

Title	PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca <sup>2+</sup> -dependent exocytosis of neurotransmitter
Author(s)	馬場, 威
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47466">https://hdl.handle.net/11094/47466</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	ばば 威 <small>たけし</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20911 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca <sup>2+</sup> -dependent exocytosis of neurotransmitter (PKA によるトモシンのリン酸化はカルシウム依存的な神経伝達物質の放出に関する)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美  (副査) 教授 祖父江憲治 教授 狩野 方伸

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

神経系では神経細胞同士がお互いに神経シナプスと呼ばれる構造で繋がることによって神経回路網を形成している。前シナプス側の神経細胞が興奮し、活動電位が前シナプスに到達すると、神経伝達物質を蓄えているシナプス小胞が前シナプス膜に融合して神経伝達物質を放出する。放出された神経伝達物質は後シナプス膜上の受容体に結合し、情報を後シナプス側の神経細胞に伝えることにより、神経伝達が起こる。シナプス小胞と前シナプス膜との融合は、SNARE 系で制御されている。小胞上の vesicle-SNARE である VAMP2 と前シナプス膜上の target-SNAREs であるシンタキシン、SNAP-25 が結合して SNARE 複合体を形成し、シナプス小胞が前シナプス膜にドッキングする。その後、カルシウムイオン濃度が高まるとシナプス小胞と前シナプス膜との融合が起こる。SNARE 系を制御するタンパク質の一つにトモシンがある。トモシンはシンタキシンに結合して SNAP-25 と共にトモシン複合体を形成する。それにより VAMP2 と target-SNAREs との結合を抑制し、SNARE 複合体の形成を阻害する。そのためシナプス小胞と前シナプス膜との膜融合が抑制される。しかし、トモシンの膜融合の抑制がどのようなメカニズムで解除されるのかについては不明であった。そこでトモシンの膜融合の抑制を解除する分子機構を調べた。

#### [ 方法ならびに成績 ]

##### トモシンの cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) によるリン酸化

cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) は神経細胞においていくつかのエキソサイトシスに関わるタンパク質をリン酸化することが明らかになっている。また、PKA が神経伝達物質の放出を促進することが知られている。そこで、トモシンも PKA の基質の一つであり、PKA によるリン酸化でトモシンの膜融合の抑制が解除されるのではないかと考えた。まず、トモシンの組み換えタンパク質と PKA、RI ラベルされた ATP を用いて *in vitro* でトモシンがリン酸化されるか調べた。その結果、トモシンは PKA によりリン酸化された。PKA によるトモシンのリン酸化部位を検討したところ 724 番目のセリンがリン酸化された。ニューロblastoma 細胞株の NG108 細胞を PKA 特異的に働く細胞透過型 cAMP である Sp-cAMP で刺激したときにもトモシンはリン酸化された。また、NG108 細胞に PKA

特異的阻害剤を作用させておくとリン酸化が検出できなかった。これらの結果から、トモシンは *in vitro* および *in vivo* において PKA によりリン酸化されることが明らかになった。

#### トモシンのリン酸化による SNARE 複合体形成への影響

トモシンは VAMP-2 と競合してシンタキシンに結合することで SNARE 複合体の形成を抑えることが明らかになっている。そこで PKA 依存性のトモシンのリン酸化によりトモシンとシンタキシンの結合アフィニティが変化するか調べた。PKA によってリン酸化されたトモシンあるいは非リン酸化状態のトモシンとグルタチオンビーズに結合させた GST-シンタキシンを用いて GST プルダウンアッセイを行った。その結果、リン酸化されたトモシンは、非リン酸化状態のトモシンに比べ、シンタキシンとの結合アフィニティが低かった。次に、PKA によるトモシンのリン酸化が SNARE 複合体形成に与える影響を調べた。NG108 細胞にトモシンを過剰発現させ、抗シンタキシン抗体による免疫沈降を行い、Sp-cAMP による刺激の有無で SNARE 複合体およびトモシン複合体の形成に変化が見られるか調べた。Sp-cAMP 刺激をしたときは刺激していないときに比べて SNARE 複合体が増加し、トモシン複合体が減少した。さらに、NG108 細胞にトモシンの 724 番目のセリンをアラニンに置換したリン酸化されないトモシン(トモシン S724A) とアスパラギン酸に置換したリン酸化状態様のトモシン(トモシン S724D) を発現させ、抗シンタキシン抗体による免疫沈降実験を行った。その結果、トモシン S724D を発現させた場合はトモシン S724A を発現させたときに比べて SNARE 複合体が増加し、トモシン複合体が減少した。これらの結果から PKA によりトモシンの 724 番目のセリンがリン酸化されるとトモシンとシンタキシンの結合アフィニティが低下し、トモシンによる SNARE 複合体形成の抑制が解除されることが示唆された。

#### PKA によるトモシンのリン酸化の神経伝達物質放出への関与

上頸神経節の初代培養細胞 (SCG ニューロン) において、神経ペプチド PACAP が PAC1 受容体に結合することにより、PKA が活性化されて神経伝達物質の放出が促進されることが知られている。このシグナル伝達にトモシンの PKA によるリン酸化が関与しているか調べた。PKA によるトモシンのリン酸化と神経伝達物質放出との関係を SCG ニューロンを用いた電気生理学的手法で解析した。トモシンを前シナプス側の SCG ニューロンに過剰発現させて後シナプス側の膜電位を計測したところ、神経伝達が抑制された。この時に cAMP を前シナプス側の SCG ニューロンにマイクロインジェクションして PKA を活性化させると、神経伝達の抑制が解除された。また、前シナプス側の SCG ニューロンを PACAP で刺激して PKA を活性化させた場合にも神経伝達の抑制が解除された。トモシン S724A を前シナプス側の SCG ニューロンに過剰発現させた場合には cAMP や PACAP による神経伝達の抑制の解除がほとんど見られなかった。これらの結果から PACAP-PAC1 受容体の下流で PKA が活性化されるとトモシンによる神経伝達の抑制が解除されることが示唆された。

#### [ 総括 ]

神経ペプチド PACAP が PAC1 受容体に結合することにより PKA が活性化され、神経伝達が亢進する。この亢進に PKA によるトモシンのリン酸化が関与することを見出した。PKA によりトモシンの 724 番目のセリンがリン酸化されるとトモシンとシンタキシンのアフィニティが低下し、SNARE 複合体の形成の抑制が解除され、前シナプスからの神経伝達物質放出が促進されことを明らかにした。PACAP は視床下部および交感神経系の節前ニューロンから分泌される。自律神経系では、順向性調節因子である PACAP が節後ニューロンに働くことにより、トモシンの神経伝達物質放出の抑制を解除して交感神経系を正に制御していると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

活動電位が神経終末に到達すると、神経伝達物質を蓄えているシナプス小胞が前シナプス膜に融合して神経伝達物質を放出する。シナプス小胞と前シナプス膜との融合は、小胞上の VAMP2 と前シナプス膜上のシンタキシン、SNAP-25 が SNARE 複合体を形成した後に、カルシウムイオン濃度が高まることでおこる。SNARE 系を制御するタンパク質の一つにトモシンがある。トモシンはシンタキシンおよび SNAP-25 と複合体を形成する。それにより

VAMP2 とシンタキシン、SNAP-25 との結合を阻害し、シナプス小胞と前シナプス膜との膜融合が抑制される。これまでトモシンによる膜融合の抑制がどのようなメカニズムで解除されるのかについては不明であった。本申請者は、トモシンが cAMP 依存性キナーゼ (PKA) によってリン酸化されることを見出した。トモシンがリン酸化されるとシンタキシンとの結合アフィニティが低下し、トモシンによる膜融合の抑制が解除されることを明らかにした。また、上頸神経節の初代培養細胞を用いた電気生理学的解析により、トモシンの PKA によるリン酸化が神経伝達物質の放出に関与していることを明らかにした。

本研究は、神経伝達の分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験自体の意義だけでなく、今後の研究への発展も期待できる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値する。