

- 14) Ono, S., Hane, M., Kitajima, K., & Sato, C. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 3710–3722.
- 15) Goetz, R. & Mohammadi, M. (2013) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 166–180.
- 16) Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., & Ornitz, D. M. (1991) *Cell*, **64**, 841–848.
- 17) Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003) *Science*, **302**, 1044–1046.
- 18) Taupin, P., Ray, J., Fischer, W.H., Suhr, S.T., Hakansson, K., Grubb, A., & Gage, F.H. (2000) *Neuron*, **28**, 385–397.
- 19) Yagi, H., Saito, T., Yanagisawa, M., Yu, R.K., & Kato, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 24356–24364.
- 20) Yagi, H., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., Nakatani, Y., Ariga, T., Kato, K., & Yu, R.K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 37293–37301.
- 21) Yanagisawa, M., Taga, T., Nakamura, K., Ariga, T., & Yu, R. K. (2005) *J. Neurochem.*, **95**, 1311–1320.
- 22) Yagi, H., Yanagisawa, M., Kato, K., & Yu, R.K. (2010) *Glycobiology*, **20**, 976–981.
- 23) Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., & Imai, T. (2005) *Exp. Cell Res.*, **306**, 349–356.
- 24) Sakaguchi, M., Shingo, T., Shimazaki, T., Okano, H.J., Shiwa, M., Ishibashi, S., Oguro, H., Ninomiya, M., Kadoya, T., Horie, H., Shibuya, A., Mizusawa, H., Poirier, F., Nakauchi, H., Sawamoto, K., & Okano, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7112–7117.
- 25) Aguirre, A., Rubio, M.E., & Gallo, V. (2010) *Nature*, **467**, 323–327.

矢木 宏和¹, 加藤 晃一^{1,2,3,4}

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科,

²自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター,

³株式会社グライエンス,

⁴お茶の水女子大学糖鎖科学教育研究センター)

Functional roles of glycoconjugates in the maintenance of stemness of neural stem cells

Hirokazu Yagi¹ and Koichi Kato^{1,2,3,4} (¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan, ²Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, ³GLYENCE Co., Ltd., ⁴The Glycoscience Institute, Ochanomizu University)

脳における SNAP-25 ファミリータンパク質の発現と機能

1. はじめに

脳内ではおびただしい数の神経細胞がシナプスを介した情報伝達を行い、機能的な神経回路を形成している。シナプスでの情報伝達は、シナプス前部から開口放出と呼ばれる機構でシナプス小胞に蓄えられる神経伝達物質が放出され、シナプス後部の受容体に結合することで営まれている¹⁾(図1)。SNAP-25は、シナプスでの開口放出に必須なSNAREタンパク質の一種であり、脳には3種類のアイソフォームが発現しているが、それらの役割の違いについては明らかにはなっていなかった。最近我々はこれら3種類のアイソフォームを識別する抗体の作製に成功し、脳での発現の違いを明らかにすることができた。

2. SNAP-25とは

1) SNAP-25の分子構造

神経伝達物質やホルモンの開口放出に必須なSNAREタンパク質は細胞膜に存在するt-SNAREとシナプス小胞膜に存在するv-SNAREに分けられ、神経のシナプスではVAMP-2がv-SNAREとして、Syntaxin-1とSNAP-25がt-SNAREとして機能している。SNAREタンパク質は分子内にSNAREモチーフを持ち、v-SNAREとt-SNAREがSNARE複合体を作ることによってシナプス小胞膜と細胞膜との融合が引き起こされる。Syntaxin-1とVAMP-2はカルボキシ末端に膜貫通領域を持つ内在性膜タンパク質で、細胞質側にそれぞれ一つのSNAREモチーフを持つ。それに対してSNAP-25は分子中央付近に位置する複数のシステイン残基のパルミトイル化を介して膜につなぎ止められており、その両側に一つずつのSNAREモチーフを持っている。SNARE複合体形成には4本のSNAREヘリックスが必要であり、神経のシナプスではVAMP-2とSyntaxin-1のSNAREモチーフ各一つずつと、SNAP-25が持つ二つのSNAREモチーフが使われる。

2) SNAP-25の多様な機能とアイソフォーム

SNAP-25は開口放出による神経伝達物質やホルモンの放出に関与するが、それ以外にも神経突起の伸長や、開口放出による受容体やイオンチャンネルなどの細胞膜への組

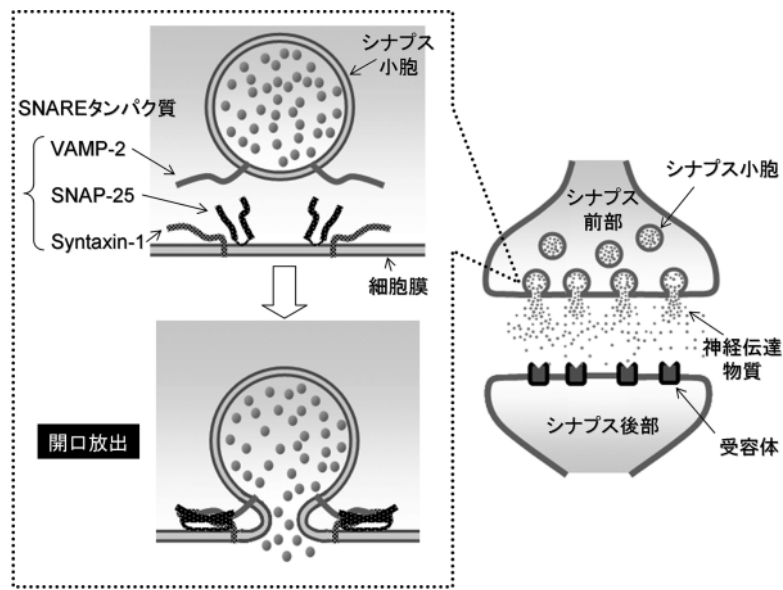


図1 SNAREタンパク質であるSNAP-25は、VAMP-2やSyntaxin-1とともにシナプスでの開口放出に必須な役割を果たしている。

み込み、CaチャンネルやKチャンネルの機能制御などの多様な機能に関わる可能性が明らかとなっている。

SNAP-25は脳と内分泌細胞に発現しているが、エクソン5の違いによるスプライシングアイソフォーム(aとb)が存在する²⁾。パルミトイル化されたシステインクラスターと二つのSNAREモチーフを持つタンパク質としては脳を含めた全身の臓器で発現するSNAP-23が知られている³⁾。したがって脳ではSNAP-25a, SNAP-25b, SNAP-23の3種類すべてが発現していることになるが、これまで三者を識別する特異抗体が得られていなかったため、それらがどのようにすみ分けて局在し、どのような機能分担をしているかは明らかではなかった。

3. SNAP-25のアイソフォーム

1) 各アイソフォームを認識する抗体

SNAP-25aと-25bはエクソン5のスプライシングアイソフォームであり、わずかに9アミノ酸の違いしかない。このため図2の点線枠で示す配列の合成ペプチドを各ウサギに免疫して特異抗体を作製した。すべての抗体は抗原ペプチドを架橋したアフィニティーカラムで精製し、さらに他アイソフォームの抗原ペプチドで吸収した。大腸菌(図2B)あるいはHEK-293細胞(図2C)に各リコンビナントタンパク質を発現させイムノブロットした結果、いずれも予想される位置にシングルバンドが認められ、アイソフォーム

間での交差性は認められなかった(図2B)。SNAP-25b抗体の抗原ペプチド(14mer)は、結果としてSNAP-23の配列と1アミノ酸しか変わらないものとなってしまったが、幸いにも得られた抗体はSNAP-23とは交差性を示さなかった(図2B)。

2) 脳内の発現量

これまでは特異的に識別する抗体がなかったため、SNAP-25各アイソフォームが脳内でどのくらいの量比で発現しているかは明らかではなかった。今回我々は、リコンビナントタンパク質を基準として成熟マウス脳内の海馬領域での各分子の発現量を求めたところ、SNAP-25bの発現レベル(13.61 ± 3.79 fmol/ μ g 総タンパク質)は、SNAP-25a(0.80 ± 0.20 fmol/ μ g)やSNAP-23(1.24 ± 0.53 fmol/ μ g)の10倍以上であることが明らかになった³⁾。

3) 脳内の発現分布

脳のコモジネートのイムノブロット解析を行うと、SNAP-25bは脳のすべての領域でほぼ均一に発現しているのに対し、SNAP-25aは吻側で高く尾側(小脳、脳幹、脊髄など)ほど低く発現し、一方SNAP-23は吻側ほど高い発現がみられるなど不均一な分布を示していた。免疫組織化学の結果はすでに報告されているBoschertらの*in situ*ハイブリダイゼーションの結果⁴⁾とおおむね一致しており、

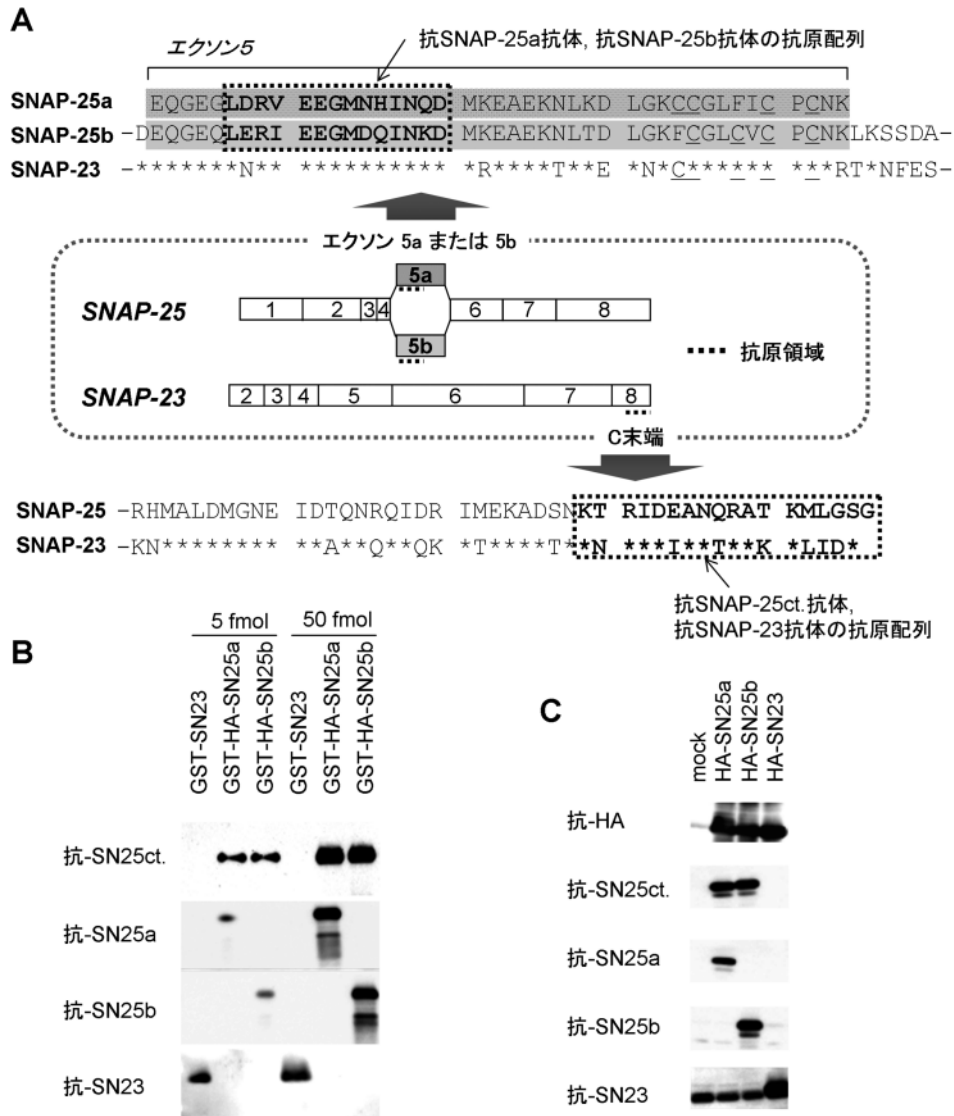


図2 SNAP-25 アイソフォームの部分的アミノ酸配列と作製した抗体の抗原ペプチド配列。

(A) SNAP-25a, -b でのアミノ酸配列が異なる部分とカルボキシ末端領域の配列に対応する抗原ペプチド (点線枠) をウサギに免疫し各特異抗体を作製した。SNAP-23 配列中の*は SNAP-25b と同じアミノ酸；エクソン 5 配列内の下線のある C はパルミトイル化を受けるシステイン残基を示す。(B) 大腸菌に各リコンビナントタンパク質を発現させ、各抗体でイムノプロットを行った。(C) HEK-293 細胞に各リコンビナントタンパク質を発現させ、各抗体でイムノプロットを行った。交差性はみられないが抗 SNAP-23 抗体では内在性の SNAP-23 も認識されている。

これら三者のタンパク質の脳内分布も大きく異なっていることが明らかとなった。特に海馬での三者のシグナルパターンの違いは顕著であり、分子層の 3 層構造 (各層に異なる神経回路からの入力がある) では、SNAP-25b は中間分子層 (mml) のみに、SNAP-25a は外側分子層 (oml) のみに、SNAP-23 は mml と oml に観察された (図 3A~C)。

さらに、苔状線維終末が CA3 の錐体細胞と巨大シナプスを形成する、海馬 CA3 透明層を詳しく比較すると (図 3D~F)、SNAP-25b は細かな粒子状の密集したシグナル、SNAP-25a は錐体細胞の樹状突起に沿った弱いシグナル、SNAP-23 は大きな顆粒状のシグナルとして観察された。

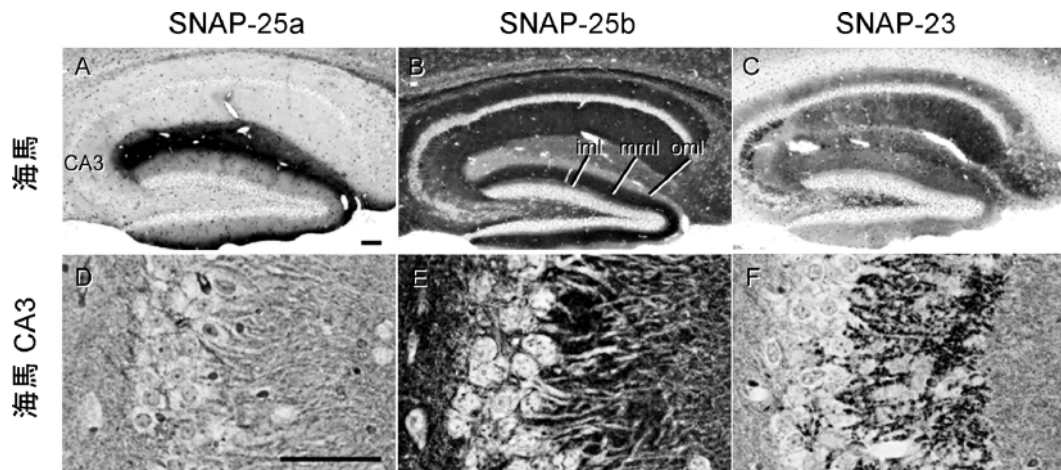


図3 3種類のSNAP-25アイソフォームの局在は脳の各領域で大きく異なる。

抗SNAP-25a抗体 (A, D), 抗SNAP-25b抗体 (B, E), 抗SNAP-23抗体 (C, F) による11週齢のマウス脳の免疫組織化学. A~C: 海馬, D~F: 海馬CA3を示す. iml: 内側分子層, mml: 中間分子層, oml: 外側分子層, スケールバー=100 μ m.

4) 脳内の部位差: シナプス機能維持と神経突起伸長

シナプス形成の進行とともにSNAP-25bのmRNAの発現は大きく増加するが⁴⁾, SNAP-25bタンパク質も同様であり, 成体の脳ではシナプスが密集する領域に多く分布していることが明らかとなった. 副腎髄質細胞や培養神経細胞への遺伝子発現実験によると, 三者のうちで刺激に同調した素早い放出を起こせるのはSNAP-25bのみであることや^{5,6)}, SNAP-25b欠損マウスは発達異常や自発発作, シナプスの短期可塑性・学習に障害を持つこと⁷⁾が示されていることから, シナプスからの神経伝達物質放出に主要な役割を果たしているのはSNAP-25bであると考えられる.

SNAP-25が軸索流により神経線維中を運ばれる主要なタンパク質であることが報告されており⁸⁾, またSNAP-25が神経突起の伸長に関わることも示唆されている. 今回SNAP-25aとSNAP-25bは, 神経線維束にも異なるパターンで発現していることが見いだされ, SNAP-25aとSNAP-25bが異なる神経線維の伸長に関わる可能性が考えられた³⁾.

5) 細胞内局在

SNAP-25bとは異なり, SNAP-25aとSNAP-23では刺激に同調した素早い放出を起こせないという報告から^{5,6)}, SNAP-25aとSNAP-23は似た機能を持つのではないとも考えられる. しかし分子進化論的解析では, SNAP-25aはSNAP-25bとSNAP-23が分かれた後にSNAP-25bから派生したことが示されており機能的にはよく似たSNAP-23が

存在するにもかかわらずSNAP-25aが作られたことは, SNAP-25aがSNAP-23とは異なる役割を担う可能性も考えられる. 今回, 細胞分画法で脳内局在を比較すると, SNAP-25bやSNAP-23は大部分が膜画分に含まれているのに対し, SNAP-25aは可溶性画分にも多く含まれることが明らかになった. さらに, 可溶性画分に含まれるSNAP-25aの分子量は膜画分のものに比べて少し小さく, パルミトイル化されていない可能性が考えられた. また, 細胞膜上には脂質組成の異なるラフトと呼ばれる領域が存在するが, 細胞分画で得られたシナプス膜画分を, 界面活性剤(Triton X-100)で処理した後に Σ 糖密度勾配遠心することでラフトを分画し比較したところ, 成体マウスの脳のシナプス細胞膜上でSNAP-25bやSNAP-23はラフトに集積する割合が高く, SNAP-25aは低いことが明らかになった³⁾. シナプス後部に存在する足場タンパク質であるPSD-95は, SNAP-25と同様にパルミトイル化を受けて細胞膜に係留されるが, 神経活動依存的にパルミトイル化が変化することが報告されている⁹⁾. SNAP-25のアイソフォームを区別しない抗体を用いた結果では, 神経活動依存的なSNAP-25の局在の変化は見いだされていないが, SNAP-25a特異抗体を用いて解析することで, パルミトイル化/脱パルミトイル化を介したSNAP-25aの新たな制御機構を明らかにできる可能性も考えられる. またラフトは安定した構造ではなく, 刺激に応じて構造を変化させることも考えられている. SNAP-25はリン酸化をはじめさまざまな修飾を受けることから, 神経活動依存的に相互作用する分

子が増加し、局在が変化している可能性も考えられる。今後はさらにアイソフォームによる翻訳後修飾の違いについても精査する必要がある。

4. おわりに

イムノプロットでは、変性タンパク質が対象となるため抗原部位に抗体がアクセスしやすい状態にあるが、免疫組織化学では立体構造をとり、時には複合体を形成したタンパク質が対象となるため、抗原部位が隠されて抗体に認識されなくなる可能性もある。イムノプロットによりマウス脳の細胞分画を解析すると SNAP-25b はシナプス膜画分に多く確認されたが、免疫電子顕微鏡法により苔状繊維神経の軸索を観察すると SNAP-25b のほとんどのシグナルは軸索細胞内に認められ細胞膜では検出されなかった。この原因はまだ明らかではないが、結合していないフリーの SNAP-25 しか認識しないモノクローナル抗体も存在することから¹⁰⁾、本研究のアイソフォーム特異抗体も細胞膜上の SNARE 複合体に含まれる SNAP-25 には結合しない可能性も考えられる。今回わずかな違いでもエピトープを選ぶことで特異抗体を作製できることを示せたが、今後はこれらの特徴をうまく利用し各神経細胞でのアイソフォームの存在様式の違いを把握できる可能性がある。

SNAP-25 変異マウスでは多動や不安などの行動異常が認められ、症例対照研究においても SNAP-25 の発現低下や変異と注意欠陥多動性障害や統合失調症との関連性が報告されている¹¹⁾。また SNAP-25 は抑制性シナプスや一部の興奮性のシナプスでは発現しないという報告もあり¹²⁾、SNAP-23 がその機能を担う可能性も考えられる。SNAP-25 の各アイソフォームの分子機構を明らかにしていくことは、これらの病態の解明にも貢献する可能性があると考えられる。

- 1) Sudhof, T.C. (2004) *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 509–547.
- 2) Bark, I.C. & Wilson, M.C. (1994) *Gene*, 139, 291–292.
- 3) Yamamori, S., Itakura, M., Sugaya, D., Katsumata, O., Sakagami, H., & Takahashi, M. (2011) *J. Comp. Neurol.*, 519, 916–932.
- 4) Boschert, U., O’Shaughnessy, C., Dickinson, R., Tessari, M., Bendotti, C., Catsicas, S., & Pich, E.M. (1996) *J. Comp. Neurol.*, 367, 177–193.
- 5) Sorensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C., & Neher, E. (2003) *Cell*, 114, 75–86.
- 6) Delgado-Martinez, I., Nehring, R.B., & Sorensen, J.B. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 9380–9391.
- 7) Johansson, J.U., Ericsson, J., Janson, J., Beraki, S., Stanic, D.,

- Mandic, S.A., Wikström, M.A., Hökfelt, T., Ogren, S.O., Rozzell, B., Berggren, P.O., & Bark, C. (2008) *PLoS Genet.*, 4, e1000278.
- 8) Hess, D.T., Slater, T.M., Wilson, M.C., & Skene, J.H. (1992) *J. Neurosci.*, 12, 4634–4641.
- 9) Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R.R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C.A., Hayden, M.R., & El-Husseini, A. (2004) *Neuron*, 44, 977–986.
- 10) Xiao, J., Xia, Z., Pradhan, A., Zhou, Q., & Liu, Y. (2004) *J. Neurosci. Res.*, 75, 143–151.
- 11) Faraone, S.V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., & Sklar, P. (2005) *Biol. Psychiatry*, 57, 1313–1323.
- 12) Matteoli, M., Pozzi, D., Grumelli, C., Condliffe, S.B., Frassoni, C., Harkany, T., & Verderio, C. (2009) *Neuroscience*, 158, 223–230.

山森 早織, 板倉 誠
(北里大学医学部生化学)

Differential expression and function of SNAP-25 family proteins in the mouse brain

Saori Yamamori and Makoto Itakura (Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara, Kanagawa 228–8555, Japan)

Unstructured 領域を介したプロテアソームのタンパク質分解

1. はじめに

ユビキチン・プロテアソーム系 (Ubiquitin-Proteasome System: UPS) は、不要なタンパク質を分解するだけでなく、シグナル伝達や細胞周期などに関わる制御タンパク質を分解して、その濃度を調整することによりさまざまな細胞機能を制御している。UPS において最終的にタンパク質分解を担っているのはプロテアソームであるが、その基質となるタンパク質の選別は、基質タンパク質のポリユビキチン化を行うユビキチン修飾系によって行われていると長らく信じられてきた。しかしながら、ポリユビキチン化だけではプロテアソームによる基質選別をすべて説明できない。

近年、プロテアソームによって基質タンパク質が分解されるためには、基質タンパク質の内部にフラフラと構造をとらない領域 (Unstructured 領域) が存在する必要があることが明らかになった。この Unstructured 領域はプロテア