2 つ持っていた。N-copine の 2 番目の C2-domain は、他の C2-domain を持つ蛋白質の解析から Ca^{2+} 結合に必須であることが明かとなっている 5 つのアスパラギン酸を保存していた(21)。N-copine も同様に Ca^{2+} 結合能を有すると考えられる。これまでに 2 つの C2-domain を持つ蛋白質として Synaptotagmin、Rabphilin-3A、Doc2 等が同定されており(24-26)、これらの蛋白質は "Double C2-domain protein family" を形成している(22)。"Double C2-domain proteins" は、神経細胞において主に軸索やプレシナプス部位に局在し、神経伝達物質放出において重要な役割を果たしている(27, 28)。N-copine と Copine I は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、これらの C2-domain の

配列は”Double C2-domain proteins”よりもむしろ PLC- γ と高い相同性を示した。さらに、”Double C2-domain proteins”の 2 つの C2-domain はカルボキシ末端側に存在するのに対し、N-copine と Copine I の 2 つの C2-domain はアミノ末端側に存在していた。そのため N-copine と Copine I は、”Double C2-domain protein family”のメンバーに属さないと思われる。N-copine は神経細胞において”Double C2-domain proteins”による神経伝達物質放出とは異なる役割を果している可能性が考えられる。

(2) 小括

- 1) 2 つの C2-domain を持つ新規蛋白質、N-copine を同定した。
- 2) N-copine が Copine ファミリーの脳特異的なメンバーであることを明らかにした。
- 3) N-copine mRNA の発現がカイニン酸投与により海馬で NMDA 受容体依存的に増強されることを明らかにした。
- 4) N-copine mRNA の発現が CA1-LTP を誘導する高頻度刺激により増強されることを明らかにした。

第二章 マウス脳における N-copine の発現分布および細胞内局在

第 1 章において、2 つの C2-domain を持つ新規の蛋白質、N-copine を同定したことを示した。N-copine は Ca^{2+} 依存的リン脂質結合蛋白質、ヒト Copine I(16)と相同性を示すことから、Copine ファミリーの脳特異的なメンバーである。N-copine と Copine I は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、それらの構造から“Double C2-domain protein family”に属しないと考えられる。神経細胞において“Double C2-domain proteins”は神経伝達物質の放出に参与している(27, 28)。しかしながら、神経細胞における N-copine の役割は“Double C2-domain proteins”による神経伝達物質放出とは異なる可能性が考えられる。本章では、N-copine の中枢神経系での役割を明かにするため、マウス脳における N-copine の発現分布および細胞内局在を調べた。さらに N-copine と“Double C2-domain proteins”の神経細胞における局在を比較解析した。

第一節 マウス脳における N-copine mRNA の In situ ハイブリダイゼーション解析

(1) 実験材料および実験方法

In situ ハイブリダイゼーション

第一章、第二節に準じた。

(2) 実験結果

Fig. 7 は、マウス脳における N-copine mRNA の In situ ハイブリダイゼーション解析を示している。シグナルは主嗅球、副嗅球、海馬に限局して観察された(Fig. 7A, C, D)。海馬では、強いシグナルは CA1-CA3 領域の錐体細胞と歯状回の顆粒細胞で観察され、CA3 領域の錐体細胞が最も強いシグナルを示した(Fig. 7C)。対照的に CA2 領域の錐体細胞のシグナルは非常に弱かった(Fig. 7C)。主嗅球と副嗅球では、顆粒細胞が最も強いシグナルを示した(Fig. 7D)。僧帽細胞層でもシグナルは検出された。また弱いながらも大脳皮質第 2 層の神経細胞もシグナルが陽性であった(Fig. 7B)。脳幹や脊椎の 1 部の神経細胞でも陽性シグナルが検出された。調べた限りにおいてグリア細胞ではシグナルが全く検出されなかったため、N-copine mRNA の発現が神経細胞特異的であると結論した。

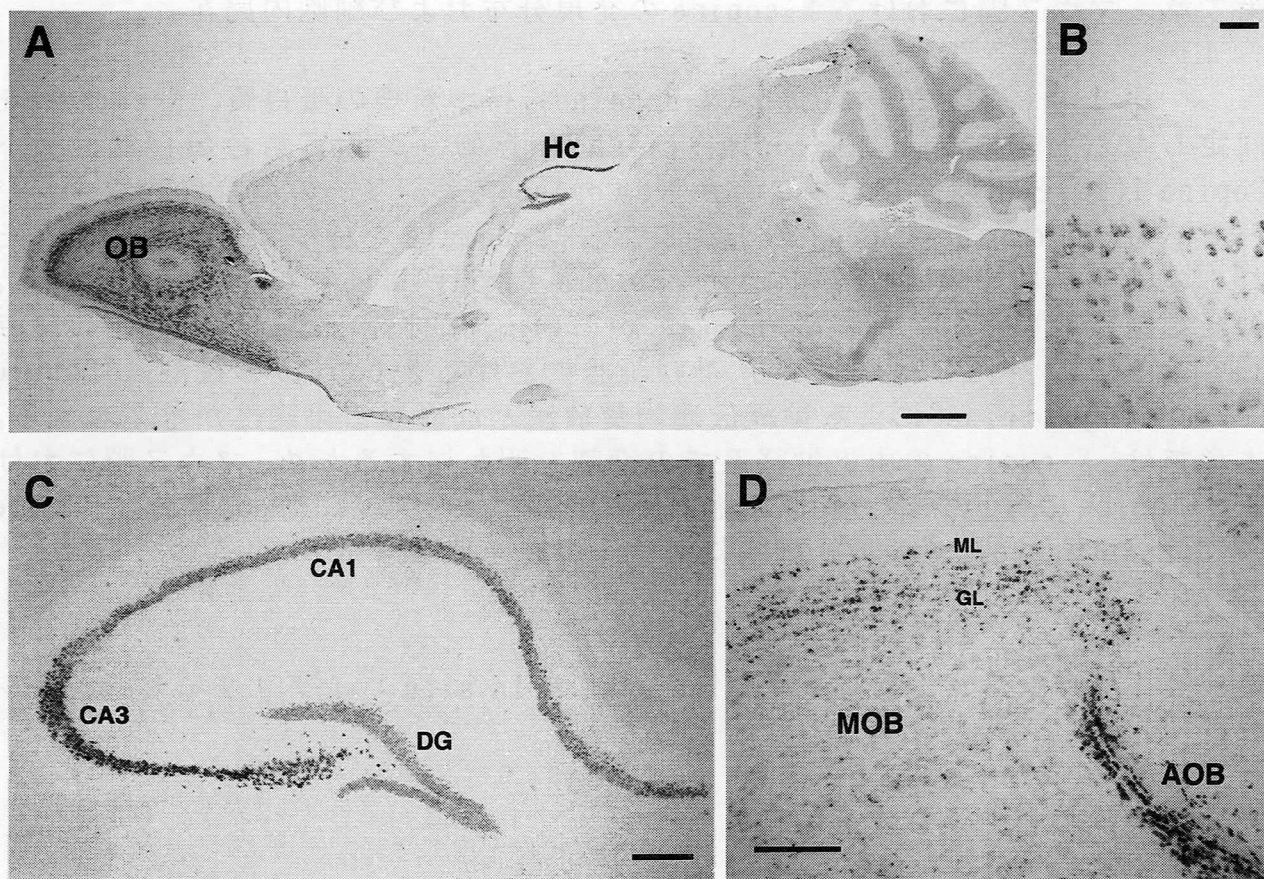


FIG. 7. In situ hybridization analysis of the expression of N-copine in mouse brain. Images showing signals for the whole brain (A), cerebral cortex (B), olfactory bulb (D) from sagittal sections, and hippocampus from a frontal section (C). Abbreviations are as follows: Hc, hippocampus; OB, olfactory bulb; DG, dentate gyrus; AOB, accessory olfactory bulb; MOB, main olfactory bulb; GL, granule cell layer; ML, mitral cell layer. Scale bars are 1 mm (A), 50 μ m (B) and 200 μ m (C, D).

第二節 マウス脳における N-copine 蛋白質の免疫組織染色解析

(1) 実験材料および実験方法

アフィニティ精製抗 N-copine ポリクローナル抗体の作製

C2A-domain に対する抗体は第 1 章、第四節で示したアフィニティ精製抗体を用いた。さらにカルボキシ末端領域に対する抗体を作製した。方法は第 1 章、第四節に準じた。

ウエスタンブロット解析

方法は第1章、第四節に準じた。ウサギ抗 N-copine C2A domain 抗体、カルボキシ末端領域抗体(70 ng/ml)を用いて行った。

免疫組織染色

BALB/c 雌性マウスをエーテル麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸溶液(pH 7.2)で脳を灌流固定した。脳を摘出してアルコールで脱水し、パラフィン包埋して 8 μ m 厚の切片を作製した。切片は 0.3%過酸化水素を含むメタノール溶液中で反応させ、PBS 溶液で平衡化した。3%ヤギ正常血清を含む PBS 溶液でブロッキングした後、切片はウサギ抗 N-copine C2A domain 抗体、カルボキシ末端領域抗体(0.5 - 4 μ g/ml)、マウス抗 Synaptotagmin I 抗体(5 - 15 μ g/ml)、マウス抗 Rab3A 抗体(0.6 - 2 μ g/ml)と反応させ、ビオチン化したヤギ抗ウサギ IgG 抗血清(DAKO)またはビオチン化したヤギ抗マウス IgG 抗血清(KPL)と反応させ、horseradish peroxidase 標識したアビジン(Vectastain Elite; Vector)と反応させた。検出は 3, 3'-diaminobenzidine を用いて行った。陰性コントロールは正常ウサギ IgG(4 μ g/ml)と反応させた。マウス抗 Synaptotagmin I 抗体は Wako 社から、マウス抗 Rab3A 抗体は Santa Cruz 社から購入した。

(2) 実験結果

マウス N-copine に対する 2 つのアフィニティ精製ポリクローナル抗体を調製した。ウエスタンブロット解析により、2 つの抗体はマウス脳ホモジネートで N-copine に特異的な約 62 kDa のシングルバンドを検出した(Fig. 8)。これらの抗体を利用して、マウス脳における N-copine 蛋白質の免疫組織学的局在を調べた。両方の抗体は全く同様の染色結果を示した。陽性シグナルを示した領域や細胞は、In situ ハイブリダイゼーション解析により得られた結果と全く同様であった(Fig. 9)。海馬において錐体細胞と顆粒細胞が強く染色された(Fig. 9A, C)。また、強い染色は CA1-CA3 領域の放線層や歯条回の分子層で見られた(Fig. 9C)。錐体細胞からの軸索が伸びる CA1-CA3 領域の多形細胞層の染色性は非常に弱かった(Fig. 9A, C)。強拡大により CA1-CA3 領域の錐体細胞の細胞体と樹状突起で染色が検出された(Fig. 9D, F)。主嗅球と副嗅球では、顆粒細胞が強く染色された(Fig. 9D, E)。強拡大で、顆粒細胞も細胞体と樹状突起に強い染色が検出された(Fig. 9E)。これらの結果より、N-copine が特定の神経細胞においてその細胞体と樹状突起に主に局在していることが明らかとなった。

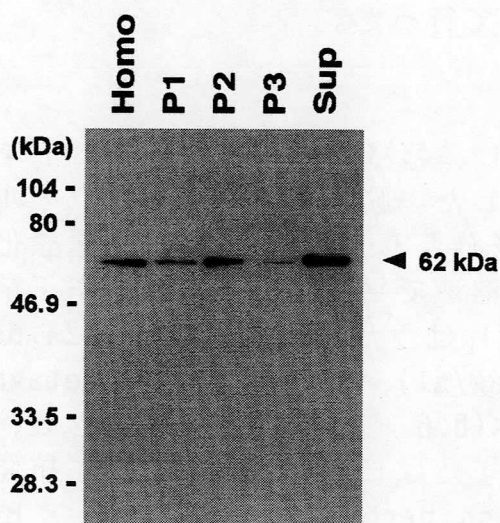


FIG. 8. Subcellular distribution of N-copine. Detection of N-copine by western blot with anti-C2A in mouse brain homogenate (Homo), membrane fractions, (P1, P2, P3 fractions) and cytosol fraction (Sup). Position of N-copine (62 kDa) is indicated. Positions of molecular weight markers are shown on the left.

N-copine との細胞内局在を比較するため、“Double C2-domain protein family”のメンバーである Synaptotagmin I(22)と Rab3A(29)の免疫組織染色を行った。両方の蛋白質は主にプレシナプス部位に局在し、シナプス小胞と結合して存在していることが報告されている(27, 28)。これらの蛋白質の染色パターンは全く同様であり、N-copine の染色パターンとは異なっていた。海馬の CA1 領域では、Synaptotagmin I と Rab3A に対する抗体は、ともに多形細胞層と放線層を強く染色した。しかしながら、これらの抗体は錐体細胞の細胞体や樹状突起は染色しなかった(Fig. 9G, H)。このように神経細胞における N-copine の局在は Synaptotagmin I や Rab3A といったシナプス小胞結合蛋白質の局在とは全く異なることが明かとなった。

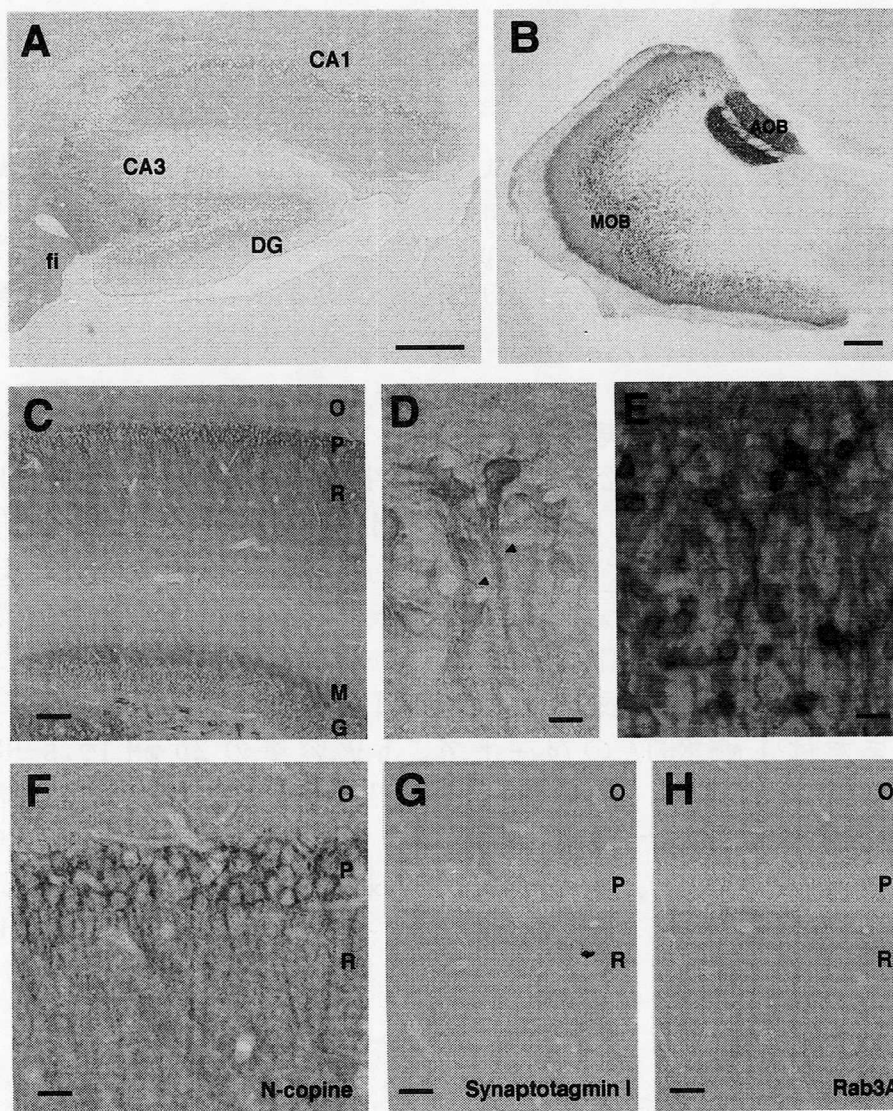


FIG. 9. Localization of N-copine protein in mouse brain. Immunohistochemical images with anti-C2A (A) and anti-C-terminus (B - F) showing whole hippocampus (A), whole olfactory bulb (B), layer structure of hippocampal CA1 and dentate gyrus (C), CA3 pyramidal cells (D), granule cells in main olfactory bulb (E) and hippocampal CA1 (F). Localizations of synaptotagmin I and rab3A in hippocampal CA1 are compared (G, H). Abbreviations are as follows: DG, dentate gyrus; fi, fimbria; O, stratum oriens; P, CA1 pyramidal cell layer; R, stratum radiatum; M, molecular layer of dentate gyrus; G, granule cell layer; AOB, accessory olfactory bulb; MOB, main olfactory bulb. Scale bars are 250 μ m (A), 500 μ m (B), 100 μ m (C), and 25 μ m (D-G).

第三節 N-copine の Ca^{2+} 依存的な膜画分への結合

(1) 実験材料および実験方法

GST 融合蛋白質の作製

マウス N-copine の 3 つの領域 (C2A 領域、4-161 aa; C2B 領域、141-270 aa; カルボキシ末端領域、240-428 aa) に対応する cDNA 断片を PCR により増幅し、GST 融合蛋白質発現ベクター、pGEX3T-3 (Pharmacia) に挿入した。GST 融合蛋白質 (GST-C2A、GST-C2B、GST-カルボキシ末端領域) の精製は第一章、第二節に準じた。

マウス脳ホモジネートの分画実験

マウス脳は 5 倍容量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM EDTA を含む溶液中でテフロンボッター・ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。マウス脳ホモジネートは、既に報告されている方法に従って 3 つの膜分画 (P1、P2、P3) と細胞質分画に分けた (30)。それぞれの分画を等量 (10 μg) 用いてウエスタンブロット解析を行った。N-copine 蛋白質の Ca^{2+} 依存的な膜分画への移行を調べるため、マウス脳は 1 mM CaCl_2 または 1 mM EGTA の存在下で、5 倍容量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む溶液中でテフロンボッター・ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートは 4°C で 30 分間放置した後、4°C で 40,000 $\times g$ 、30 分間遠心分離して上清 (細胞質分画) と沈殿物 (膜分画) に分画化した。それぞれの分画の等容量をウエスタンブロット解析に用いた。

ウエスタンブロット解析

方法は第 1 章、第四節に準じた。ウサギ抗 N-copine C2A domain 抗体、カルボキシ末端領域抗体 (70 ng/ml)、マウス抗 Doc2- α 抗体 (2000 倍希釈)、マウス抗 PKC- γ 抗体 (2000 倍希釈) を用いて行った。マウス抗 Doc2- α 抗体は阪口岳 (塩野義製薬) より供給された。マウス抗 PKC- γ 抗体は ZYMED 社から購入した。

(2) 実験結果

マウス脳ホモジネートの分画実験において、N-copine 蛋白質は主に細胞質と P2 分画に局在していた (Fig. 8)。N-copine の膜画分における局在が Ca^{2+} に依存するかどうかを調べた。マウス脳ホモジネートを Ca^{2+} の存在下と非存在下で調整して細胞質画分と膜画分に分画した。 Ca^{2+} 非存在下では N-copine は主に細胞質画分で検出された (Fig. 10)。一方、 Ca^{2+} 存在下では N-copine は殆ど膜分画に存在していた。C2-domain を介して Ca^{2+} 依存的リン脂質に結合するこ

とが知られている PKC- γ と Doc2 α も、同様に Ca^{2+} 存在下では膜分画に存在していた。このように N-copine は Ca^{2+} の存在下において膜分画に局在していることが明かとなった。

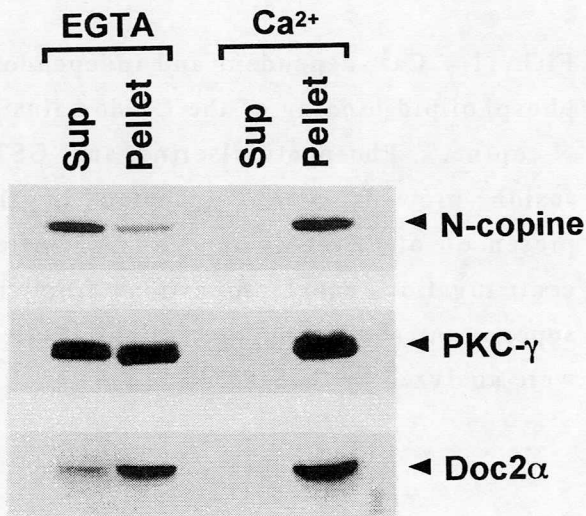


FIG. 10. Ca^{2+} -dependent association of N-copine with the membrane fraction. Mouse brains were homogenized in the presence of EGTA or Ca^{2+} and centrifuged. Equal proportions of the supernatant (Sup) and precipitant (Pellet) were analyzed by western blot with antibodies specific for N-copine (anti-C2A), PKC- γ and Doc2 α .

第四節 N-copine の 2 番目の C2-domain による Ca^{2+} 依存的リン脂質結合

(1) 実験材料および実験方法

リン脂質結合実験

フォスファチジルセリン(Sigma)は 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.4)、100 mM NaCl を含む溶液に懸濁して超音波処置した。2 mM CaCl_2 または 2 mM EGTA 存在下、同じ溶液中でフォスファチジルセリン(1.6 mg/ml)と GST-C2Aまたは GST-C2B(それぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とを混合し、室温で 15 分間放置した。それから室温で $10,000 \times g$ 、20 分間遠心分離した。等容量の上清と沈殿物(それぞれ反応溶液の 2 μl 相当)は SDS-PAGE と銀染色により解析した。

(2) 実験結果

N-copine の 2 つの C2-domain のリン脂質結合能を調べた。それぞれの C2-domain の GST 融合蛋白質をフォスファチジルセリンと反応させ、遠心分離してフォスファチジルセリンを分離した。 Ca^{2+} の存在下において GST-C2B(2 番目の C2-domain)はフォスファチジルセリンと共沈したが、 Ca^{2+} の非存在下においては共沈しなかった(Fig. 11)。一方、GST-C2A(1 番目の C2-domain)は Ca^{2+} の存在下と非存在下のいずれでもフォスファチジルセリンと共沈した。GST 単

独では共沈は見られなかった。このように N-copine の C2B-domain は Ca^{2+} 依存的リン脂質結合を示すこと、また C2A-domain は Ca^{2+} 非依存的リン脂質結合を示すことが明かとなった。

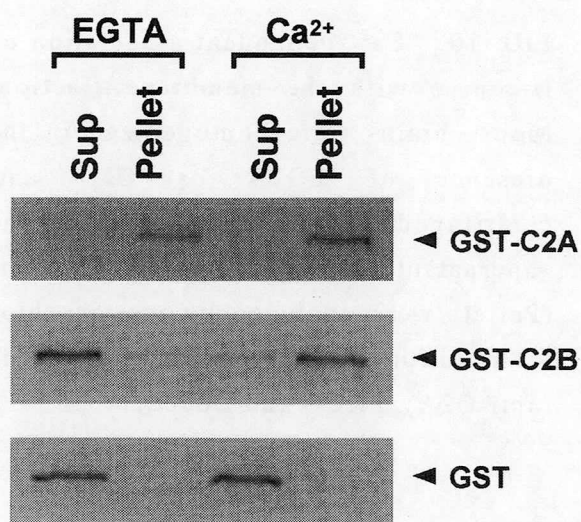


FIG. 11. Ca^{2+} -dependent and independent phospholipid-binding of the C2-domains of N-copine. Phosphatidylserine and GST-fusion proteins were incubated in the presence of EGTA or Ca^{2+} . After centrifugation, equal proportions from the supernatant (Sup) and precipitant (Pellet) were analyzed by SDS-PAGE.

第五節 考察および小括

(1) 考察

N-copine は脳特異的な発現を示す 2 つの C2-domain を持つ新規蛋白質である。N-copine の発現は神経活動依存的に増強されることから、シナプス可塑性に関与すると考えられる。N-copine の中枢神経系での役割を明かするため、マウス脳における N-copine の発現分布を調べた。In situ ハイブリダイゼーション解析は、N-copine の発現がマウス脳において海馬と嗅球に局限していることを示した。また、その発現は神経細胞に特異的であった。さらに、N-copine に特異的なポリクローナル抗体を作製して N-copine の免疫組織染色を行った結果、In situ ハイブリダイゼーション解析で得られた結果と同様の発現分布が確認された。マウスにおいて海馬や嗅球は記憶や学習のために重要な領域である(1, 14, 31-33)。以上の結果より、N-copine の脳における発現分布は可塑性との関連が高い領域に局限されていることが明かとなった。

N-copine はシグナル配列や膜貫通領域を持たないにも関わらず、細胞質画分と膜画分に存在していた。その膜画分への局在は Ca^{2+} に依存していた。これらの結果は、N-copine が細胞内 Ca^{2+} の上昇に伴い細胞質から膜に移行することを示唆する。N-copine の C2B-domain 領域と GST との融合蛋白質が Ca^{2+} 依

存的なフォスファチジルセリンとの結合を示すため、この特性は C2B-domain によるものと考えられる。さらに、その C2B-domain は、他の C2-domain を持つ蛋白質で Ca^{2+} 結合に必須であると考えられている 5 つのアスパラギン酸を保存していた(22)。N-copine は Ca^{2+} センサーとして細胞質から膜に移行すると考えられる。

N-copine と Copine I は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、それらの構造から "Double C2-domain protein family" のメンバーに属さないと考えられる。そのため神経細胞における N-copine の役割は "Double C2-domain proteins" のようなプレシナプス部位での神経伝達物質の放出とは異なる可能性が考えられる。本章において、N-copine と Synaptotagmin I 及び Rab3A の免疫組織染色を行うことにより、マウス脳の神経細胞において N-copine は "Double C2-domain proteins" と異なる局在を示すことを明かとした。特に、海馬 CA1-CA3 領域で N-copine は錐体細胞の細胞体と樹状突起で強く発現していたが、錐体細胞からの軸索が伸びる多形細胞層での発現は見られなかった。この結果は、神経細胞において N-copine が、主にポストシナプス部位に局在することを示す。対照的に、Synaptotagmin I とシナプス小胞特異的蛋白質、Rab3A の発現は多形細胞層で見られ、細胞体と樹状突起では見られなかった。以上の結果より、Synaptotagmin I や他の "Double C2-domain protein" がプレシナプス部位で役割を果たしているのに対し、N-copine は主に細胞体と樹状突起に局在し、ポストシナプス部位で役割を果たしていると考えられる。

(2) 小括

- 1) In situ ハイブリダイゼーション解析と免疫組織染色により、N-copine の発現がマウス脳において海馬と嗅球の神経細胞に局限して発現していることを明かにした。
- 2) マウス脳ホモジネートにおいて N-copine は細胞質画分と膜画分に存在し、 Ca^{2+} 依存的に膜画分に移行することを明かにした。
- 3) N-copine の 2 番目の C2-domain が Ca^{2+} 依存的にフォスファチジルセリンと結合することを明かにした。
- 4) 神経細胞において N-copine 蛋白質は主に細胞体と樹状突起に局在することを明かにした。

第三章 N-copine とヒト骨肉腫で高頻度に増幅される遺伝子の産物、OS-9 との Ca^{2+} 依存的結合

第2章までに、シナプス可塑性関連遺伝子として N-copine を同定し、神経細胞のポストシナプス部位において Ca^{2+} センサーとして機能することを示した。神経細胞における N-copine のポストシナプス部位での局在は Synaptotagmin や Rabphilin などの "Double C2-domain proteins" のプレシナプス部位での局在とは全く異なるため、N-copine は "Double C2-domain proteins" とは異なる機能を持つと考えられる。しかしながら、N-copine や Copine ファミリー蛋白質の機能は殆どわかっていない。本章では、N-copine の機能を明かとするための最初のステップとして酵母 two-hybrid system による N-copine 結合蛋白質の探索を行った。

第一節 酵母 two-hybrid system を利用した N-copine 結合蛋白質の探索

(1) 実験材料および実験方法

酵母 two-hybrid system

マウス N-copine の 240-428 aa に対応する cDNA 断片は PCR により増幅し、pLexA ベクター (CLONTECH) に挿入した (pLexA-N-copine)。レポータープラスミド p8op-lacZ を含む酵母菌株 EGY48 を pLexA-N-copine と pB42AD マウス脳 cDNA ライブラリー (CLONTECH) で形質転換した。形質転換菌はロイシンを欠失した選択培地で増殖させた。ロイシン陽性のコロニーは X-gal フィルターに転写し、 β -galactosidase 活性を測定した。ロイシン⁺と lacZ⁺の酵母菌からプラスミドを精製して大腸菌を形質転換し、その形質転換菌からプラスミドを回収した。回収したプラスミドを用いて再度 pLexA-N-copine と共に p8op-lacZ を含む酵母菌株 EGY48 を形質転換し、ロイシン⁺と lacZ⁺を確認した。それらの中の1つの陽性クローンはヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9 のカルボキシ末端領域と高い相同性を示すペプチドをコードする cDNA 断片を含んでいた (pB42AD-OS-9)。

N-copine の OS-9 結合領域の解析

N-copine の OS-9 との結合領域を決定するため、マウス N-copine の様々な領域 (1-161、1-270、141-270、141-428、240-428、310-428 aa) に対応する cDNA 断片を PCR により増幅し、pLexA ベクターに挿入した。酵母菌株 EGY48 をそれぞれのプラスミドと pB42AD-OS-9 で形質転換し、 β -galactosidase 活性を測定した。

(2) 実験結果

酵母 two-hybrid system を利用して、N-copine の 240-428 aa の領域に結合する蛋白質をマウス脳 cDNA ライブラリーより探索した。全部で 1×10^7 の酵母形質転換菌をスクリーニングし、ロイシン⁺と lacZ⁺を示す 28 クローンを得た。それらの中の 1 つの cDNA は、最初にヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9(34)のカルボキシ末端領域(536-667 aa)と 90%の相同性を示すアミノ酸配列をコードしていた。単離された cDNA のコードする蛋白質がヒト OS-9 のマウスホモログであると結論した(GenBank accession No. U41635)。しかしながら、 β -galactosidase assay により得られた結合活性は必ずしも強くなかった。そこで酵母 two-hybrid system を用いて、再度 N-copine の OS-9 との結合領域を調べた。Fig. 12 に示したように、N-copine の 2 番目の C2-domain が最も強い結合活性を示した。さらに、全ての 2 番目の C2-domain を含む領域で結合活性が見られた。1 番目の C2-domain やカルボキシ末端領域にはそのような結合活性は見られなかった。これらの結果より、N-copine の 2 番目の C2-domain が OS-9 のカルボキシ末端領域に結合する本来のドメインであることが明かとなった。

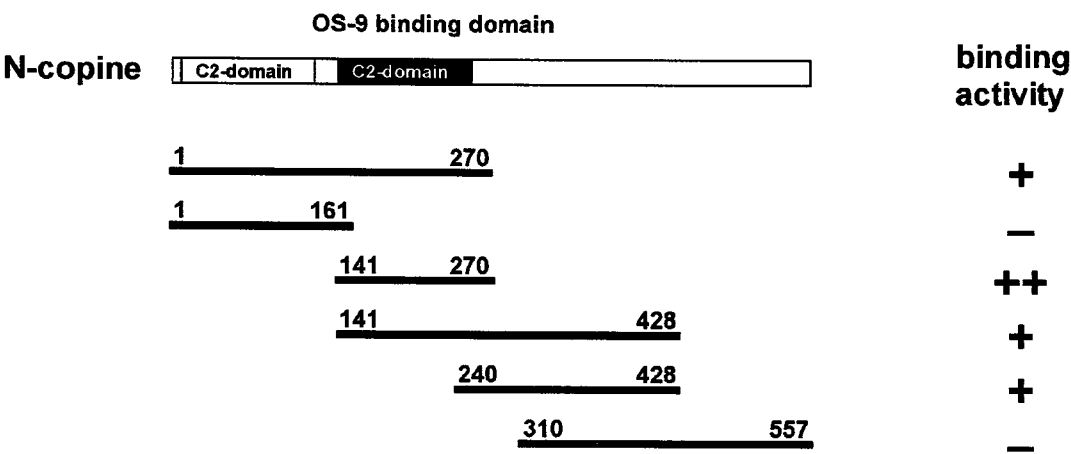


Fig. 12. Binding of N-copine and OS-9 in the yeast two-hybrid system. The domain structure of N-copine is depicted with relative location of the C2-domains and the OS-9 binding domain. Various truncated N-copines were used to determine the OS-9-binding domain. Binding activities of truncated N-copines and OS-9 were examined by β -galactosidase assay. The number of plus signs corresponds to blue color intensity on the X-gal indicator filter.

第二節 N-copine と OS-9 の in vivo での結合

(1) 実験材料および実験方法

免疫沈降解析

メチオニンコドンを含む FLAG エピトープ(DYKDDDDK)または HA エピトープ(YPYDVPDYA)を pEFBOS ベクター(35)の *Xba*I 部位に挿入して pEFBOS-FLAG と pEFBOS-HA を作製した。マウス N-copine の 3 つの領域(1-161、1-557、310-557 aa)に対応する cDNA 断片は PCR により増幅し、pEFBOS-FLAG ベクターに挿入した。ヒト OS-9 のカルボキシ末端領域(536-667 aa)に対応する cDNA 断片は PCR により増幅し、pEFBOS-HA ベクターに挿入した。 2×10^6 個の 293E 細胞を 12 時間培養した後、発現プラスミド(それぞれ 5 μ g)は様々な組み合わせで Lipofectamine Plus reagent(GIBCO BRL)を用いて導入した。200 μ g/ml のハイグロマイシン存在下で 48 時間培養した後、細胞は 600 μ l の 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40 を含む溶液で溶解した。細胞のホモジネートからマウス抗 FLAG 抗体(Kodak)を用いて免疫沈降を行った。冷やした同じ溶液で 5 回洗浄した後、免疫沈降物を SDS-PAGE(23)で分離し、PVDF メンブラン(Millipore)に転写した。10%スキンミルクを含む PBS 溶液でブロッキングした後、メンブランはマウス抗 HA 抗体(500 倍希釈)と反応させ、それから 2000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識の抗マウス IgG 抗血清(CAPPEL)と反応させた。検出は ECL system(Amersham)を用いて行った。マウス抗 HA 抗体は Boehringer 社から購入した。

(2) 実験結果

In vivo での N-copine と OS-9 の結合を確認するため、アミノ末端に FLAG タグを付加した N-copine とアミノ末端に HA タグを付加した OS-9 のカルボキシ末端領域を 293T 細胞に導入した。抗 FLAG 抗体を用いて、その細胞溶解液から N-copine 蛋白質を免疫沈降し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。Fig. 13 に示したように、HA タグを付加した OS-9 は FLAG タグを付加した N-copine とともに共沈した。対照的に、N-copine の 1 番目の C2-domain やカルボキシ末端領域では、OS-9 は共沈されなかった。これらの結果より、N-copine が哺乳動物の細胞中においても生理的に OS-9 と結合できることが明らかとなった。

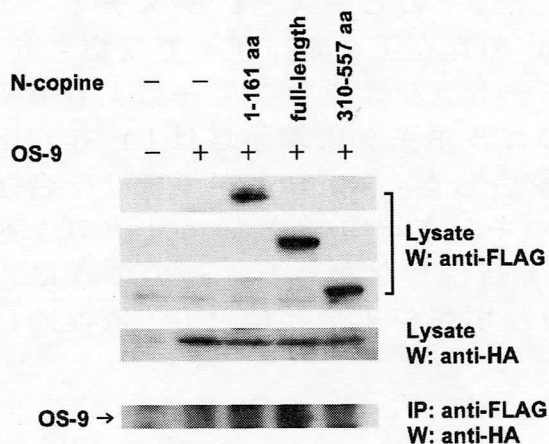


Fig. 13. Interaction of N-copine and OS-9 in vivo. 293E cells were transiently transfected with expression vectors for the indicated tagged proteins. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG antibody. Immunoprecipitates and the whole cell lysates were immunoblotted with anti-FLAG or anti-HA antibody. IP, immunoprecipitation; W, Western blotting.

第三節 N-copine と OS-9 の Ca^{2+} 依存的結合

(1) 実験材料および実験方法

In vitro での結合解析

マウス N-copine の 2 つの領域(C2A-domain、4-161 aa; C2B-domain、141-270 aa)に対応する cDNA 断片を PCR により増幅し、GST 融合蛋白質発現ベクター pGEX3T-3(Pharmacia)に挿入した。GST 融合蛋白質(GST-C2A、GST-C2B)を IPTG 誘導により *E. coli*(DH5 α)で産生させ、Glutathione-Sepharose 4B ビーズ(Pharmacia)を用いてアフィニティ精製した。ヒト OS-9 のカルボキシ末端領域(536-667 aa)に対応する cDNA 断片は pRSET-A ベクター(Invitrogen)に挿入した。 ^{35}S ラベルした OS-9 のカルボキシ末端領域は TNT T7-coupled reticulocyte lysate system(Promega)を用いて調製した。GST-C2A または GST-C2B(4 μg)を、20 μl の Glutathione-Sepharose 4B ビーズに固定し、そのビーズを ^{35}S ラベルした OS-9 のカルボキシ末端領域を含む 500 μl の溶液 A(150 mM NaCl and 50 mM HEPES, pH 7.4)に懸濁し、1 mM CaCl_2 または 1 mM EGTA 存在下 4°C で 4 時間反応させた。溶液 A で 4 回洗浄後、結合した蛋白質は 20 mM glutathione を含む 40 μl の溶液 A で溶出した。溶出された蛋白質を SDS-PAGE で分離し、オートラジオグラフィーにより解析を行った。

(2) 実験結果

N-copine の 2 番目の C2-domain と OS-9 のカルボキシ末端領域の結合が Ca^{2+} 依存性かどうかを調べた。N-copine の 2 つの C2-domain と GST との融合蛋白質(1 番目の C2-domain、GST-C2A; 2 番目の C2-domain、GST-C2B)を作製し

て Glutathione-Sepharose ビーズに固定した。そのビーズと ^{35}S メチオニンラベルした OS-9 のカルボキシ末端領域を Ca^{2+} の存在下、非存在下で反応させた。溶出された蛋白質の SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィーにより解析を行った。Fig. 14 に示したように、OS-9 のカルボキシ末端領域は Ca^{2+} 存在下でのみ、N-copine の 2 番目の C2-domain と結合した。 Ca^{2+} 非存在下では結合は全く見られなかった。さらに、OS-9 のカルボキシ末端領域は N-copine の 1 番目の C2-domain とは、 Ca^{2+} の有無に関わらず結合しなかった。このように、N-copine の 2 番目の C2-domain は OS-9 のカルボキシ末端領域と Ca^{2+} 依存的に結合することが明かとなった。

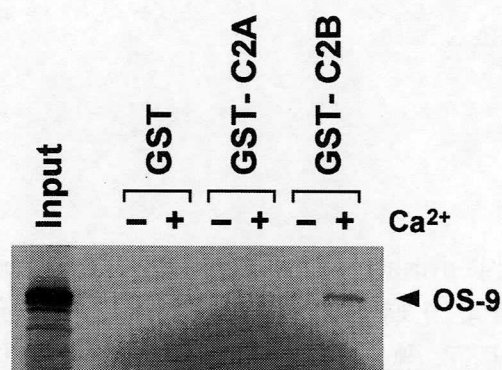


Fig. 14. Ca^{2+} -dependent binding of N-copine and OS-9. GST or GST fused with the first or the second C2-domain of N-copine was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with the ^{35}S -methionine-labeled carboxy-terminal region of OS-9 (536-676 aa) in the presence or absence of Ca^{2+} . Bound proteins were eluted with glutathione and subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography. Input shows the in vitro translated products of the carboxy-terminal region of OS-9.

第四節 N-copine と OS-9m RNA のヒト脳における発現分布

(1) 実験材料および実験方法

ノザンブロット解析

方法は第一章、第四節に準じた。Multi-tissue northern blot は CLONTECH 社から購入した。プローブは ^{32}P ラベルしたヒト N-copine cDNA のヌクレオチド 509-2019 に対応する DNA 断片とヒト OS-9 cDNA のヌクレオチド 509-2019 に対応する DNA 断片を用いた。

(2) 実験結果

N-copine mRNA はマウスとヒトにおいて脳特異的に発現している (Fig. 6)。そこで N-copine mRNA と OS-9 mRNA のヒト脳の様々な領域における発現をノザンブロット解析により調べた。N-copine に特異的な 2.2-kb の転写産物がヒト脳の全ての領域で検出された (Fig. 15)。また、OS-9 に特異的な 2.8-kb の転写産物も同様にヒト脳の全ての領域で検出された。これらの結果より、N-copine mRNA と OS-9 mRNA はヒト脳において同じ領域で発現していることが明かとなった。

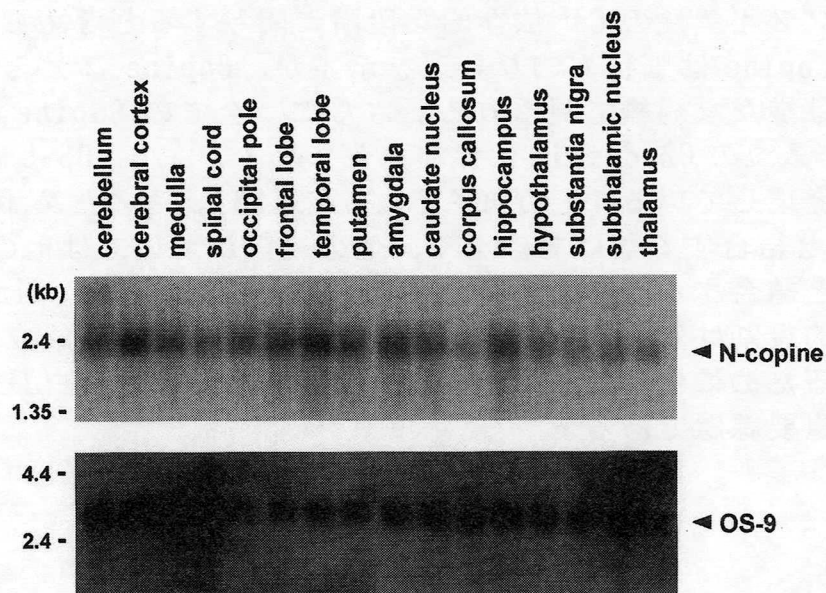


Fig. 15. Expression of N-copine and OS-9 mRNA in human brain. Multi-tissue Northern blot membrane of various regions of human brain was hybridized with ^{32}P -labeled N-copine (upper panel) or OS-9 (lower panel). Positions of N-copine (2.2-kb) and OS-9 (2.8-kb) mRNAs are indicated. Positions of RNA markers are shown on the left.

第五節 考察および小括

(1) 考察

酵母 two-hybrid スクリーニングにより、N-copine とヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9 が結合することを明かとした。そして N-copine の 2 番目の C2-domain と OS-9 のカルボキシ末端領域が Ca^{2+} 依存的に結合することを明かにした。さらに N-copine と OS-9 の mRNA はヒトの脳において同じ領域で発現していることを確認した。N-copine は Ca^{2+} 依存的なリン脂質との結合や膜への移行を示す。そのため Ca^{2+} 存在下において、N-copine は細胞膜上で OS-9 と結合すると考えられる。N-copine の発現がカイン酸刺激や CA1-LTP を誘導する高頻度刺激によって海馬で増強されることから、N-copine のシナプス可塑性への関与が示唆される。N-copine と OS-9 の結合はシナプス可塑性の Ca^{2+} 依存的な段階に関与すると考えられる。

N-copine は脳特異的な発現を示すが、Copine ファミリーの他のメンバーの発現は様々な組織で見られる。さらに、全ての Copine ファミリー蛋白質において、2 つの C2-domain は保存されている。一方、OS-9 mRNA はヒトの様々な組織で発現していることが知られている(36)。そのため OS-9 は脳において N-copine と結合するだけではなく、他の組織においては他の Copine ファミリー蛋白質と結合するものと考えられる。OS-9 の機能や Copine ファミリー蛋白質の生理的役割は殆ど知られていない。シナプス可塑性成立の分子メカニズムを理解するためには、OS-9 と他の Copine ファミリー蛋白質の生理機能の解析が今後の重要課題である。

(2) 小括

- 1) Yeast two hybrid スクリーニングにより、ヒト骨肉腫において高頻度に増幅されている遺伝子として同定された OS-9 のカルボキシ末端領域が N-copine と結合することを見出した。
- 2) 293E 細胞において N-copine と OS-9 との結合を確認した。
- 3) N-copine の 2 番目の C2-domain を介して Ca^{2+} 依存的に OS-9 と結合することを明かにした。
- 4) N-copine は OS-9 の mRNA がヒトの脳において同じ領域で発現していることを明かにした。

総 括

シナプス可塑性は学習や記憶の細胞レベルでの現象と考えられている(1, 14, 31)。その長期性の獲得には新たな遺伝子発現が必要あり(3-5)、シナプス可塑性成立に伴い発現誘導されるいくつかの遺伝子が同定されている(6-12)。しかしながら、このような発現遺伝子産物のシナプス可塑性における具体的な役割については殆ど報告されておらず、シナプス可塑性の成立、維持機構に関してはまだ十分な解析がなされていない。そこでシナプス可塑性の分子機構を理解するためには、シナプス可塑性の成立に伴って誘導される遺伝子群を同定し、機能を明かにする必要があると考えられる。

シナプス可塑性に関連する遺伝子群を同定するため、新規の cDNA 2 次元展開法 RLCS を利用して、カイニン酸投与したマウス海馬で発現増強する遺伝子を探索した。得られた新規遺伝子の中の 1 つ、N-copine は、脳特異的な発現を示し、2 つの C2-domain を持つ蛋白質をコードしていた。N-copine は Ca^{2+} 依存的リン脂質結合蛋白質ヒト Copine I と高い相同性を示すことから、Copine ファミリーの脳特異的なメンバーであると考えられる。N-copine mRNA の発現はカイニン酸投与により海馬で NMDA 受容体依存的に発現増強された。さらに、N-copine mRNA の発現が CA1-LTP を誘導する高頻度刺激により増強されることを明かとした。これらの結果より、N-copine はシナプス可塑性に関与すると考えられる。脳の発生段階における N-copine の発現は、神経回路形成のほぼ終了した embryonic day 19 で始めて非常に弱い発現が見られ、生後急激にその発現は増強する。この結果は、N-copine が中枢神経系において神経回路形成よりはむしろ脳の高次機能において役割を果たしていることを示唆する。さらにマウス脳において、N-copine の発現が海馬と嗅球の神経細胞に局限していることを明かにした。海馬は記憶や学習のために重要な領域であり、様々な型のシナプス可塑性が観察されている(1, 14, 31)。また、マウスの副嗅球はフェロモンの認識記憶において重要な役割を果たしている(32, 33)。このように N-copine の脳における発現分布はシナプス可塑性との関連がきわめて高い領域に局限されており、N-copine がシナプス可塑性や記憶形成に重要な役割を果たすという考えを支持する。

C2-domain は最初に Protein kinase C- γ (PKC- γ)(20)の Ca^{2+} 結合ドメインとして同定された。その機能として、 Ca^{2+} 結合、 Ca^{2+} 依存的あるいは非依存的リン脂質結合、イノシトールリン脂質結合、蛋白質結合などが報告されている(37-41)。N-copine の 2 番目の C2-domain にも C2-domain の Ca^{2+} 結合に必須であると考えられている 5 つのアスパラギン酸(21)が保存されていた。そして実際に、N-copine の 2 番目の C2-domain が Ca^{2+} 依存的にフォスファチジルセリンと結合することを明かとした。N-copine は主に細胞質画分に局在し、 Ca^{2+} 依存的に膜画分に移行する。この特性は 2 番目の C2-domain によるものと考えら

れる。さらに、酵母 two-hybrid system を用いた N-copine 結合蛋白質の探索から、N-copine の 2 番目の C2-domain がヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9(34)と Ca^{2+} 依存的に結合することを明かとした。これらの結果より、N-copine は Ca^{2+} センサーとして機能し、細胞内 Ca^{2+} の上昇に伴い細胞質から膜に移行し、細胞膜上で OS-9 と結合すると考えられる。OS-9 の機能や生理的役割は殆ど知られていないが、N-copine と OS-9 の結合はシナプス可塑性の Ca^{2+} 依存的な段階に参与することが推測される。

Synaptotagmin、Rabphilin-3A、Doc2 等のいくつかの蛋白質は 2 つの C2-domain を持ち、“Double C2-domain protein family”と呼ばれる蛋白質ファミリーを形成している(22)。“Double C2-domain proteins”は神経細胞において主にプレシナプス部位に局在し、神経伝達物質の放出において役割を果たしている(42, 43)。N-copine は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、その構造的特徴から“Double C2-domain protein family”のメンバーに属さないと考えられる。そして N-copine と Synaptotagmin I が神経細胞において異なる局在を示すことを明かにした。海馬 CA1-CA3 領域の錐体細胞において、N-copine は主に細胞体と樹状突起に強く発現していたが、Synaptotagmin I は軸索や神経終末部位で発現していた。以上の結果より、N-copine は、Synaptotagmin I や他の“Double C2-domain protein”がプレシナプス部位で役割を果たしているのに対し、主に細胞体と樹状突起に局在してポストシナプス部位で役割を果たしていると考えられる。さらに、CA3 領域の錐体細胞からのびるシャーファー側枝にテタヌス刺激を与えることにより、ポストシナプス側の CA1 領域の錐体細胞で N-copine の発現が誘導されることを示している。これらの結果は、N-copine がポストシナプス部位で役割を果たしているという考えを支持する。

シナプス可塑性の分子機構を明かとするため、神経活動依存的に発現制御される新規遺伝子、N-copine を同定し、その機能解析を進めた。N-copine が神経細胞のポストシナプス部位に発現し、 Ca^{2+} センサーとして機能することを明かとした。N-copine は他の Copine ファミリー蛋白質とともに 2 つの C2-domain を持つ新しい蛋白質ファミリーを形成する。Copine ファミリー蛋白質の生理的役割や N-copine と OS-9 との Ca^{2+} 依存的結合の生理的意義はまだ分かっていないが、本研究の成果はシナプス可塑性成立の分子メカニズムを理解する上で重要な情報を与えるものであると考えられる。

結 論

1. 神経活動依存的に発現制御される新規遺伝子として N-copine を同定した。
2. N-copine は脳特異的な発現を示し、マウス脳において、海馬や嗅球の神経細胞に局限した発現を示すことを明かとした。
3. N-copine は、神経細胞において主に細胞体と樹状突起に局在することを明かとした。
4. N-copine は Ca^{2+} 依存的に細胞質画分から膜画分に移行することを明かとした。
5. N-copine の 2 番目の C2-domain が Ca^{2+} 依存的フォスファチジルセリン結合を示すことを明かとした。
6. N-copine の 2 番目の C2-domain がヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9 と Ca^{2+} 依存的に結合することを明かとした。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の発表の機会をいただき、多くの有益なご助言をいただいた大阪大学副学長 同大学薬学部 真弓忠範 教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の機会を与えていただき、長らくご指導御鞭撻を賜りました日沼頼夫 塩野義製薬相談役、畑中正一 塩野義製薬株式会社代表取締役副社長 医薬開発研究本部長、義江 修 塩野義製薬医科学研究所部長研究員（現、近畿大学医学部教授）、渡辺幸彦 同研究所部長研究員、坂田恒昭 同研究所課長研究員、桑島吾郎 同研究員、鈴木治和 同研究員に慎んで感謝の意を表します。さらに、貴重なご助言、ご協力を賜りました塩野義製薬医科学研究所 矢追 毅、二木 啓、河合 純、原 亜矢子、松田恵子、小嶋悟史、阪口 岳 研究員、近畿大学医学部講師（現、株式会社カン研究所） 今井俊夫 先生に深く感謝いたします。また、討論に参加していただいた塩野義製薬医科学研究所の方々に心から感謝いたします。

引用文献

1. Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
2. Nicoll, R. A. and Malenka, R. C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
3. Krug, M., Lossner, B. and Ott, T. (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
4. Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G. and Matthies, H. (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.
5. Matthies, H., Frey, U., Reymann, K., Krug, M., Jork, R. and Schroeder, H. (1990) Different mechanisms and multiple stages of LTP. *Adv Exp Med Biol* 268:359-368.
6. Sheng, M. and Greenberg, M. E. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
7. Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D. and Citri, Y. (1993) Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature* 363:718-722.
8. Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R. and Kuhl, D. (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457.
9. Andreasson, K. and Worley, P. F. (1995) Induction of beta-A activin expression by synaptic activity and during neocortical development. *Neuroscience* 69:781-796.
10. Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. and Worley, P. F. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
11. Tocco, G., Bi, X., Vician, L., Lim, I. K., Herschman, H. and Baudry, M. (1996) Two synaptotagmin genes, Syt1 and Syt4, are differentially regulated in adult brain and during postnatal development following kainic acid- induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 40:229-239.
12. Tsui, C. C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Barnes, C. and Worley, P. F. (1996) Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci* 16:2463-2478.

13. Fazeli, M. S., Corbet, J., Dunn, M. J., Dolphin, A. C. and Bliss, T. V. (1993) Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 13:1346-1353.
14. Ben-Ari, Y. and Represa, A. (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13:312-318.
15. Suzuki, H., Yaoi, T., Kawai, J., Hara, A., Kuwajima, G. and Wantanabe, S. (1996) Restriction landmark cDNA scanning (RLCS): a novel cDNA display system using two-dimensional gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 24:289-294.
16. Creutz, C. E., Tomsig, J. L., Snyder, S. L., Gautier, M. C., Skouri, F., Beisson, J. and Cohen, J. (1998) The Copines, a Novel Class of C2-domain-containing, Calciumdependent, Phospholipid-binding Proteins Conserved from Paramecium to Humans. *J Biol Chem* 273:1393-1402.
17. Nakayama, M., Miyake, T., Gahara, Y., Ohara, O. and Kitamura, T. (1995) A novel RING-H2 motif protein downregulated by axotomy: its characteristic localization at the postsynaptic density of axosomatic synapse. *J Neurosci* 15:5238-5248.
18. Yasui, M., Kawasaki, K., Matsushita, A. and Satoh, M. (1993) Benzodiazepine inverse agonists augment long-term potentiation in CA1 and CA3 of guinea pig hippocampal slices. *Neuropharmacology* 32:127-131.
19. Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947-950.
20. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
21. Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1996) Bipartite Ca^{2+} -binding motif in C2-domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273:248-251.
22. Südhof, T. C. and Rizo, J. (1996) Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 17:379-388.
23. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
24. Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. and Takai, Y. (1993) Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2061-2068.
25. Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H. and Takai, Y. (1995) Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 439-448.

26. Sakaguchi, G., Orita, S., Maeda, M., Igarashi, H. and Takai, Y. (1995) Molecular cloning of an isoform of Doc2 having two C2-like domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1053-1061.
27. Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., Jahn, R., De Camilli, P. and Südhof, T. C. (1994) Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca^{2+} /phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C. *Neuron* 13, 885-898.
28. Ullrich, B., Li, C., Zhang, J. Z., McMahon, H., Anderson, R. G., Geppert, M. and Südhof, T. C. (1994) Functional properties of multiple synaptotagmins in brain. *Neuron* 13, 1281-1291.
29. Johnston, P. A., Archer, B. T. d., Robinson, K., Mignery, G. A., Jahn, R. and Südhof, T. C. (1991) rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron* 7, 101-109.
30. Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S. and Mikoshiba, K. (1992) Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron* 9, 1133-1142.
31. Bear, M. F. and Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399.
32. Brennan, P., Kaba, H. and Keverne, E. B. (1990) Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* 250, 1223-1226.
33. Kaba, H. and Nakanishi, S. (1995) Synaptic mechanisms of olfactory recognition memory. *Rev. Neurosci.* 6, 125-141.
34. Elkahloun, A. G., Krizman, D. B., Wang, Z., Hofmann, T. A., Roe, B., and Meltzer, P. S. (1997) Transcript mapping in a 46-kb sequenced region at the core of 12q13.3 amplification in human cancers. *GENOMICS* 42, 295-301.
35. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18, 5322.
36. Su, Y. A., Hutter, C. M., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1996) Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol. Carcinogen.* 15, 270-5.
37. Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. and Mikoshiba, K. (1994) Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. *J. Biol. Chem.* 269, 29206-29211.
38. Sheng, Z. H., Rettig, J., Takahashi, M. and Catterall, W. A. (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 13, 1303-1313.
39. Chapman, E. R., Hanson, P. I., An, S. and Jahn, R. (1995) Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* 270, 23667-23671.

40. Sugita, S., Hata, Y. and Südhof, T. C. (1996) Distinct Ca^{2+} -dependent properties of the first and second C2-domains of synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 271, 1262-1265.
41. Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E. and Sollner, T. H. (1997) Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin- treated synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 997-1001.
42. Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. and Südhof, T. C. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-727.
43. Orita, S., Sasaki, T., Komuro, R., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H. and Takai, Y. (1996) Doc2 enhances Ca^{2+} -dependent exocytosis from PC12 cells. *J Biol Chem* 271:7257-7260.

