

平成16年度博士論文

**キナーゼによる分泌小胞
開口放出制御機構の研究**

東京大学大学院・新領域創成科学研究科
生命応答システム分野

森 靖典

学籍番号：17526

《略号》

AD; activation domain

ATP; adenosine 5'-triphosphate

BDNF; brain-derived neurotrophic factor

CBB; Coomassie brilliant blue

DBD; DNA-binding domain

DTT; dithiothreitol

D-MEM; Dulbecco's modified eagle medium

EGTA; *O,O'*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

FBS; fetal bovine serum

GABA; γ -aminobutyric acid

GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFP; green fluorescence protein

GST; glutathione-S-transferase

His; histidine

HS; horse serum

NGF; nerve growth factor

NPY; neuro peptide Y

PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis

PBS; phosphate-buffered saline

PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride

SDS; sodium dodecyl sulfate

Tris; 2-amino-2-hydroxymethyl-propane

YFP; yellow fluorescence protein

目次

第一章 NGFによるJNKを介した分泌小胞開口放出の制御

1.緒言	4~20
2.材料と実験方法	21~31
3.結果	32~67
4.考察	68~72
5.結言	73

第二章 A2Aアデノシン受容体によるPKAとPI3-kinaseを介した開口放出の制御

1.緒言	74~79
2.材料と実験方法	80~83
3.結果	84~99
4.考察	100~103
5.結言	104

引用文献	105~119
------	---------

謝辞	120
----	-----

第一章 NGFによるJNKを介した分泌小胞開口放出の制御

1. 緒言

[カルシウム依存性エキソサイトーシスについて]

細胞からのエキソサイトーシスは細胞外マトリックス、プロテオグリカン、糖タンパク質などを放出する構成性分泌経路と、ホルモンや神経伝達物質などを放出する調整性分泌経路に分けられる。このうち調整性分泌経路は一般的にカルシウム依存的に起こることからカルシウム依存性エキソサイトーシスとも呼ばれている。カルシウム依存性エキソサイトーシスは神経細胞からの神経伝達物質の放出に関与することが有名であるが、それ以外にもすい臓の β 細胞からのインシュリンの放出、マスト細胞からのIgE刺激によるヒスタミンの放出、メラノサイトからのメラニンの放出など様々な過程に関与している。

[神経伝達物質の放出の制御について]

神経細胞は脳においてシナプスを介して機能的に連結し神経回路を形成している。成熟した脳で記憶や学習などが成立するには神経回路の性質が可塑的に変化することが不可欠であり、シナプスでの情報効率が短期的あるいは長期的に変化することが、その重要な基盤であると考えられる。シナプス前部から放出される神経伝達物質が神経細胞の出力機構であることから、カルシウム依存的なエキソサイトーシスによる神経伝達物質の放出機構が短期的、長期的にどのように制御されるかを明らかにすることは神経回路の可塑性、ひいては脳の高次機能を理解するうえで極めて重要である。これまでに神経伝達物質の放出（神経伝達物質を含むシナプス小胞の開口放出）は細胞外の様々な刺激によっ

て制御されていることが明らかになっている。例えばBDNF処理をしたシナプス小胞からはグルタミン酸の放出が促進されることや、海馬のCA3ニューロンではBDNF刺激によりシナプス前部からの神経伝達物質の放出が促進されることにより長期増強 (long-term potentiation: LTP) がおこることが報告されている(Lynch, 2004; Poo, 2001)。また神経細胞から神経伝達物質と共に放出されたATPはアデノシンに変換され自身のアデノシン受容体と結合して神経伝達物質の放出を制御することが報告されている(Sebastiao and Ribeiro, 2000; Wu and Saggau, 1997)。しかしその詳細な開口放出を制御する分子機構は未だあきらかになっていない。

[神経伝達物質が放出される過程]

神経伝達物質はグルタミン酸、GABAなどの非ペプチド性のものと、ペプチド性のものに分類される。前者は小型のシナプス小胞 (synaptic vesicle) に貯蔵され、後者は大型有芯小胞 (large dense-core vesicle: LDCV) に貯蔵される。これらの神経伝達物質は神経終末よりカルシウム依存的な開口放出 (エキソサイトーシス) によってシナプス間隙へ放出される。この開口放出過程はシナプス小胞の移動→形質膜との接着 (Docking) →融合可能な状態への準備 (Priming) →カルシウムシグナル到達による小胞膜とシナプス前膜との融合 (Fusion) ・開口→エンドサイトーシスに至る一連の反応過程から構成され (Fig. 1)、各過程にさまざまなタンパク質が関わっていることが報告されている(Li and Chin, 2003)。開口放出によって細胞膜に移行した小胞のタンパク質はエンドサイトーシスによって選択的に回収され神経終末内で小胞が再生される。しかし、このような完全な形での開口放出 (Full Fusion) 以外に小胞膜と細胞膜が部分的に融合した後完全な融合に至らない場合 (kiss and run) もある

ことが報告されている(Valtorta et al, 2001)。神経細胞ではkiss and runによる放出がむしろFull Fusionより多い割合で起こっていることが報告されている(Aravanis et al., 2003; Gandhi and Stevens, 2003; Rizzoli and Betz, 2003)。さらに長期抑制 (long-term depression: LTD)が起こっている小脳プルキンエ細胞ではプレシナプスからの神経伝達物質の放出が減少しているが、この状態のシナプスではkiss and runの頻度が変化していることが報告されていることから、kiss and run機構が神経伝達物質の放出量の制御に関与している可能性が示唆されている(Zakharenko et al., 2002)。

[開口放出に関わる細胞内分子]

1. SNAREタンパク質

開口放出過程において、シナプス前部に存在するタンパク質の中でSNAREと総称される膜タンパク質が神経伝達物質放出に中心的な役割を果たしていると考えられている。SNAREは小胞膜に存在するv-SNAREと、細胞膜に存在するt-SNAREとに区分される (Fig. 2)。神経シナプスおよび内分泌細胞では synaptobrevin (VAMP-2)がv-SNARE、syntaxinおよびSNAP-25がt-SNAREに相当する。SNAREタンパク質の小胞輸送への必要性については、細胞小胞輸送に異常が生じた酵母変異体の原因遺伝子がSNAREタンパク質であったことから明らかにされた。またsynaptobrevin (VAMP-2) およびSNAP-25をマウスにおいてノックアウトすると開口放出が抑制される(Fergestad et al., 2001; Schoch et al., 2001)。さらにv-SNAREタンパク質と結合する領域を欠損した Syntaxinを発現するショウジョウバエでは開口放出が抑制されることから複合体形成が開口放出に重要である可能性が示唆されている(Washbourne et al., 2002)。また、ボツリヌス菌や破傷風菌もしくはクモが産出する神経毒素タン

パク質はsynaptobrevin、syntaxinおよびSNAP-25を特異的に切断して開口放出を抑制することが報告されている(O'Connor et al., 1997)。ただし、これらの神経毒素によってSNARE複合体を切断しても細胞膜に接着しているシナプス小胞の数に変化がなかった。よってSNAREタンパク質は小胞膜と細胞膜が接着した後のPrimingもしくはFusionの段階に関与している可能性が示唆される。

このようにSNARE複合体が開口放出に重要であることは示されているが、PrimingもしくはFusionの段階への関与については意見が分かれている。精製したシナプス小胞とt-SNAREを組み込んだリポソームを混ぜ合わせると膜融合が起こることからSNAREタンパク質のみでFusionの過程に働きうる可能性が示唆されている(Weber et al., 2000)。しかしこの実験系によるFusionは細胞内での小胞と細胞膜の融合の速度に比べてきわめて遅い。その一方でクロマフィン細胞を用いた解析からSNARE複合体のみでは膜融合できず、SNARE複合体は細胞膜と小胞膜の準備段階すなわちPrimingの過程を促進し即時開口プール

(Readily releasable pool: RRP)を増加に関与していることが報告されている(Lonart and Sudhof, 2000)。最近SNAREタンパク質のみでは膜融合はできないが、これにカルシウムとカルシウム結合タンパク質であるSynaptotagminを加えることにより膜融合が起こることが報告されている(Tucker et al., 2004)。

2. SNAREタンパク質に結合するタンパク質

最近SNAREタンパク質と結合してSNARE複合体の活性を制御するタンパク質がいくつか報告されている。Syntaxinの結合タンパク質として発見されたMunc-18は、ノックアウトマウスにおいて神経伝達物質の放出が抑制されていることが報告されている(Verhage et al., 2000)。またショウジョウバエにお

いてMunc-18の変異体では細胞膜に接着しているシナプス小胞の数に変化がなかったことから、Munc-18の機能としてDocking以降の過程すなわちPrimingもしくはFusionの過程で機能している可能性が示唆される(Weimer et al., 2003)。さらにMunc-18はkiss and run による放出過程にも関与する可能性も報告されている(Fisher et al., 2001)。以上のことから Munc-18はSyntaxinと直接結合してSyntaxinの構造を変化させることによりSNARE複合体の活性を変化させ、開口放出に関与しているのではないかと推測されている。

脳特異的に発現する遺伝子としてクローニングされたComplexinはSNAREタンパクと結合することが報告されている。Complexinには2つのアイソフォームがありComplexin1, Complexin2のダブルノックアウトマウスは開口放出が抑制されている(Reim et al., 2001)。このとき細胞膜に接着しているシナプス小胞の数に変化がなかったことから、ComplexinはDocking以降の過程に働いていることが示唆される(Reim et al., 2001)。Complexinのダブルノックアウトマウスで起こっている開口放出の抑制は高濃度カルシウムで開口放出の実験を行う正常に回復することが示されている(Tokumaru et al., 2001)。さらにComplexinはt-SNAREとv-SNARE結合を促進することが明らかになっている(Tokumaru et al., 2001)。よってComplexinはSNARE複合体の形成を促進させることによりPrimingもしくはFusionの過程に関与している可能性が示唆されている。

Munc-13はsyntaxin1と結合することによりSNARE複合体の形成を促進し、またノックアウトマウスを用いた解析からPrimingへの関与が報告されている(Augustin et al., 1999)。Munc-13はジアセチルグリセロールとそのアナログのホルボールエステルに結合するC1領域を持っている。この領域に変異を入れてホルボールエステルとの結合できなくなったMunc13-1をノックインした

マウスでは開口放出に異常があったことが報告されている(Rhee et al., 2002)。よってMunc-13の活性はジアセチルグリセロールによって制御されている可能性が示唆されている。

3. Rab3

シナプス小胞の分泌には低分子量GタンパクであるRabファミリーのうちRab3が関与していることが知られている。線虫のRab3変異体は細胞膜に接着している小胞の数が減少していることや、Rab3ノックアウトマウスにおいてシナプス小胞のアクティブゾーンへの移行が減少することから、Rab3は小胞の細胞膜への移行もしくは小胞膜と細胞膜の接着に関与していることが示唆されている(Nonet et al., 1997)。なおRab3はDocking以降の過程にも関与する可能性が電気生理学による実験から示唆されている(Geppert et al., 1997)。またRab3はLTPにも関与することが報告されている(Castillo et al., 1997)。Rab3のエフェクター分子としてRabphilin, RIMなどがありGTP型依存的に結合することが報告されている。Rabphilinは開口放出への関与が報告されているが、Rabphilinのノックアウトマウスの表現系が異なることからRabphilinの機能はRab3と必ずしも一致しないと考えられている(Schluter et al., 1999)。RIMは線虫の変異株においてシナプス小胞のDockingに異常はないが開口放出には異常がみられる(Wang et al., 1997)。なおRIMはMunc-13と結合することからPrimingに関与する可能性が考えられる(Schoch et al., 2002)。またRIMのノックアウトマウスはLTPに異常が見られることが報告されている(Castillo et al., 2002)。

[開口放出の時にカルシウムセンサーとして働く細胞内分子]

神経細胞では脱分極による細胞内カルシウム濃度の上昇が引き金になって開口放出が起こることから、開口放出を制御するなんらかのカルシウムセンサーの存在が示唆されている。カルシウムセンサーとなるカルシウム結合タンパク質にはEFハンドモチーフタンパク質、アネキシン類、C2ドメインを持つタンパク質などが報告されている（なおC2ドメインとはPKCの制御領域に存在するカルシウム結合領域である）。このなかで開口放出に関与するものとして、C2ドメインをもつSynaptotagmin, DOC2, Munc-13, rabphilin3A, Rim, B/Kなどが報告されている。そのうちSynaptotagminの開口放出におけるカルシウムセンサーとしての働きが特によく研究されている。

Synaptotagminは膜一回貫通型の膜タンパク質で、ほ乳類には少なくとも13のアイソフォームがある(Marquez et al., 2000; Sudhof, 2002)。これまでSynaptotagminに関する研究はほとんどSynaptotagmin I (Syt I)が用いられてきた。SynaptotagminはN末端側に膜貫通領域が存在し、また細胞膜に存在するC末端側の部分に二つのC2ドメイン (C2A, C2B)を持っている(Fig. 3)。C2A領域にはカルシウムイオンが3つ、C2B領域にはカルシウムイオンが2つ結合することが示唆されている(Marquez et al., 2000)。C2A領域にはカルシウム依存的にリン脂質やシンタキシンが結合し、C2B領域にはIP₄, N-type channel, AP-2もしくはカルシウム依存的な二量体形成に関わっていることが知られている(Sudhof, 2002; Yoshihara et al., 2003)。これらの分子とSyt Iの結合に必要なカルシウム濃度は5-20 μ Mであり、この濃度はシナプスから神経伝達物質が放出される際の細胞内カルシウム濃度と一致する。さらにSyt IのC2A領域とリン脂質と結合できない変異型Syt I (R233Q)をノックインしたマウスではカルシウム依存的な神経伝達物質の放出が抑制されたことから、C2A領域とリン脂質の結合が開口放出に重要である可能性が示唆された

(Fernandez-Chacon et al., 2001)。ただし、C2A領域がカルシウムと結合できない変異型のSyt I (E233S)をノックインしたマウスでも開口放出が起こることから、C2A領域にカルシウムが結合することはSyt Iの機能に必要ではないと考えられる(Fernandez-Chacon et al., 2002)。同様に Syt Iが欠損したショウジョウバエにC2A領域がカルシウムと結合できない変異型のSyt Iを発現させても機能が回復する(Mackler et al., 2002; Robinson et al., 2002)。一方 Syt Iが欠損したショウジョウバエにC2B領域がカルシウムと結合できない変異型のSyt Iを発現させた場合では機能は回復されなかった(Mackler et al., 2002; Robinson et al., 2002)。よってSyt Iがカルシウムセンサーとして機能する際にはC2B領域にカルシウムが結合することが重要である可能性が示唆されている。C2A領域はカルシウムと結合するがSyt Iの機能に関与しないと予想される。最近FRETを用いた解析からカルシウムと結合したC2B領域はC2A領域と細胞内結合すること明らかになっている(Garcia et al., 2000)。よってC2B領域はカルシウムと結合することによりC2A領域に働きかけC2A領域の機能であるリン脂質などの結合を促進しているのかもしれないと予想されている。また Synaptotagminは細胞外領域で糖鎖修飾されること、N末端に存在するシステインによりジスルフィド結合により多量体を形成すること、さらに膜貫通領域とC2A領域の間の領域（スペーサー領域）はアセチル基およびリン酸基が修飾されることが報告されている(Marquez et al., 2000; Nakhost et al., 2003)。最近WNK1によってリン酸化されたSynaptotagmin IIはカルシウム依存的なリン脂質との結合能が抑制されることが報告されていることから、リン酸化はSynaptotagminの機能制御に重要である可能性が考えられる(Lee et al., 2004)。

[Synaptotagmin IVについて]

Synaptotagmin IV (Syt IV) はこれまでに13種類報告されている

Synaptotagminのアイソフォームの一つであり、PC12細胞にカルシウム流入を伴う高濃度のKCl 刺激（脱分極）をした際にmRNAの発現量が増加する分子としてクローニングされた(Vician et al., 1995)。Syt I は恒常的に脳の全組織に発現しているのに対して、Syt IV は誕生時では脳全体に発現しているが、成長にしたがって海馬と小脳に発現が限定される(Berton et al., 2000)。また、Syt IVのノックアウトマウスは運動および学習機能に障害が見られることが報告されている(Ferguson et al., 2000)。

Syt IVの機能については開口放出を促進するという報告と抑制するという相反する報告が出されており意見が対立している。Syt IVが開口放出を負に制御している根拠として、Syt IVを過剰発現させたショウジョウバエでは神経電位の発生が減少すること、およびSyt Iに比べてカルシウム依存的なSyntaxin、N-type チャネル、カルモデュリン、およびリン脂質との結合が見られないという結果(Littleton et al., 1999)やPC12細胞にSyt IVを過剰発現させると開口放出の時間が抑制され(Wang et al., 2001; Wang et al., 2003)、また脳下垂体由来のAt-20細胞にSyt IVを過剰発現させるとアセチルコリンの放出が抑制されること(Eaton et al., 2000)、PC12細胞にSyt IVを過剰発現させるとヒト成長ホルモンの放出が抑制されるという結果があげられる(Machado et al., 2004)。Syt IVのC2A領域にあるグルタミン酸のうちのひとつがセリンに置き換わっているためSyt IVのC2A領域はカルシウムと結合しないことが示されている(von Poser et al., 1997)。この結果Syt IVはSyt Iとカルシウム依存的にhetero-dimerを形成した際には、Syt Iの機能を阻害するのではないかという仮説が提唱されている。

その一方でSyt IVが開口放出を正に制御しているという報告もある。前述のSyt IVを過剰発現させたショウジョウバエと同一系統のショウジョウバエを用いても神経電位の発生は減少せず、さらにSyt Iを欠損したショウジョウバエにSyt IVを過剰発現させると神経電位の発生を回復させるという結果が得られており、即ちこの場合Syt IVはSyt Iと同様の機能を持ちうることを示唆された(Robinson et al., 2002)。またすい臓の β 細胞にSyt IVを過剰発現させるとkiss and runが抑制されFull Fusionで放出する小胞が増加し、かつ小胞が開口している時間がより増大した(Tsuboi and Rutter, 2003)。またPC12細胞にSyt IVの部分ペプチドを導入するとノルアドレナリンの放出が抑制されることや(Thomas et al., 1999)、グリア細胞からのグルタミン酸の放出がSyt IVをノックダウンさせることにより抑制されることが報告されている(Zhang et al., 2004)。

Syt IVは通常はゴルジ体に局在しているが、PC12細胞においてNGFで刺激をすると未成熟小胞に存在したSyt IVが成熟小胞に移行することが観察されている(Fukuda et al., 2003)。またSyt IVはショウジョウバエではSyt Iが存在する軸索側ではなく、むしろ樹上突起側に存在していることが示されている(Adolfson et al., 2004)。

[開口放出の制御に関わるキナーゼ分子]

開口放出は主に脱分極によるカルシウム流入がトリガーとなって起こる。しかしこの開口放出の効率は様々な細胞外シグナルにより制御されていることが知られている。このような開口放出を制御する分子機構は未だ多くの部分は解明されていないが、これまでにキナーゼ（タンパク質リン酸化酵素）は細胞内シグナル伝達の様々な生理現象を制御していることから、開口放出過程の制御

も同様に関与しているのではないかと推測されている(Turner et al., 1999)。

1) PKC

PKCを活性化するホルボールエステルやジアシルグリセロールを作用させると神経伝達物質放出が促進されることが報告されているが(Shoji-Kasai et al., 2002)、その作用機構はさまざまであると考えられている。PC12細胞を用いた実験ではPKCの活性化によってL-type カルシウムチャネルが活性化され、その結果細胞内カルシウム濃度が増加し神経伝達物質の放出が増加することが示唆されている(Taylor et al., 2000)。しかしその一方でカルシウム流入以降の過程をPKCが制御している可能性も報告されている。PKCが制御する基質の候補として、in vitroでSynaptotagmin IおよびSNAP-25をリン酸化することが報告されており(Nakhost et al., 2003; Shoji-Kasai et al., 2002)、またMunc-18のリン酸化を介して膜融合の過程を制御している可能性が示唆されている(Barclay et al., 2003)。

2)PKA

海馬CA3領域ではcAMP依存的にグルタミン酸放出が促進される(Trudeau et al., 1996)。その際Snapsin, RIM, SNAP-25がリン酸化されることから、これらの分子がPKAの基質の候補である可能性が報告されている(Chheda et al., 2001; Lonart et al., 2003)。またクロマフィン細胞ではPKA阻害剤KT5720とPKAの活性を阻害するPKI (protein kinase inhibitor)の部分ペプチドを共に加えることにより開口放出が抑制されることからPKA経路が開口放出に必要なことが示されている(Nagy et al., 2004)。またこの時PKAはSNAP-25のThr138のリン酸化を介して放出可能プールを増加させている可能性が示唆されている。

3)Cdk5

Cdk5阻害剤olomousineを作用させるとノルエプネフィリンの放出が抑制されることやCdk5の活性化因子であるp25を発現させるとノルエプネフィリンの放出能は増強されることから、Cdk5が神経伝達物質の放出に関与することが示唆されている(Fletcher et al., 1999)。Cdk5の基質候補としてはMunc-18報告されており、Munc-18のT574のリン酸化によりシンタキシンとの複合体形成の解離が促進されることが示されている(Fletcher et al., 1999)。さらに、活性型cdk5の過剰発現によりkiss and run機構が促進され、かつMunc-18のT574変異体の過剰発現によりkiss and run機構が抑制されたことからcdk5はMunc-18によるkiss and runを介することにより開口放出に関与する可能性が考えられる(Barclay et al., 2004)。

4)tyrosine kinase

シナプス小胞にはsrcの存在が報告されておりtyrosine kinaseの関与が考えられてきた。PC12細胞にtyrosine kinase阻害剤AG839を作用させると開口放出が促進され、またsrcの過剰発現は開口放出を抑制することからチロシンキナーゼは抑制的に機能していることが示唆される。しかし、この系ではin vitroの基質として知られているsynaptophysinのリン酸化が確認されなかったことから、別の基質の存在が示唆されている(Ohnishi et al., 2001)。

6)MAPK

ラットの大脳から得られたシナプス小胞を用いた実験からBDNFによる放出の促進にMAPキナーゼが関与していることが示唆されている(Jovanovic et al.,

2000)。またPC12細胞においてNGFによって促進される開口放出はMAPキナーゼ阻害剤U0126で抑制される(Amino et al., 2002)。この時のMAPキナーゼの基質としてはシナプシンが候補として考えられており、in vitroの系ではMAPKによるリン酸化によってシナプシンのアクチン重合促進能が低下することが報告されている(Jovanovic et al., 1996)。

7) その他

PC12細胞においてNGFやBDNFによって促進される開口放出はPI3-kinase阻害剤LY294002で抑制されることからPI3-kinaseの関与が示唆されている(Amino et al., 2002)。またRhoの下流で働くROCKがSNARE複合体形成に関与するtomosynをリン酸化して機能を制御することが報告されている(Sakisaka et al., 2004)。

[JNKについて]

JNK/SAPK (c-Jun NH₂-terminal Kinase/Stress-activated protein kinase) はMAP キナーゼファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、DNA 損傷、熱ショック、タンパク質合成阻害、浸透圧変化、紫外線、その他の物理化学的ストレス、IL-1 (Interleukin-1)やTNF- α (tumor necrosis factor- α)といった炎症性サイトカインの刺激、虚血などの生理的ストレス、生存因子除去などの様々なストレス条件下で活性化される(Davis, 2000)。JNKは現在までに3種類の遺伝子が同定されており、そのうちJNK1, JNK2は組織全体で発現しているのに対して、JNK3は脳、心臓、精巣に発現する(Davis, 2000)。JNKの直接の活性化因子にはMKK4とMKK7が知られており、これら両キナーゼを活性化するキナーゼは多数報告されている(Davis, 2000)。このことはJNKが多

様な刺激で活性化することを反映していると考えられている。

JNK経路は様々な細胞に対するストレスで共通に活性化することから、JNK経路の機能のひとつにストレス応答が考えられる。実際、JNK1, JNK2のダブルノックアウトマウス由来の細胞ではUV刺激をしてもシトクロムcの放出が起これずアポトーシスが起きなくなることから、紫外線によるアポトーシス誘導というストレス応答にはJNKが必要であることが示唆される(Tournier et al., 2000)。また、JNK3ノックアウトマウスでは発生上目立った異常は見られないが、グルタミン酸受容体のアゴニストであるカイニン酸による海馬細胞の興奮毒性死が起こりにくくなっており、このことはJNK3がグルタミン酸レセプターの下流で細胞死を誘導するのに関与していることを示唆している(Yang et al., 1997)。

ただしJNK経路はストレス応答以外の生理現象にも関与していることが示されている。例えばJNK1, JNK2のダブルノックアウトマウスでは脳の発生段階において前脳でアポトーシスしている細胞の割合が上昇し、また後脳ではアポトーシスをしている細胞の割合が減少し背側神経の閉鎖異常が起こることが報告されていることから、JNKが発生過程にも関与していることが示されている(Kuan et al., 1999)。またラット上皮細胞由来のNBT-II細胞においてJNK経路を抑制すると細胞移動能が低下することからJNKは運動性にも関与することが示された(Huang et al., 2003)。さらに線虫に存在するJNKホモログの一つであるJNK-1は神経系に局在しており、その機能欠損型変異体において運動機能に障害が見られかつシナプス小胞の局在に異常があることが報告されていることから神経機能の制御においてもJNKが重要な役割を果たす可能性がある(Byrd et al., 2001; Kawasaki et al., 1999)。

[本研究の内容について]

今回、我々はPC12細胞を用いてNGFによる開口放出過程の促進がMAPキナーゼスーパーファミリーに属するJNK阻害剤SP600125、またはJNKの活性を阻害するJBD（JIP-1のJNK binding domain）の発現により抑制されることを見い出した。また活性型JNKの発現により開口放出過程が促進されることも判明した。

さらに我々はin vitroおよびin vivoでJNKがSyt IVと結合し、またJNKがSyt IVの135番目のセリン残基をリン酸化することを見い出した。またSyt IVのリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型のSyt IVは、野生型のSyt IVと異なりカルシウム依存的なヒト成長ホルモンの放出を促進しなかった。さらにNGF依存的な成熟分泌小胞への局在がJBDによって阻害されることも示された。以上の結果より、NGFのシグナルがJNKを活性化することによりSyt IVを標的としカルシウム依存的な開口放出を促進していることが示された。

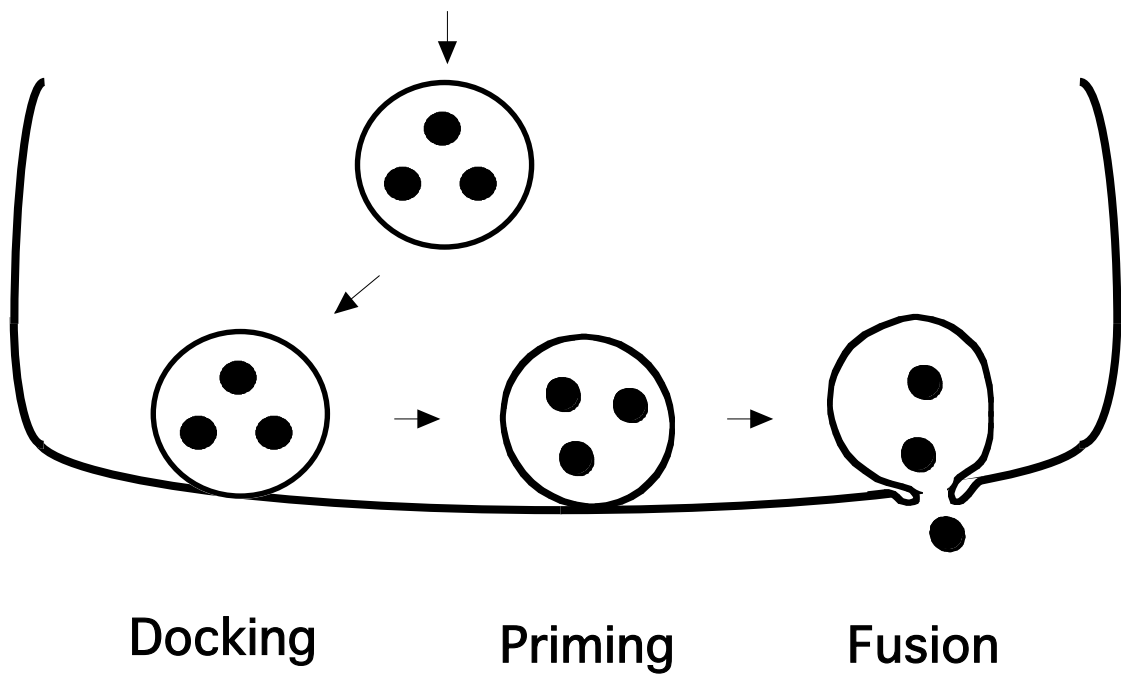


Fig.1 分泌小胞の経路

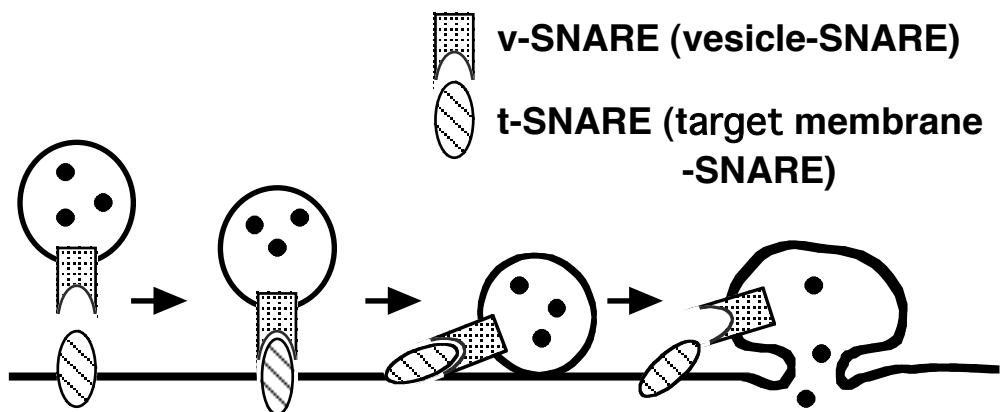


Fig.2 SNARE複合体について

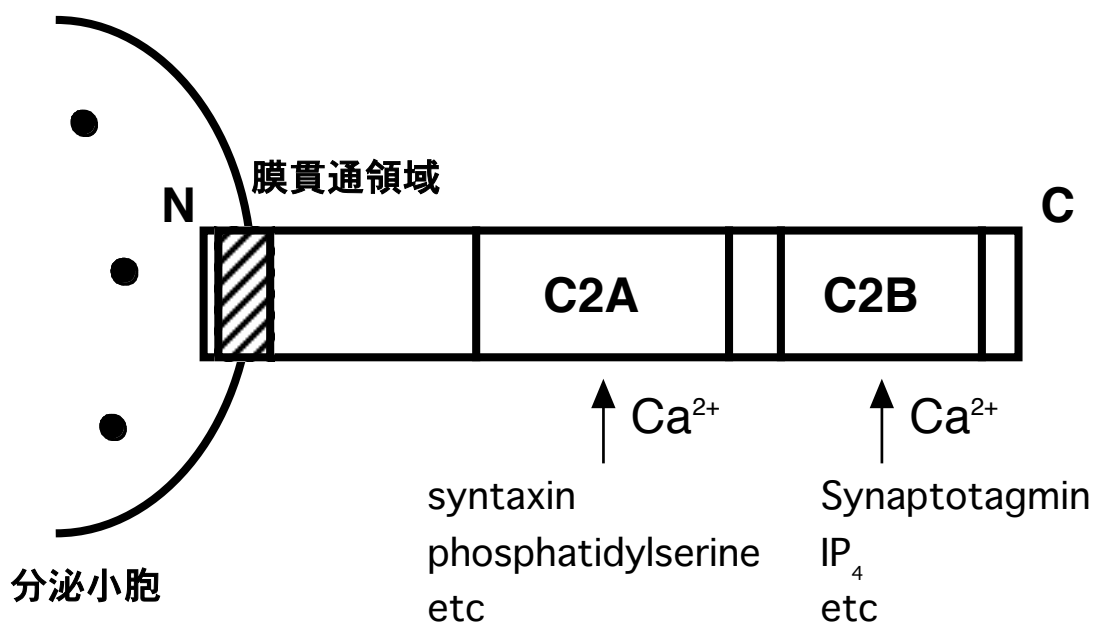


Fig.3 Synaptotagminについて

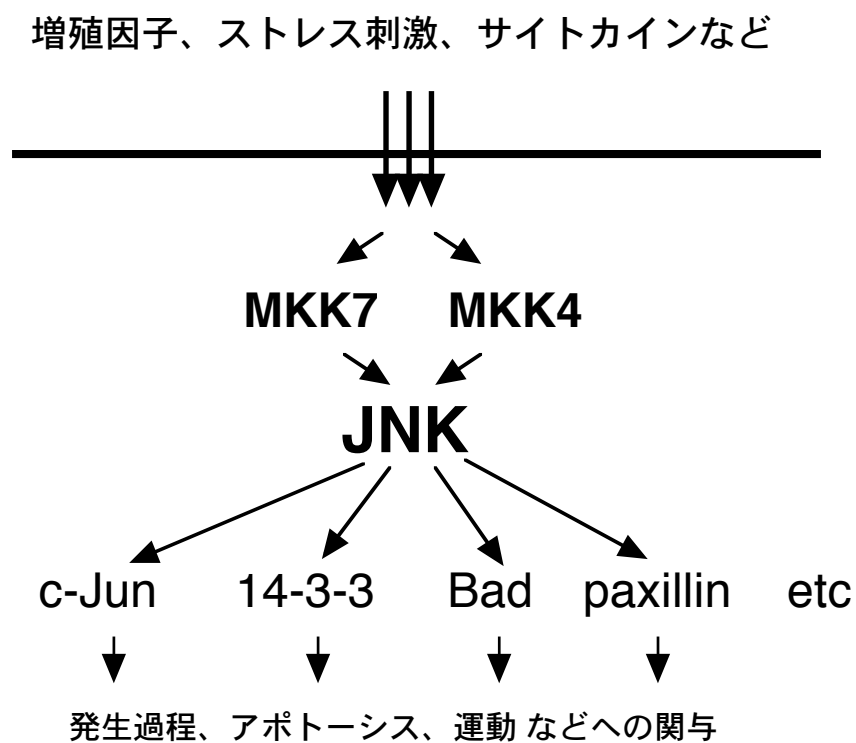


Fig.4 JNK経路について

方法

材料

SP600125はBioMolより、nifedipine, G418, PuromycinはNacalaiより、イオノマイシンはSigmaより、NGFはPromegaより購入した。

抗体

抗リン酸化 JNK 抗体、抗 c-Jun 抗体、抗リン酸化 c-Jun 抗体はCell Signalingより、抗 JNK 抗体 (C17), 抗 Myc 抗体 (9E10)はSanta Cruzより、抗 Flag 抗体(M2)はSigma、抗ヒト成長ホルモン抗体はDAKOより、抗 Rab3 抗体、抗syntaxin6 抗体はBD Bioscienceより、抗 GAPDH 抗体はChemiconより、抗Synaptotagmin I 抗体 (SFY-148)はStressgenより、Alexa 488 抗 マウス IgG抗体はMolecular Probesより入手した。抗 Synaptotagmin IV 抗体は福田 博士 より頂いた。抗リン酸化Synaptotagmin IV Ser-135抗体は、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)を結合させたSynaptotagmin IVのリン酸化ペプチド (EGEKESVpSPESLK) をウサギに免疫して作成した。

プラスミド

ニューロペプチドYと改変型Green fluorescence protein (GFP)である Venusの融合タンパク質をほ乳類細胞で発現するプラスミド (pEF-BOS NPY-Venus)は 宮脇 博士 より頂いた。レトロウイルスによるJBD発現プラスミド (pMX-IRES-puro-JBD)はR.Davis 博士 より頂いたプラスミドをpMX-IRES-PuroのEco RI-Xho I部位に挿入して作成した。レトロウイルスによる 活性型 MKK7および不活性型MKK7発現プラスミド (pMX-IRES-puro-active

MKK7, pMX-IRES-puro-Inactive MKK7)は森口 博士 より頂いた活性型 MKK7 (MKK7 γ -1 S271D,T275E, S277D)および不活性型MKK7 (MKK7 γ -1 S271A,T275L, S277A)をpMX-IRES-Puroの *Bam* HI部位に挿入して作成した。pCDA3-Flag-JNK1 α 1、pCDA3-Flag-JNK2 α 2、pCDA3-Flag-JNK3 α 2はR.Davis 博士 より頂いた。またpCDA3-Flag-JNK1 α 1をQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いてJNK1のD162をThrに、D326、E329、E329をAspに置換した変異型JNK1を発現するプラスミド (pCDA3-Flag-JNK1 DT (D162T) , pCDA3-Flag-JNK1 CDm (D326N, E329N, E329N), pCDA3-Flag-JNK1 all (D162T, D326N, E329N, E329N))を作成した。Two-hybrid法に用いるプラスミドについては、まずJNK1, JNK2, JNK3をQuikChange Site-Directed Mutagenesis KitによりJNK1 α 1 K55をMet、JNK2 α 2 K55をAla、JNK3 α 2 K93をMetに置換したものをpBride (Clontech) の *Bam* HI部位に挿入し、またMAPKもしくはp38をpGBD9 (Clontech)の *Bam* HI部位に挿入して作成した。6xHisとMKK7-JNK1の組み替えタンパク質を大腸菌で発現するプラスミド(pET28a-MKK7-JNK(WT), pET28a-MKK7-JNK (KN))については、善岡 博士より頂いたMKK7-JNK1のプラスミドを用いてQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)によりLys434, 435をMetに置換したキナーゼ変異体を作成した後にpET28a (Novagene)の *Bam* HI部位に挿入して作成した。またMKK7-JNK1の野生型およびキナーゼ変異体をpCDNA3の *Bam* HI部位に挿入してほ乳類細胞での発現プラスミドを作成した(pCDNA3-MKK7-JNK(WT), pCDNA3-MKK7-JNK (KN))。c-JunとGSTの組み替えタンパク質を大腸菌で発現するpGEX-3X-c-Jun (1-79) は日比先生より頂いた。

ヒトSynaptotagmin IVはかずさDNA研究所より頂いたKIAA1342を用い

た。6xHisとSynaptotagmin IVとの組み替えタンパク質を発現するプラスミド (pET28a-Syt IV)、およびGSTとの組み替えタンパク質を発現するプラスミド (pGEX-6P1-Syt IV)についてはpET28a (Novagene)のXhoI部位および、pGEX-6P1 (Amersham Biosciences)のXho I部位に挿入して作成した。Synaptotagmin IV (Syt IV)の各種リン酸化部位変異体と6xHisとの融合タンパク質を発現するプラスミドについてはT48をAla, S114をAla, T122をAla, S135をAla, T349をAlaに置換した変異体をQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kitを用いて作成しそれぞれpET28aのXho IとNot I部位に挿入して作成した。Syt IVの各種欠損変異体とGSTの融合タンパク質を発現するプラスミドについてはSynaptotagmin IVの83番目から276番目(Spacer領域とC2A領域)、149番目から426番目(C2A領域とC2B領域) 83番目-159番目(Spacer領域)、149番目-276番目(C2A領域)、286番目-426番目(C2B領域)のアミノ酸残基をPCR法により増幅して pGEX-6P1のXhoI部位に挿入して作成した。レトロウイルスによるSynaptotagmin IVの野生型もしくはS135Aの発現プラスミド (pMX-IRES-puro-Syt IV (WT), pMX-IRES-puro-Syt IV (S135A))については、Mycタグを付加したプライマーによりPCRを行い pMX-IRES-PuroのXho I部位に挿入して作成した。ほ乳類細胞でのSynaptotagmin IVの野生型もしくはS135Aの発現プラスミド (pCS4-Myc-Syt IV (WT), pCS4-Myc-Syt IV (S135A))はpCS4-MycのXho I部位に挿入して作成した。またSyt IVの野生型もしくはS135Aの44番目-426番目のアミノ酸残基をPCR法により増幅してpCS4-MycのXho I部位に挿入して膜貫通領域欠損型(TMΔ)のSyt IVを発現するプラスミドを作成した (pCS4-Myc-Syt IV TMΔ (WT), pCS4-Myc-Syt IV TMΔ (S135A))。ヒト成長ホルモン発現プラスミド (pCDNA3-hGH) はHGH-TGES 100T KitをNicholes Instituteより購入し付

属のヒト成長ホルモンのcDNAをpCDNA3 (invitrogen) の *Bam* HIと *Eco* RI 部位に導入して作成した。Synaptotagmin IVのノックダウンするsiRNAを発現するプラスミド (pSilencer-Syt IV) については5'-

CTCCCATATAAAGCGACATTCAAGAGACTCCCATATAAAGCGACATTT
TTT-3'と5'-

AATTAAAAAATGTCGCTTTATATGGGGAGTCTCTTGAATGTCGCTTTATAT
GGGGAGGGCC-3'のオリゴDNAをpSilencer (Ambion)の *Apa* Iと *Eco* RIの部位
に挿入して作成した。なお前記のプラスミドのコントロール (pSilencer-
control) として5'-

GAAGTTTGGAGGAGATGACTTCAAGAGAGAAGTTTGGAGGAGATGACTTTT
TT-3'、5'-

AATTAAAAAAGTCATCTCCTCCAACTTCTCTCTTGAAGTCATCTCCTCCA
AACTTCGGCC-3'のオリゴDNAをpSilencer (Ambion)の *Apa* Iと *Eco* RIの部位
に挿入したものを作成した。

細胞および形質転換法

細胞はPC12、COS-1、PLAT-Eを用いた。PC12はDulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) に10% Fetal Bovine serum (FBS) と5% Horse Serum (HS)を加えた培地を用いた。COS-1およびPLAT-EはD-MEMに10% FBSを加えたものを用いた。それぞれの細胞は5% CO₂存在下の37℃の条件下で培養した。

PC12細胞の形質転換にはLipofectamine2000 (invitrogen)を用いた。PC12細胞をポリリジンコートした6well プレートに一枚当たり7.5x10⁵ cellsまき4 μgのDNAに対して10 μlのLipofectamine2000を加えた。NPY-Venusを発現す

るクローンの作成の際には形質転換から3日後にG418を750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え2週間培養した後にクローンリングを用いてNPY-Venusを発現している細胞をクローン化した。COS-1およびPLAT-E細胞の形質転換にはFuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals) を用いた。COS-1細胞は6well プレートに一枚当たり 2×10^5 cellsまき2 μg のDNAに対して4 μl のFuGENE6を加えるか、10cm プレートに一枚当たり 1×10^6 cellsまき10 μg のDNAに対して30 μl のFuGENE6を加えた。PLAT-E細胞は10cm プレートに一枚当たり 1×10^6 cellsまき10 μg のDNAに対して30 μl のFuGENE6を加えた。

レトロウイルスを用いた遺伝子の導入

pMX-IRES-Puroに各種遺伝子を挿入したプラスミドをパッケージング細胞のPLAT-EにFuGENEを用いて導入した。PLAT-Eは32°Cで3日培養して組み換えレトロウイルスを作成した。その上清培地を10000g, 4°Cで終日遠心してレトロウイルスを濃縮したのちにPC12細胞に加えて、3日後に培地中にPuromycinを750 ng/mlになるように加えてプラスミドが導入された細胞を選別した。

イムノブロット法

細胞をPBSで洗浄後、可溶化バッファー [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM β -glycerophosphate, 5 mM EGTA, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM dithiothreitol, 0.5% Triton X-100 + protease inhibitor (1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)]で細胞を破碎し細胞破碎液とした。細胞破碎液を遠心し (20000g, 4°C, 20分) 上清を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液はSDSポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動法によって分離しPolyvinylidene Fluoride(PVDF) 膜 (Millipore) に転写した。0.3%スキムミルクを含むTBSバッファーで1時間インキュベーションしてブロッキングした後、一次抗体を含む0.3%スキムミルク/TBSバッファー中に4℃で終夜反応させ、0.05%Tween-20を含むTBSバッファーで3回洗浄したのちhorse radish peroxidaseを結合した二次抗体を含む0.3%スキムミルク/TBSバッファー中に室温で1時間反応させた。最後にTBS-T Bufferで3回洗浄したあと発色反応をおこなった。発色にはWestern Blot Chemiluminescence 試薬 (PerkinElmer) を用いて行いX線フィルムを用いて検出した。

カルシウム依存的に放出されたNPY-Venusの測定

培地中に放出されたNPY-Venusの検出は以下の方法で行った。

PC12:NPY-Venus細胞を6wellのplateあたり 3×10^5 cellsまき48時間培養した。その後培地中のフェノールレッドはNPY-Venusの蛍光を阻害するためDME培地からフェノールレッドを含まないDME培地 (10%FBS, 5%HS) に置換した。次に高濃度 KCl 培地 (85 mM NaCl, 60 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES (pH7.4), 11 mM Glucose)、もしくは低濃度 KCl 培地 (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES (pH7.4), 11 mM Glucose) 220 μl に置換し、3分, 37℃で培養した。その後に培養上清を200 μl 回収してELISA-PLATE (Sumilon) に入れ、Venusの蛍光をSPECTRAmax Gemini (Molecular Devices) で励起波長507、検出波長537で検出した。この実験は3回おこないグラフにはmean \pm SDを記載した。

カルシウム依存的に放出されたヒト成長ホルモンの測定

培地中に放出されたヒト成長ホルモンの検出は以下の方法で行った。

PC12を6wellのplateあたり 3×10^5 cellsまき、24時間培養後3 μ gのpCDNA3-hGHおよび1 μ gの他の発現プラスミドをLipofectamine2000を用いて導入した。48から72時間後細胞を低濃度 KCl 培地で洗浄後、高濃度 KCl 培地もしくは低濃度 KCl 培地を220 μ l加えて3分37℃で培養した。その後高濃度 KCl 培地を加えたサンプルは培養後上清をを200 μ l回収し、低濃度 KCl 培地を加えたサンプルは上清を除いた後200 μ lの細胞破碎液を加えた。回収した高濃度 KCl 培地および細胞抽出液をSDSサンプル処理後に抗成長ホルモン抗体によるイムノブロットにより検出した。イムノブロットで検出された発光はATTO Cool Saver (Atto) で検出し、得られた発光強度はATTO CS analyzer software (ver 1.0) (Atto) を用いて定量した。この実験は3回おこないグラフにはmean \pm SDを記載した。

two-hybrid法によるscreening

実験には出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のPJ69-4A株 (*MATa leu2-3,112 trp1-901 ura3 -52 gal4 Δ gal80 Δ ade2::GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ*) を使用した (James et al., 1996)。まず酢酸リチウム法を用いてDBD-JNK1 α 1 K55M, DBD-JNK2 α 2 K55AおよびDBD-JNK3 α 2 K93Mを発現するプラスミドと、cDNAライブラリーでPJ69-4A株を形質転換した。次にこの形質転換体を第一次スクリーニングとしてヒスチジン欠損培地にまいた。また同時に非選択培地にまくことにより、実際に得られた形質転換体の数を推定した。ライブラリーはHumanのFetal Brain由来のcDNAライブラリー (Clontech) を用いた。なお、このcDNAライブラリーの独立

クローンの数は 3×10^6 であり、ポリdTプライミング法によってcDNAが合成されている。酵母の形質転換は酢酸リチウム法に従った。得られた形質転換体は必要なアミノ酸や塩基を含んでいるSD寒天培地上にまき、30℃で3～5日間培養した。第一次スクリーニングの段階で陽性だったクローンを第二次スクリーニングとしてさらにアデニン欠損培地に移して相互作用の確認をした。この段階でもコロニーを形成できるクローンが、真のDBD-JNKと相互作用するタンパク質をコードしている可能性が高いと考えられる。次にこの細胞からプラスミドDNAの単離をおこない再形質転換を行って疑似陽性ではないこと（得られた表現型が酵母の変異またはライブラリー単独によるものではないこと）を確認した後、DNA シークエンサーによって塩基配列の決定を行った。

組み換えタンパク質の精製

GST-Syt IV, GST-c-Jun (1-79)タンパク質の精製 は下記の方法に従った。BL21-Gold(DE3)菌株をpGEX6P-1, GST-Synaptotagmin IV, GST-c-Jun (1-79) で形質転換し、アンピシリンを含むLB培地で培養し、IPTG (isopropyl-Thio-B-D-galactopyranoside) 0.5 mMを37℃で2時間で発現を誘導した。その後大腸菌を回収し、Sonication Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF)で再懸濁して超音波処理により細胞を破碎した。その後Triton X-100を最終濃度が1%になるように加え20000g, 40分 4℃で遠心した。細胞破碎液を0.45 μ m サイズフィルター (Millipore) で濾過して2 mlのGlutathione-Sepharose (Amersham Biosciences)に注入した。カラムは10 ml PBSで洗浄したのちにGlutathioneを含むPBSで組み換えタンパク質を溶出させた。

His-MKK7-JNK1, His-Synaptotagmin IV は下記の方法に従った。

BL21-Gold(De3)菌株をpET28a His-MKK7-JNK1, His-Synaptotagmin IV で形質転換し、カナマイシンを含むLB培地で培養し、IPTG (isoprppyl-B-D-galactopilanoside) 0.5 mMを37℃で2時間で発現を誘導した。その後大腸菌を回収し、Binding Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mMイミダゾール) で再懸濁して超音波処理により細胞を破碎した。その後Triton X-100を最終濃度が1%になるように加え20000g, 40分 4℃で遠心した。細胞破碎液を0.45 μ m サイズフィルター (Millipore) で濾過してこの破碎液をニッケルカラム (invitorgen)に加えて、60 mMから1Mのイミダゾール勾配によりタンパク質を溶出して、組み換えタンパク質を精製した。

組み換えタンパク質の検出は、電気泳動後CBB染色およびイムノブロット法で行った。溶出させた組み換えタンパク質は透析Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSF, 0.1%(v/v)aprotinin) で透析した。

in vitro キナーゼアッセイ

前述の方法で精製した6xHisと野生型もしくはキナーゼ変異型のMKK7-JNK1の組み換えタンパク質を1サンプルにつき5 ngを加えて反応に用いた。また、基質には野生型 Synaptotagmin IV、Synaptotagmin IV S44A、Synaptotagmin IV S112A、Synaptotagmin IV T124A、Synaptotagmin IV S135A、Synaptotagmin IV S349AとのGSTもしくは6xHisの融合蛋白質を用いた。反応条件は[γ - 32 P]-ATPを含む20 mM Tris-HCl (pH7.5), 15 mM MgCl₂, 100 μ M ATPの反応液の条件下37℃で30分おこなった。反応はLaemmliのサンプルバッファーを加え煮沸により止めた。その後SDSポリア

クリルアミドゲル電気泳動法によってタンパク質を分離しオートラジオグラフィで³²Pの取込みを検出した。

GST pull down assay

COS-1細胞を10cm dish に1X10⁶まき各種プラスミドを導入し一晚培養した後、細胞を回収して15000g 20分遠心して上清の細胞抽出液をGST pull down assayのサンプルとした。この細胞抽出液をGST-Syt IVもしくはGST-c-Junが結合しているグルタチオンビーズに加えて2時間4℃で回転培養した。その後にPBSで洗浄して LaemmliのSDSサンプルバッファーを加えてGST-Syt IVもしくはGST-c-Junと共沈してくるFlag-JNKを抗Flag抗体によるイムノブロット法で検出した。

免疫共沈法

PC12細胞を10cm Dish一枚あたり2X10⁶細胞まき、24時間後細胞をPBSで洗浄したのちRadioimmune precipitation Buffer (2 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 1.0% Sodium deoxycholate, 0.025% SDS) を用いて細胞を回収して超音波処理したのち15000g 20分で遠心したのちその上澄を細胞破碎液として用いた。その後細胞破碎液に抗体を加え氷上で2時間置いた後、Protein G-Sepharose ビーズ (Amersham Biosciences) を加え、30分 4℃で回転培養した。その後ビーズを3回PBSで洗浄して LaemmliのSDSサンプルバッファーを加えてイムノブロット法により検出した。

細胞染色

PC12細胞をポリリジンコートしたカバーガラスを入れた12wellプレートに 2×10^5 まき、48時間後4%パラホルムアルデヒドにより37℃で10分固定した。次に0.3%Triton X-100を含むPBSに3分入れて細胞を可溶化した。PBSで洗浄したのちにブロッキングバッファー (3% bovine serum albuminを含むPBS) で1時間培養した。その後抗Synaptotagmin IV抗体を含むブロッキングバッファーで4℃一晩反応させた。その後PBSで3回洗浄し蛍光標識された坑ウサギ抗体 (Alexa 488 anti-Rabbit from Donkey) とZenon labeling Kit 546 (Molecular Probes) で標識したAnti-Rab3a 抗体、Zenon labeling Kit 643で標識したAnti-syntaxin6 抗体 を含む Blocking Bufferで室温1時間反応させた。その後染色した細胞をガラス上にマウントして、共焦点レーザ顕微鏡 (LSM-510, Zeiss) により観察した。

結果

1 NGFによる開口放出促進におけるJNKの必要性の検討

1-1 開口放出を測定する細胞の作成

まず開口放出を測定する実験系の確立を行った。今回の実験では開口放出を解析する細胞系としてPC12細胞を用いることにした。PC12細胞は副腎随質に由来し脱分極によるカルシウム流入により大型有芯小胞から神経ペプチドおよびホルモンを放出することが知られている。大型有芯小胞からの放出機構はシナプス小胞からの放出機構と比較して分子機構に様々な共通点があることからカルシウム依存的な開口放出のモデル系として用いられている。開口放出の検出にはNagaiらによって開発された神経ペプチドの一種であるニューロペプチドYと改変型GFPであるVenusとの融合タンパク質 (NPY-Venus) を用いた (Nagai et al., 2002)。ニューロペプチドYは大型有芯小胞より放出される神経ペプチドで、Venusは改変型YFPの一種であり通常のGFPもしくはYFPに比べて低pH条件下にある小胞内でも蛍光活性が保たれるという性質を持っている。

始めにこの細胞でカルシウム依存的な開口放出が起こるかを調べるために予備実験を行った。まずNPY-Venusが安定的に発現するPC12細胞 (PC12:NPY-Venus) を作成して以下の実験に用いた (Fig. 5A)。この細胞に60 mM KClを含む培地 (高濃度KCl培地) もしくは4.7 mM KClを含む培地 (低濃度KCl培地) を加えて、3分培養した後に放出されるNPY-Venusの量を蛍光強度により測定した。実験の結果、脱分極を引き起こさない低濃度KCl培地ではNPY-Venusの放出がほとんど起こっていないが、脱分極を引き起こす高濃度KCl培地ではNPY-Venusの放出が起こっていることが確認された (Fig. 5B)。この時あらかじめ100 ng/ml NGFで1時間刺激をすると低濃度KCl培地ではNPY-Venusの放出が

ほとんど起こっていないが、高濃度KCl培地ではNGF刺激をしていない細胞と比較して約1.5倍NPY-Venusの放出量は増加していた ($n=3$, $P<0.025$, Student's t-test)。また低濃度KCl培地もしくは高濃度KCl培地に10 mM EGTAを加えてカルシウムイオンをキレートした場合にはNPY-Venusの放出は起こらなかった。以上のことからこの系においてNGF刺激によりカルシウム依存的な開口放出が促進されることが示された。

1-2 JNK阻害剤SP600125による開口放出の抑制について

NGF刺激による開口放出の促進におけるJNKの必要性について検討した。JNK経路の活性化はリン酸化Thr183, Tyr185 JNKを認識する抗体、もしくはJNKによってリン酸化されるSer63 c-Junを認識する抗体を用いたイムノブロット法で検出した。NGF刺激(100 ng/ml, 1h)によりリン酸化JNKもしくはリン酸化c-Junに対する抗体が強く反応した。一方JNK阻害剤SP600125をあらかじめ(20 μ M, 30min) 加えておくとNGF刺激によるリン酸化JNKもしくはリン酸化c-Junに対する抗体の反応はコントロールにNGF刺激をした時に比べて減少した (Fig. 5C)。この条件下でカルシウム流入によるNPY-Venusの放出量を測定したところNGF刺激によりNPY-Venusの放出が促進されたが、この時培地中にSP600125をあらかじめ加えておいた場合では顕著に減少 (32.58% \pm 4.49%)していることが判明した (Fig. 5D) ($n=3$, $P<0.005$, Student's t-test)。よってNGF刺激によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進がJNK阻害剤SP600125によって抑制されることが示された。ただしキナーゼ阻害剤のいくつかは非特異的にカルシウムチャネルを阻害することにより開口放出を抑制する場合があることが報告されている(Pereira et al., 2002)。そこで次にSP600125がカルシウムチャネルを抑制することにより開口放出を抑制したの

かについて検討した。カルシウムチャネル非依存的にカルシウム流入をおこすイオノフォアであるイオノマイシンを用いて実験をおこなった。もしSP600125による効果がカルシウムチャネルの機能を阻害したことが原因ならば、イオノマイシンによる開口放出はたとえSP600125を加えていても抑制されないことが予想される。実験の結果、イオノマイシンによって開口放出を誘導した場合でもNGF刺激によりNPY-Venusの放出が促進されたが、培地中にSP600125をあらかじめ加えておいた場合も減少 ($24.44\% \pm 12.21\%$) していることが判明した (Fig. 5E) ($n=3$, $P<0.01$, student's t-test)。このことからSP600125による開口放出の抑制はカルシウムチャネルに依存しないことが示唆された。なお高濃度KClによる開口放出はカルシウムチャネル依存的で、イオノマイシンによる開口放出はカルシウムチャネル非依存的であることはFig. 5Fの結果からL-typeカルシウムチャネルの阻害剤であるNifedipineを作用させると高濃度KClによる開口放出はコントロールと比較して約95%減少したのに対してイオノマイシンによる開口放出は抑制されなかったことから確認された。これらの結果からNGFによって促進される開口放出はJNK阻害剤SP600125によって抑制され、かつSP600125はカルシウム流入の下流の過程を抑制していることが示唆された。

1-3 JBDを用いた開口放出におけるJNKの必要性の検討

SP600125はJNK経路を特異的に抑制する薬剤として作成されたが(Bennett et al., 2001)、JNK経路以外のキナーゼであるERK2なども抑制されることが最近報告されている(Bain et al., 2003)。ERK2を含む古典的MAPキナーゼ経路はNGFによる開口放出に必要であることがPC12細胞において報告されていることから(Amino et al., 2002)、SP600125による開口放出の抑制はJNK経路で

はなくMAPK経路を抑制したためである可能性も考えられる。そこでSP600125以外にJNK経路を特異的に抑える方法としてJBD (JIP-1のJNK結合領域(127-281))を用いて実験を行うことにした。JBDはJNKと直接結合することによりアロステリックに酵素活性を阻害し、かつMAPK経路とp38経路は抑制しないことが報告されている(Barr et al., 2002; Heo et al., 2004)。そこでレトロウイルスを用いてJBDを発現するプラスミドをPC12:NPY-Venus細胞に導入し、NGF刺激による開口放出の促進について検討した。まずNGF刺激によるJNKおよびc-Junの活性化をイムノブロットにより検出した結果、JBDを発現している細胞にNGF刺激をした場合ではコントロール細胞にNGF刺激をした場合と比較してリン酸化JNKに対する反応は減少しなかったが、リン酸化c-Junに対する抗体の反応が減少した (Fig. 6A)。よってNGF刺激によるJNK自身のリン酸化はJBDでは抑制されないが、JNKによるc-Junのリン酸化は抑制されることが示唆された。従ってJBDはJNKの酵素活性すなわち基質をリン酸化する過程を阻害していることが考えられる。次にこの条件での開口放出の実験を行った。その結果コントロール細胞ではNGF刺激により高濃度KClによるNPY-Venusの放出が約1.5倍上昇したが、JBDを発現している細胞ではNGF刺激を行っても高濃度KClによるNPY-Venusの放出はほとんど促進されなかった (Fig. 6B) ($n=3$, $P<0.05$, Student's t-test)。また高濃度KClの代わりにイオノマイシンにより開口放出を誘導した場合でも、NGF刺激により開口放出は約1.5倍上昇したがJBDを発現する細胞ではNGF刺激をしてもNPY-Venusの放出はほとんど促進されなかった (Fig. 6C) ($n=3$, $P<0.025$, Student's t-test)。以上の結果かNGF刺激による開口放出の促進にはJNKの活性が必要であることが示された。

2 開口放出におけるJNKの十分性の検討

次にNGF刺激を行わなくてもJNK経路を活性化すれば開口放出が促進されるかどうか検討した。本研究で用いているPC12細胞においてJNKを強く活性化させると細胞死が誘導されることが知られている。そこでJNK経路をマイルドに活性化させる方法としてJNKを特異的にリン酸化するMAPKKであるMKK7の活性型を発現することにした。MAPKKKにリン酸化されるS287, T291, S293を酸性アミノ酸に変異しリン酸化を模倣したMKK7 [S287D, T291E, S293D]を活性型MKK7として用いた(Moriguchi et al., 1999)。一方、リン酸化部位をアラニンに置換したMKK7 [S287A, T291A, S293A]を不活性型MKK7として用いた。これらのMKK7を発現するプラスミドをレトロウイルスを用いてPC12:NPY-Venus細胞に導入した。JNKの活性化の検出はリン酸化JNKを認識する抗体を用いたイムノブロット法で検出した。その結果から活性型MKK7を発現する細胞ではリン酸化JNKに対する抗体がコントロール細胞よりやや強く反応し、一方不活性型のMKK7を発現する細胞ではリン酸化JNKに対する抗体は反応しなかった(Fig. 7A)。従ってこの条件で活性型MKK7はJNKを緩やかに活性化し、不活性型MKK7はJNKを活性化させないことが示された。この条件で開口放出をおこなった結果、活性型MKK7を発現する細胞ではコントロール細胞に比べて約1.3倍開口放出が促進されたが ($n=3$, $P<0.01$, Student's t-test)、不活性型MKK7を発現する細胞では活性型MKK7を発現する細胞に比べて開口放出の上昇は起こっていなかった(Fig. 7B)。この結果からJNK経路を活性化するだけで開口放出が促進されることが示された。

3 JNKの新規結合タンパク質のスクリーニング

前述の結果からJNK経路が開口放出の促進に重要な役割を果たすことが示された。そこで次にJNKがどのようなターゲットを介して開口放出を制御するかを検討した。JNKファミリーの新たな結合分子を同定するためにヒト胎児脳由来のcDNA ライブラリーを用いて酵母two-hybrid 法によるスクリーニングをおこなった。スクリーニングの結果JNK1は 5×10^5 , JNK2は 5×10^5 , JNK3は 5×10^5 の独立クローンを得た。このcDNAライブラリーの独立クローンは 3×10^6 であったことからJNK1は10%、JNK2はJNK3はライブラリーの50%をカバーしていることになる。このうち二次スクリーニングの段階でJNK2と相互作用のあった51クローン、JNK3と相互作用のあった8クローンについて塩基配列の決定をおこなった結果、JNK2と相互作用のあるクローンとして Synaptotagmin IV (Syt IV)の82番目から425番目のアミノ酸残基をコードしているクローンが得られた(Fig. 8A)。Fig. 8Bでは、two-hybrid 法によりJNK1, JNK2, JNK3とSyt IVの結合を確認した結果を示している。この結果JNK1, JNK2, JNK3のいずれのアイソフォームでも、相互作用によるレポーター遺伝子の発現によりアデニン欠乏培地でも出芽酵母が生育してきた。よって全てのJNKアイソフォームがSyt IVと結合しうることが示唆された。ただしJNK2を発現している出芽酵母は生育速度がJNK1、JNK3を発現している出芽酵母に比べて遅かったことからJNK2とSyt IVの結合が弱い可能性が考えられる。また、JNK以外のMAPキナーゼスーパーファミリーであるMAPKもしくはp38の場合ではアデニン欠乏培地では出芽酵母は生育しなかった。従ってMAPKもしくはp38とSyt IVは結合していないと考えられる。以上のことからSyt IVはMAPキナーゼスーパーファミリーの中でJNKと特異的に結合する可能性が示唆された。

4 NGFによる開口放出促進へのSyt IVの必要性について

これまでPC12細胞において13種類あるSynaptotagminファミリーのうち Syt I, Syt IV, Syt IXが発現していることが報告されている(Zhang et al., 2002)。そのうち、Syt IとSyt IXはPC12細胞において分泌小胞のカルシウム依存的な開口放出に必要であることが報告されている(Fukuda et al., 2002)。一方Syt IVに関しては機能を阻害する中和抗体を加えても開口放出は抑制されないことから(Shin et al., 2002)、Syt IVが開口放出に関与しているかは明らかではなかった。そこでPC12細胞においてNGFによる開口放出の促進にSyt IVが必要かどうか検討した。この時はWickらによって開発されたヒト成長ホルモンを測定することにより開口放出をモニターする実験系を用いた(Fig. 9)(Oishi et al., 1998; Wick et al., 1993)。Syt IVの必要性を検討するために内在性のSyt IVの発現を抑制できるSyt IVのsiRNAを発現するプラスミドを作成した。まず作成したプラスミドが内在性のSyt IVの発現量を抑制できるか検討した。イムノブロットによる検出の結果、コントロールsiRNAを発現するプラスミドを導入したサンプルに比べてSyt IVのsiRNAを発現するプラスミドではSyt IVの発現量は減少していた(Fig. 10A)。このときGAPDHの発現量およびSyt Iの発現量に変化はないことから、他の遺伝子産物もしくはSyt IV以外のアイソフォームの発現量には影響がないことが示唆される。よって作成したプラスミドは特異的に内在性のSyt IVの発現量を減少させることが示された。このプラスミドを用いてPC12細胞でのNGFによる開口放出の促進にSyt IVが関与しているかどうかについて検討した。その結果、NGF刺激をした際にコントロールsiRNAを発現するプラスミドを導入した細胞ではカルシウム流入によるヒト成長ホルモンの放出が約1.8倍上昇していたが、Syt IVのsiRNAを発現するプラスミドを導入した細胞ではNGF刺激をしても放出の上昇は起こらなかった(Fig. 10B)。この

結果を定量したところ、コントロールプラスミドを発現した細胞ではNGF刺激によりヒト成長ホルモンの放出が約1.8倍促進されていたが、Syt IVのsiRNAを発現するプラスミドを導入した細胞ではNGF刺激を行ってもヒト成長ホルモンの放出は促進されなかった(Fig. 10C) ($n=3$, $P<0.005$, Student's t-test)。これらの結果からNGFによる開口放出の上昇にSyt IVが必要であることが示唆された。

5 JNKとSyt IVのin vitroの結合について

先ほどの結果よりNGFによる開口放出の促進にSyt IVが関与する可能性が示唆されたことから、NGFによるJNKを介した開口放出にSyt IVが関係する可能性が考えられる。そこでtwo-hybrid法で得られたJNKとSyt IVが結合するという結果をin vitroで確認を行った。in vitroの結合を確認する方法にGST pull down法を用いた。大腸菌に発現し精製してきたリコンビナントGST-Syt IVとFlag-JNK1、Flag-JNK2、Flag-JNK3を混合し、グルタチオンセファロースを用いてGST-Syt IVを沈降させるとFlag-JNK2は検出されなかったが、Flag-JNK1とJNK3は検出されSyt IVとの結合が確認された(Fig. 11A)。よってGST pull down法と酵母two-hybrid法の両方の結果からJNK2に比べてJNK1およびJNK3のSyt IVに対する結合能は強いと考えられる。

またJNKがSyt IVのどの領域に結合するかを調べるためにSyt IVの様々な欠損変異体を作成して検討した。Syt IVはカルシウムと結合する2つの領域(C2A,C2B)が存在し、膜貫通領域とC2A領域の間はSpacer領域と呼ばれている。そこでC2A領域とC2B領域、Spacer領域とC2A領域、Spacer領域、C2A領域、C2B領域を含むSyt IV各種欠損変異体とGSTの融合タンパク質を作成し(Fig. 11B)、GST pull down法によりJNKとSyt IVの結合を検討した。その

結果、全長のSyt IVと同様にspacer領域とC2A領域を含むSyt IVは全長のSyt IVと同様に結合したが、spacer領域のみもしくはC2A領域のみのSyt IVではほとんど結合が見られなかった(Fig. 11C)。またC2A領域とC2B領域もしくはC2B領域のみを含むSyt IVでは結合が見られなかった。よってJNKはSyt IVのspacer領域とC2A領域の両方を介して結合していること、およびC2B領域はJNKとの結合に関与しないことが示唆された。

さらにJNKのどの領域がSyt IVの結合に必要なか検討した。MAPキナーゼファミリーには基質との相互作用に必要な領域としてCD領域もしくはED領域があることが報告されている(Fig. 11D)(Mooney and Whitmarsh, 2004; Tanoue et al., 2001)。そこでこれら領域がSyt IVとの結合に必要なかどうか検討した。GST pull down法の結果、野生型のJNKに比べてED領域の変異体もしくはCD領域の変異型JNKはGST-Syt IVとの結合は減少していた(Fig. 11E)。このことからSyt IVはJNKの基質認識部位に結合している可能性が示唆された。

6 JNKとSyt IVの細胞内での結合について

次にJNKがSyt IVと細胞内でも結合しているかどうか検討した。PC12細胞の細胞抽出液から抗Syt IV抗体を用いて内在性のSyt IVを免疫沈降しJNKが共沈するかをイムノブロットにより検出した。その結果Syt IV抗体で免疫沈降したサンプルでは共沈してくるJNKを検出することができた(Fig. 12)。このことはPC12細胞で内在性のSyt IVとJNKが結合していることを示唆している。

7 JNKによるSyt IVのin vitroのリン酸化について

これまでの結果からJNKがSyt IVが結合していることが明らかになった。次にSyt IVがJNKによってリン酸化されるかどうかについて検討した。キナーゼ

としてMKK7とJNK1を融合させたリコンビナント活性型JNK (MKK7-JNK1) を、基質としてリコンビナントGST-Syt IVを用いてin vitroのキナーゼアッセイをおこなった。オートラジオグラフィーによる検出の結果、活性型JNK (MKK7-JNK1)を加えたサンプルではSyt IVのリン酸化が検出された(Fig. 13A)。このことからin vitroにおいてSyt IVはJNKによってリン酸化されることが示唆された。次にJNKによるSyt IVのリン酸化部位を同定することを試みた。JNKの属するMAP kinaseはプロリン残基の一つ前のセリンもしくはスレオニンをリン酸化する。Syt IVにはこのような候補配列がT48, S114, T122, S135, T349の5つ存在していたので(Fig. 13B)、それぞれアラニンに置換した変異体を作成してIn vitroのリン酸化反応を行った。オートラジオグラフィーによる検出の結果、Ser114をAlaに置換したSyt IVおよび、Ser135をAlaに置換したSyt IVでは活性型JNKによるリン酸化が減少していた(Fig. 13C)。この結果からIn vitroではSyt IVのSer114、Ser135がJNKによってリン酸化されることが示唆された。なおこの領域の相同性を比較したところ、マウス、ラット、ヒトにおいてSer135は保存されていたが、Ser114はヒトにしか存在しなかった(Fig. 13D)。このことからSer135がSyt IVの機能に重要である可能性が考えられる。

8 JNKによるSyt IVのin vivoのリン酸化について

次にPC12細胞内でSyt IVがJNKによってリン酸化されるか検討した。まず、Syt IVのリン酸化されたSer135を特異的に認識する抗体を作成して、この抗体が細胞内のリン酸化Synaptotagminを認識できるか検討した。リン酸化Ser135抗体を用いたイムノブロットを行うとCOS-1細胞に野生型Syt IVと活性型JNKを発現している細胞では強く反応しているのに対して、Ser135をAla

に置換した変異型Syt IVでは活性型JNKを発現してもほとんど反応しなかった (Fig. 14A)。よって作成したリン酸化抗体がリン酸化されたSyt IVのSer135のみを認識することが示された。

そこで、この抗体を用いてPC12細胞でのNGF刺激によるJNKのリン酸化を経時変化を追って検討した。その結果、NGF刺激後30分～1時間からSyt IVがリン酸化され、またJNKもNGF刺激後30分～1時間からリン酸化されることが判明した (Fig. 14B)。このことからNGFによるJNKのリン酸化とSyt IVのリン酸化はほぼ同時期であることが示唆された。

次にNGFによるSyt IVのSer135リン酸化におけるJNKの必要性について検討した。その結果、JBDを発現している細胞ではコントロール細胞に比べてNGF刺激によるリン酸化されるSyt IVが減少した (Fig. 14C)。このことからNGFによるSyt IVのリン酸化にJNKが必要であることが示唆された。

9 Syt IV Ser135依存的な開口放出の促進

Syt IVのSer135のリン酸化はSyt IVが関与する開口放出を制御している可能性が考えられる。そこで野生型のSyt IV、およびSyt IV S135Aを発現するプラスミドをレトロウイルスを用いてPC12:NPY-Venus細胞に導入し、Syt IVのSer135が開口放出の機能に必要なか検討した。まず野生型のSyt IV、およびSyt IV S135Aが発現していることをイムノブロットで確認した (Fig. 15A)。これらの細胞を用いて開口放出をおこなった結果、野生型のSyt IVを発現している細胞ではコントロール細胞に比べて約1.3倍開口放出が促進されたが、一方Syt IV S135Aを発現している細胞では開口放出の促進は起こっていなかった (Fig. 15B) ($n=3$, $P<0.025$, Student's t-test)。したがってSyt IVの開口放出促進機能にはSer135が重要であることが示された。

さらに別の開口放出の実験系によってSyt IVのSer135が開口放出に必要なか検討した。この方法ではPC12細胞にヒト成長ホルモンを発現するプラスミドを導入して、高濃度KClにより培地中に放出されたヒト成長ホルモンをイムノブロットにより検出した。その結果Syt IVの野生型を発現した細胞では高濃度KClによるヒト成長ホルモンの放出はコントロールに比べて促進されていたが、Syt IVのS135Aを発現した細胞では促進されなかった(Fig. 15C)。この結果を定量したところ、Syt IVの野生型を過剰発現した細胞ではコントロールに比べて約1.8倍促進されていたが($n=3$, $P<0.005$, Student's t-test)、Syt IVのS135Aを過剰発現した細胞ではヒト成長ホルモンの放出はコントロールとほぼ同じ値であった(Fig. 15D)。これらの結果からSyt IVのSer135はSyt IVによる開口放出の促進に必要であることが示唆された。

10 JNK依存的なSyt IVの局在移行

これまでの結果からNGFによる開口放出の促進にはJNK活性とSyt IVが必要でありかつNGFはJNK依存的にSyt IVのSer135をリン酸化すること、またSyt IVの開口放出促進機能にはSer135が必要であることが明らかになった。それではJNKはSyt IVのいかなる機能を制御しているだろうか？ Syt IVはPC12細胞においてNGFの刺激依存的に未成熟小胞から成熟小胞へと局在を変えることが報告されている(Fukuda et al., 2003)。そこで一つの仮説として、NGFはJNKを介してSyt IVをリン酸化することにより未成熟小胞から成熟小胞への局在移行を制御している可能性を考えた。この仮説を検証するためにNGF刺激によるSyt IVの局在移行におけるJNKの必要性について検討した。PC12細胞もしくはJBDを発現する細胞に6時間NGF刺激をした後に、Syt IV抗体、成熟小胞のマーカであるRab3、ゴルジ体もしくは未成熟小胞のマーカであるSyntaxin6で

細胞染色をおこない局在を観察した。その結果、NGF刺激をしていないPC12細胞ではSyt IVはほとんどSyntaxin6と共局在していた(Fig. 16A)。このことはSyt IVは主にゴルジ体に局在しているという報告と一致している。一方NGF刺激をした細胞では一部のSyt IVが細胞膜近傍に局在を移行していることが観察された。この領域はRab3が局在している領域であることから、成熟小胞に移行したSyt IVであると考えられる。このときJBDを発現している細胞にNGF刺激をした場合には細胞膜近傍へのSyt IVの局在移行がほとんど見られなかった。この結果をより定量的に検討するためにSyt IVが細胞膜近傍に局在している割合を細胞ごとに算出した。その結果NGF刺激をしたサンプルではコントロールと比較してSyt IVが細胞膜近傍に局在している細胞の割合は上昇していたが、JBDを発現している細胞にNGF刺激をした細胞ではSyt IVが細胞膜近傍に局在している細胞の割合はほとんど上昇していなかった(Fig. 16B)。これらの結果からNGFによるSyt IVの局在移行にJNKが必要であることが示唆された。

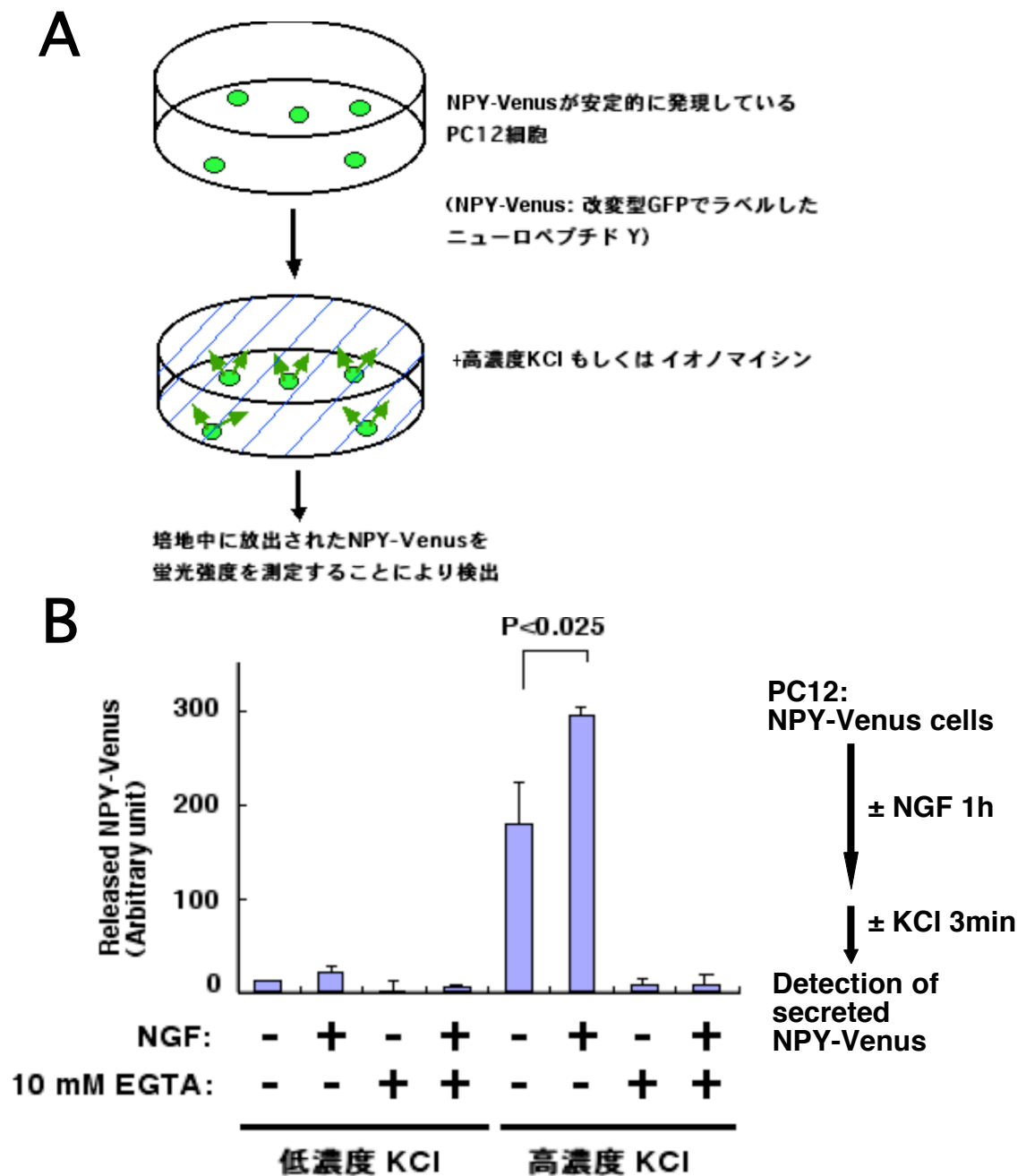
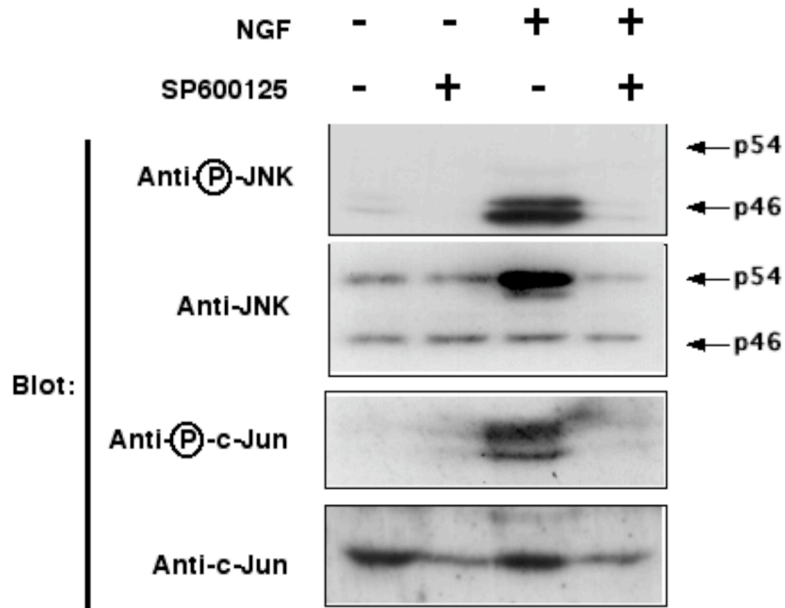


Fig.5 JNK阻害剤SP600125によるNGF依存的な開口放出の促進の抑制

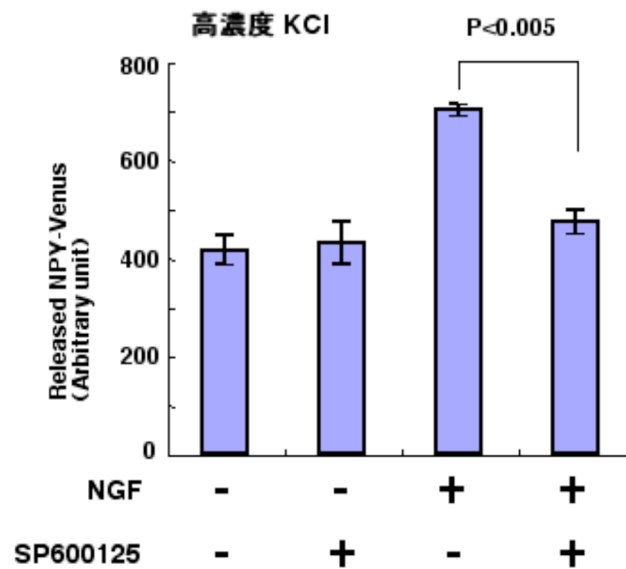
(A) PC12:NPY-Venus細胞を用いたカルシウム流入依存的な開口放出の測定方法について

(B) PC12:NPY-Venus細胞にNGFで1時間刺激し高濃度KClを含む培地もしくは低濃度KClを含む培地で3分培養した後、培地中に含まれるNPY-Venusの量を定量した。

C



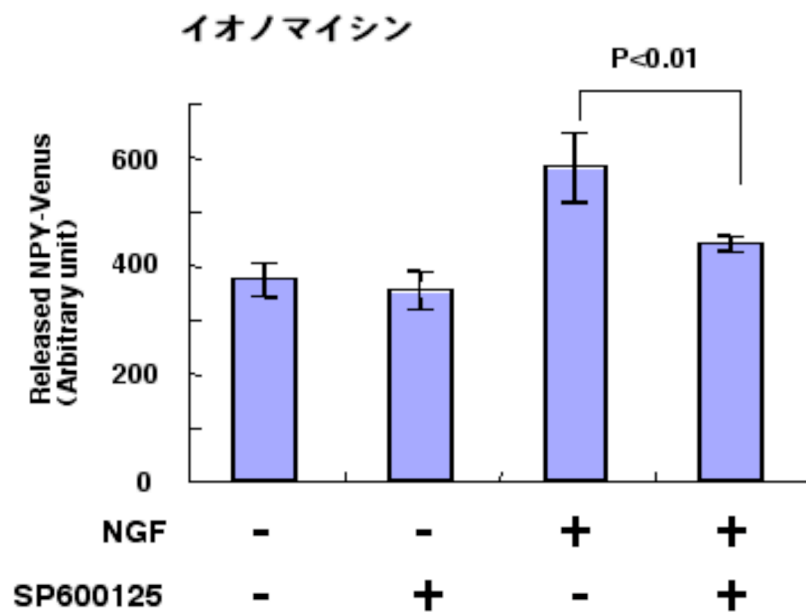
D



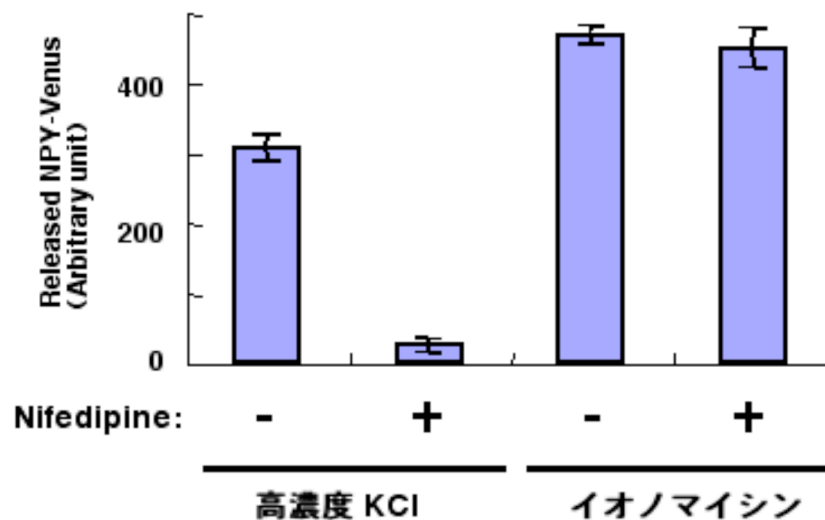
(C) PC12:NPY-Venus細胞に20 μ M SP600125で30分処理した後にNGFで1時間刺激し、NGF刺激で活性化しているJNKとc-Junをイムノブロットで検出した。

(D) PC12:NPY-Venus細胞に20 μ M SP600125で30分処理した後にNGFで1時間刺激し、高濃度KClを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

E



F



(E) PC12:NPY-Venus細胞に20 μ M SP600125で30分処理した後にNGFで1時間刺激し、5 μ M イオノマイシンを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

(F) PC12:NPY-Venus細胞に100 nM nifedipineで30分処理した後に高濃度KClもしくはイオノマイシンを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

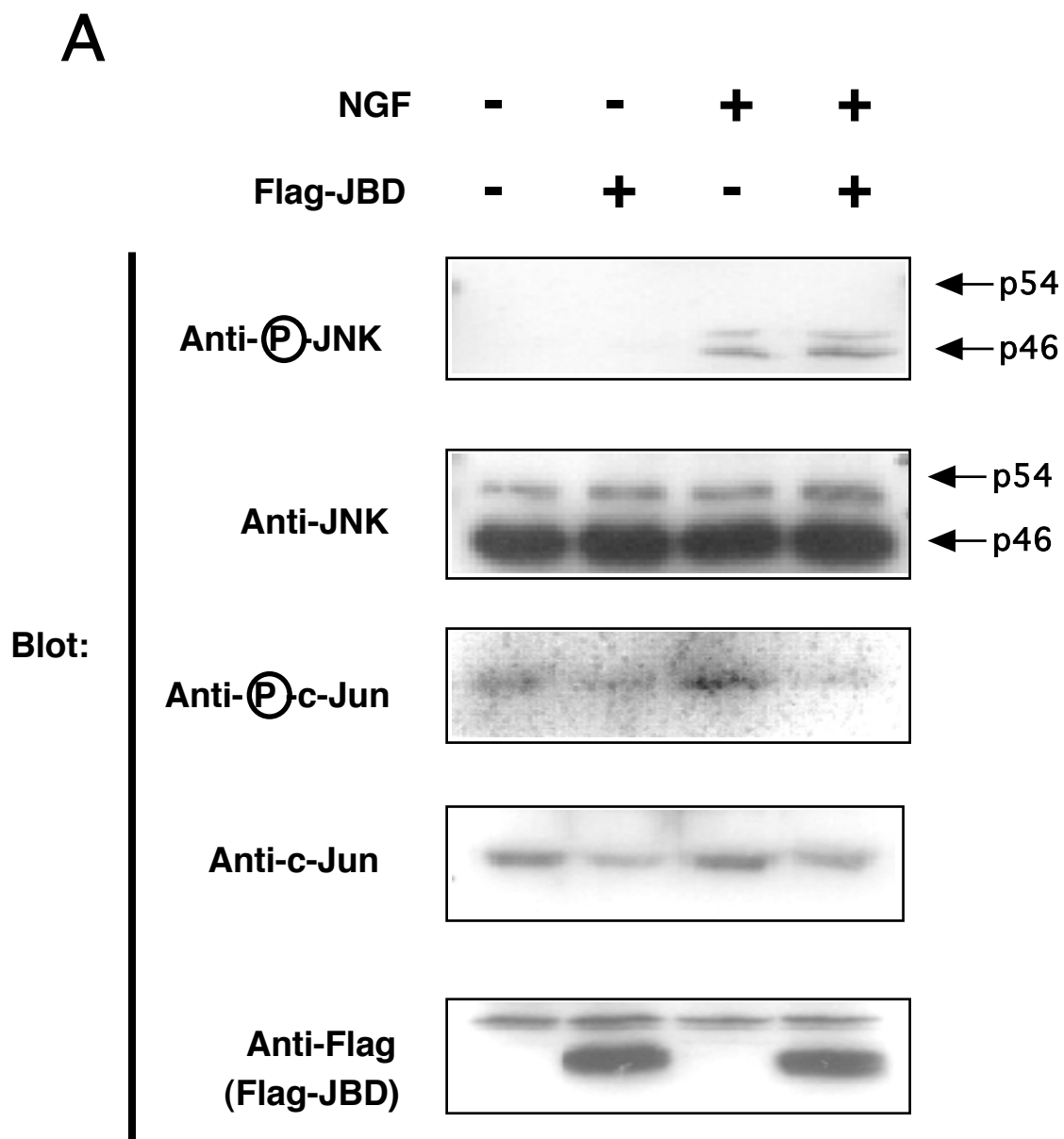
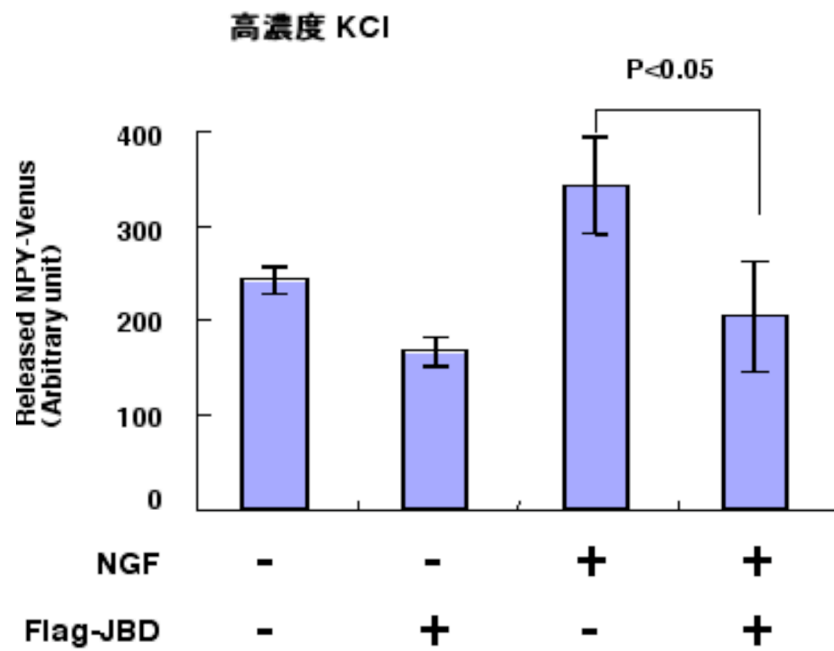


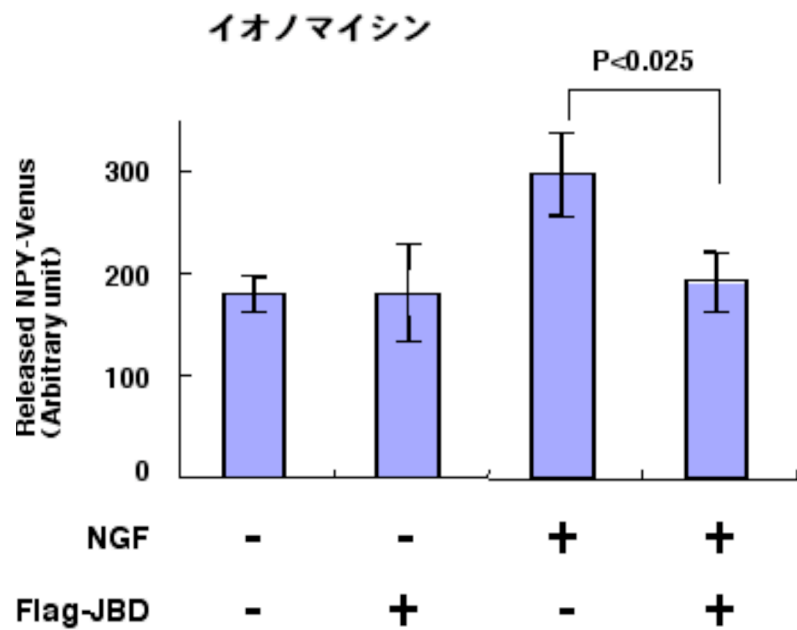
Fig.6 JBDによるNGF依存的な開口放出の促進の抑制

(A) PC12:NPY-Venus細胞もしくはPC12:NPY-VenusにJBDを発現している細胞にNGFで1時間刺激し、NGF刺激で活性化しているJNKとc-Junをイムノブロットで検出した。

B

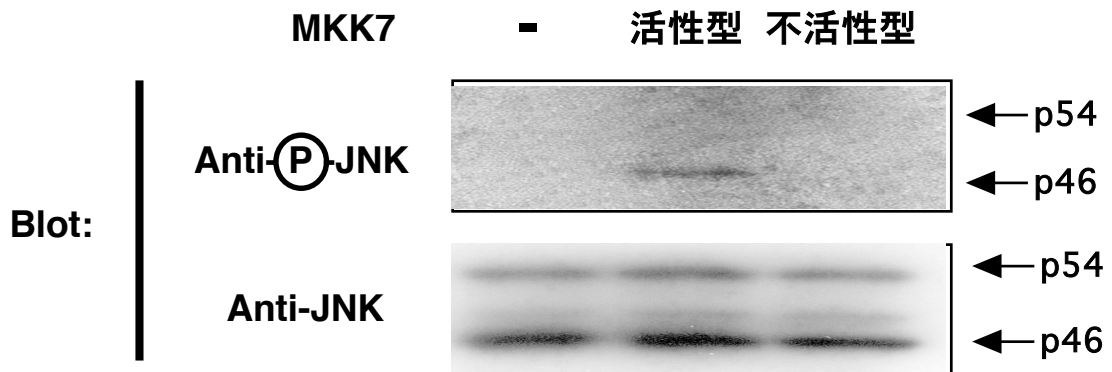


C



(B,C) PC12:NPY-Venus細胞もしくはPC12:NPY-VenusにJBDを発現している細胞にNGFで1時間刺激し、高濃度KCl (B) もしくはイオノマイシン (C) を含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

A



B

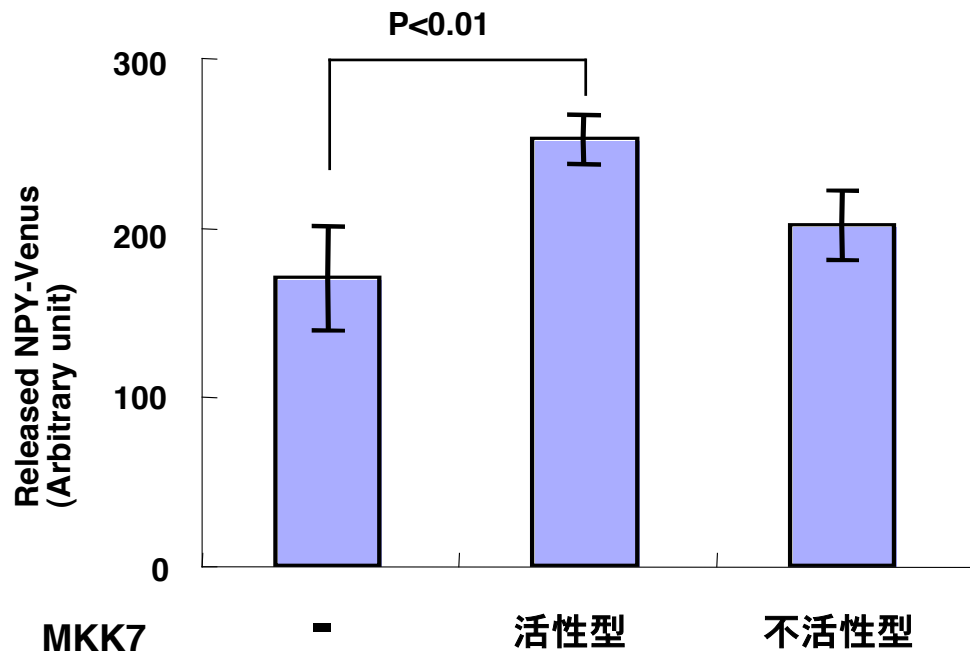
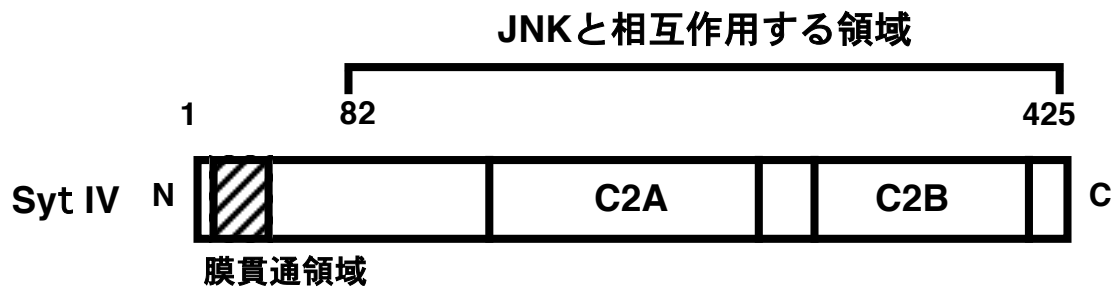


Fig.7 JNK経路の活性化による開口放出の促進

(A) PC12:NPY-Venus細胞に活性型もしくは不活性型MKK7を発現させ、活性化しているJNKをイムノプロットにより検出した。

(B) PC12:NPY-Venus細胞に活性型もしくは不活性型MKK7を発現させし高濃度KClを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

A



B

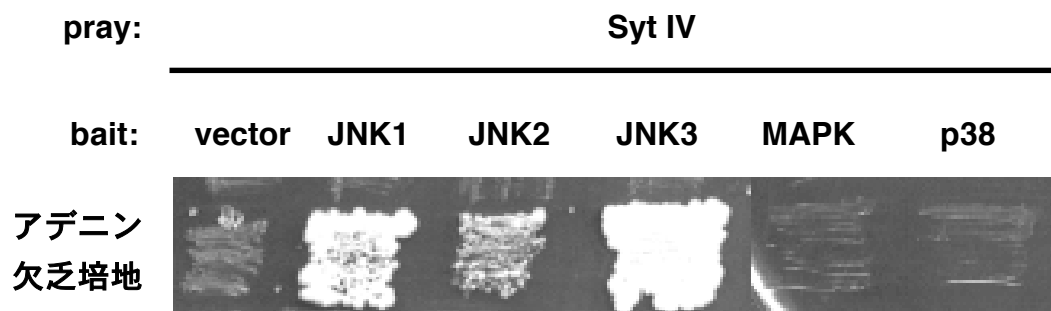


Fig.8 JNKの新規結合タンパク質Synaptotagmin IV (Syt IV)

(A) Syt IVの構造模式図。two-hybrid法で相互作用した領域を下線部で示した。

(B) 出芽酵母PJ69-4AにGAL4のDNA結合領域とJNK1,JNK2,JNK3もしくはMAPK, p38の融合タンパク質とGAL4転写活性化領域とSyt IVの融合タンパク質を発現させてアデニン欠乏培地で培養した。

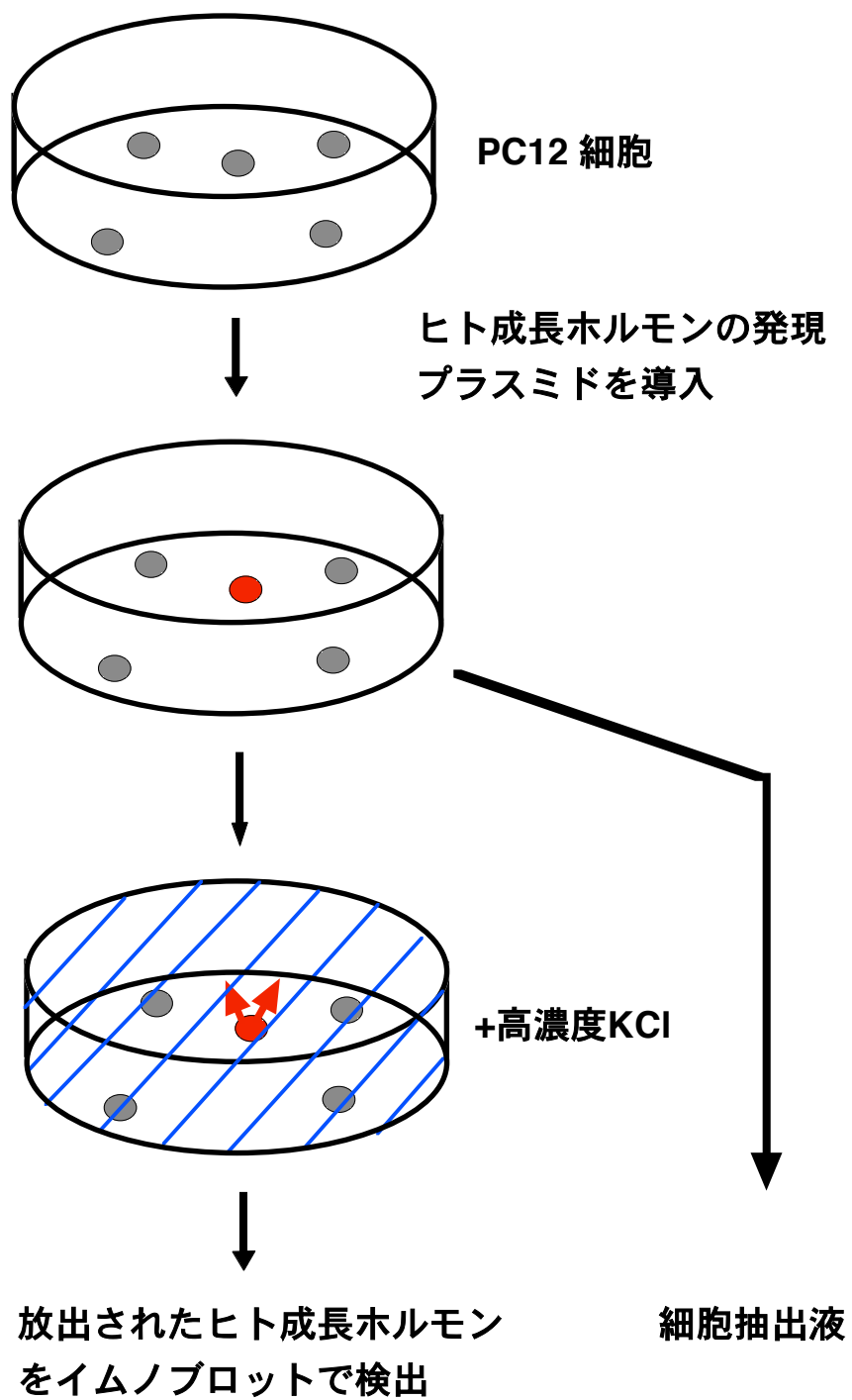
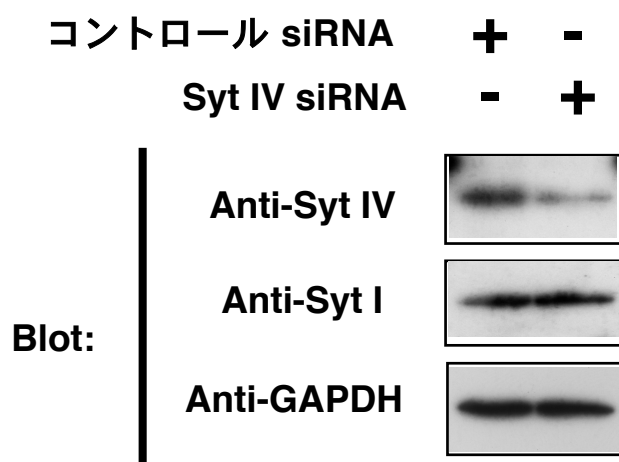


Fig.9 PC12細胞によるヒト成長ホルモンを用いたカルシウム流入依存的な開口放出の測定

A



B

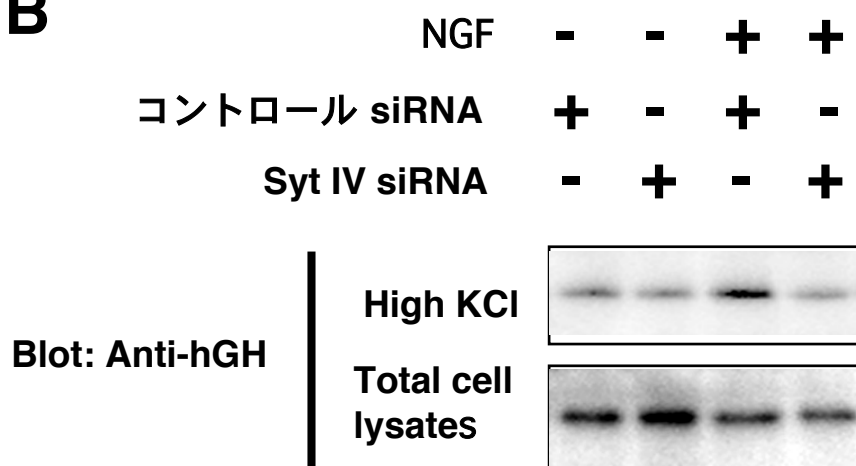
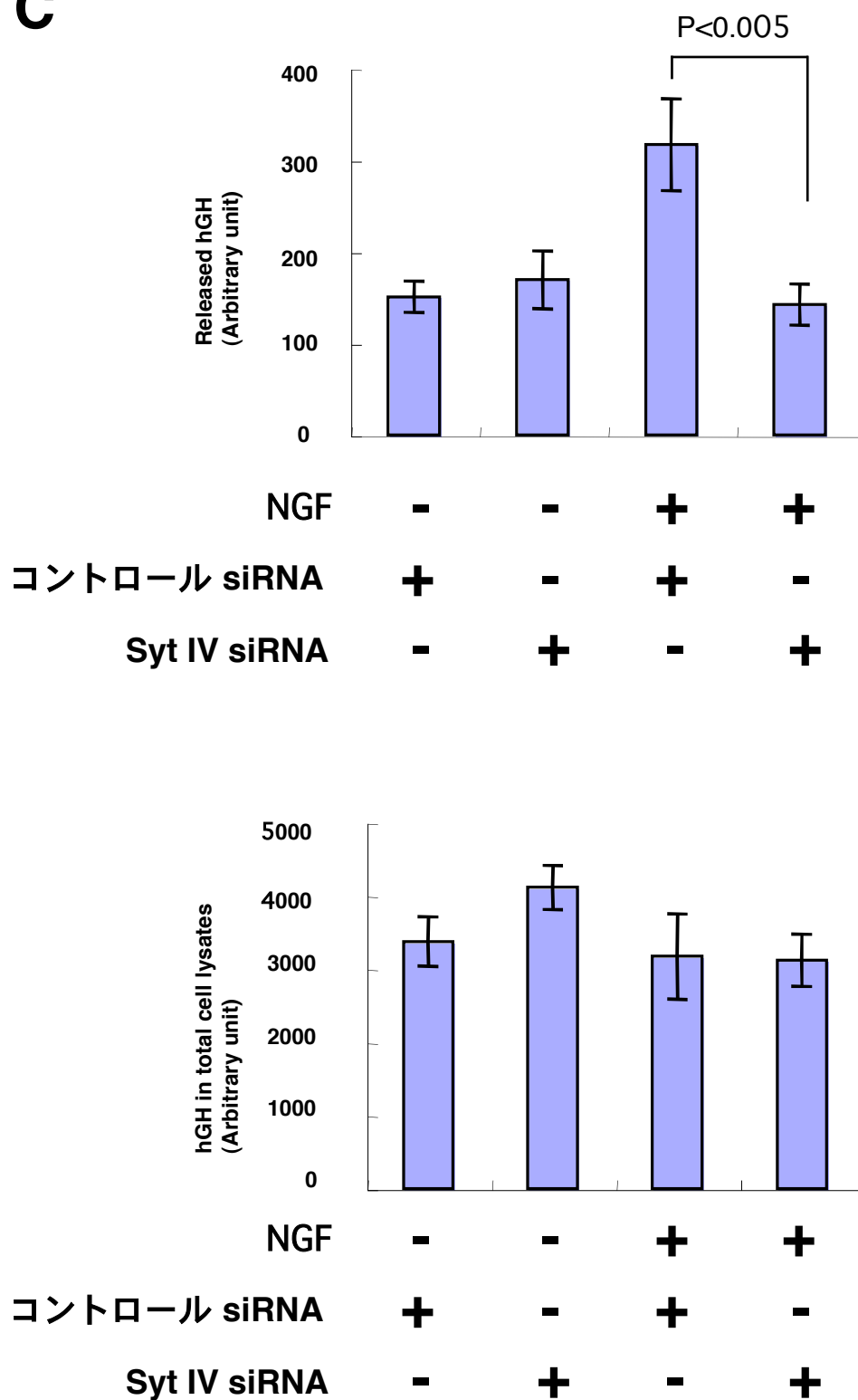


Fig.10 NGFによる開口放出の促進におけるSyt IVの必要性

(A) PC12細胞にSyt IVをノックダウンさせる siRNAを発現するプラスミドを導入し、Syt IV、Syt I、GAPDHの量をイムノプロットにより検出した。

(B) PC12細胞にヒト成長ホルモンを発現するプラスミドあるいはSyt IVをノックダウンさせる siRNAを発現するプラスミドを同時に導入し、NGFで1時間刺激した後、高濃度KClを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるヒト成長ホルモンの量をイムノプロットにより検出した。

C



(C) Fig.10Bの実験を3回行い、得られた結果を定量化した。

A

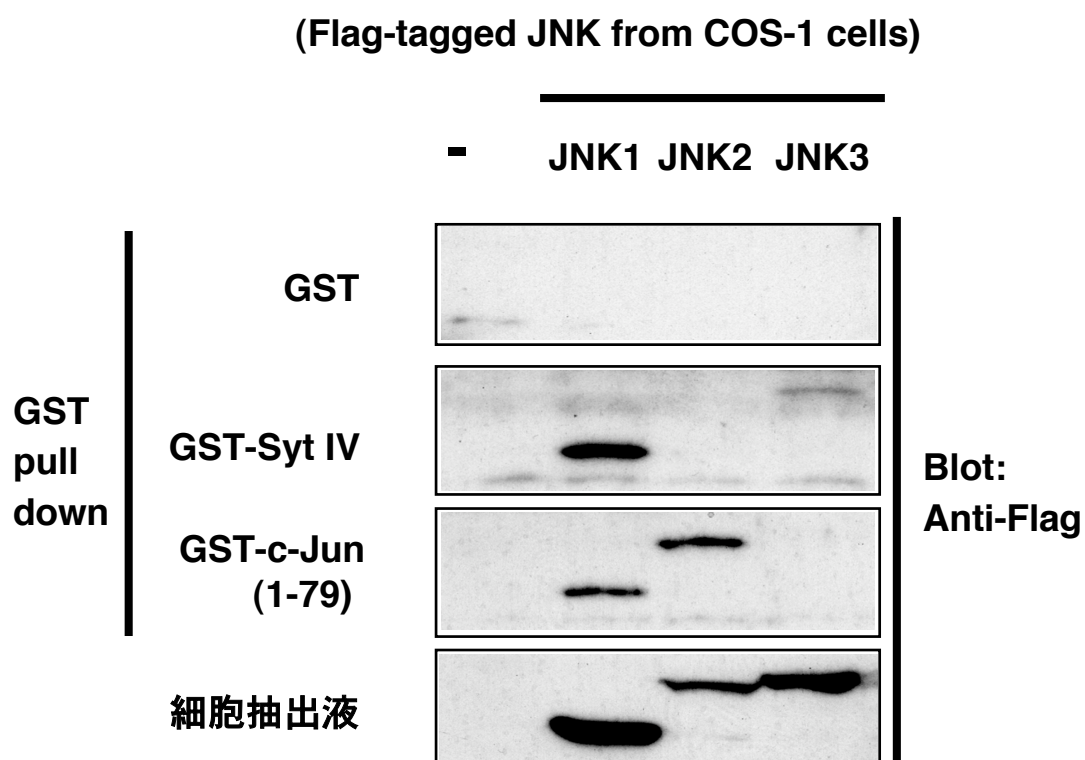
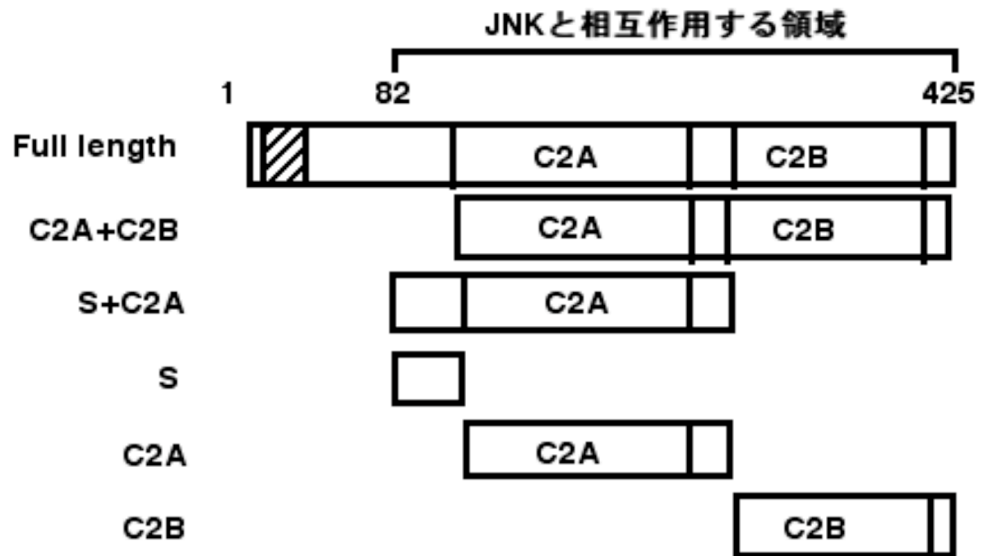


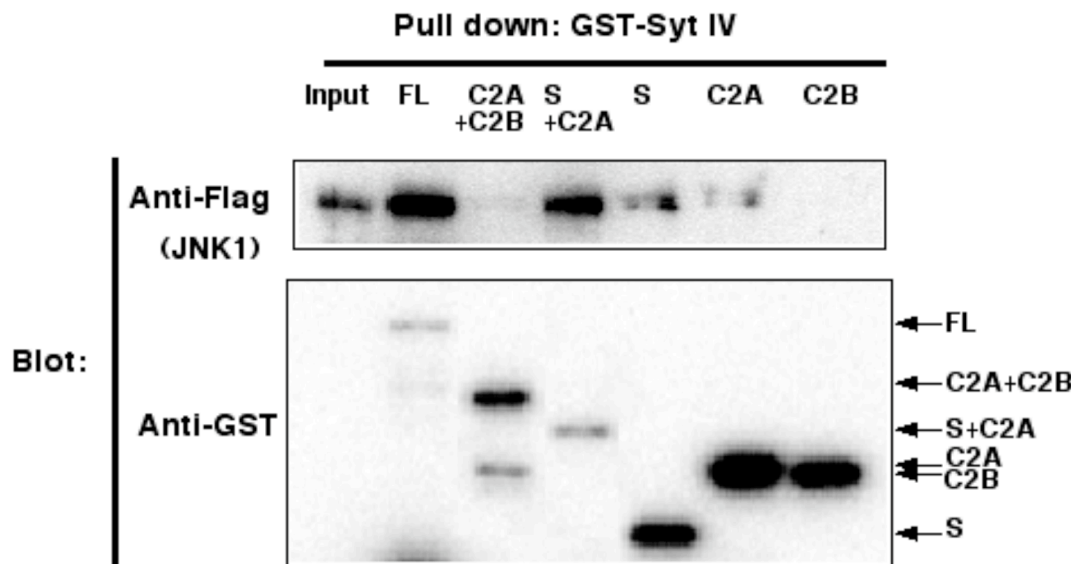
Fig.11 JNKとSyt IVのin vitroでの結合

(A) COS-1細胞にFlagタグ付きのJNKを発現させ、その細胞抽出液と組み替えGST-Syt IVもしくはGST-c-Jun (1-79)を混合しグルタチオンセファロースで沈降しGST-Sytn IVもしくはGST-c-Jun (1-79)と結合してくるJNK1, JN2, JNK3をイムノブロットにより検出した。

B



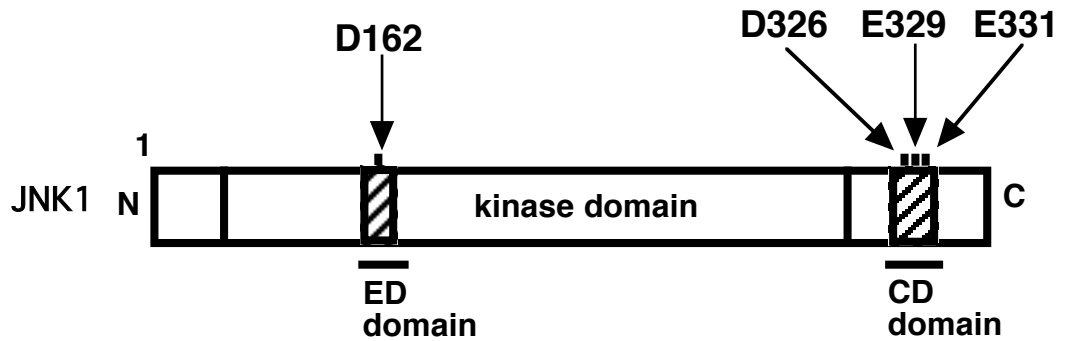
C



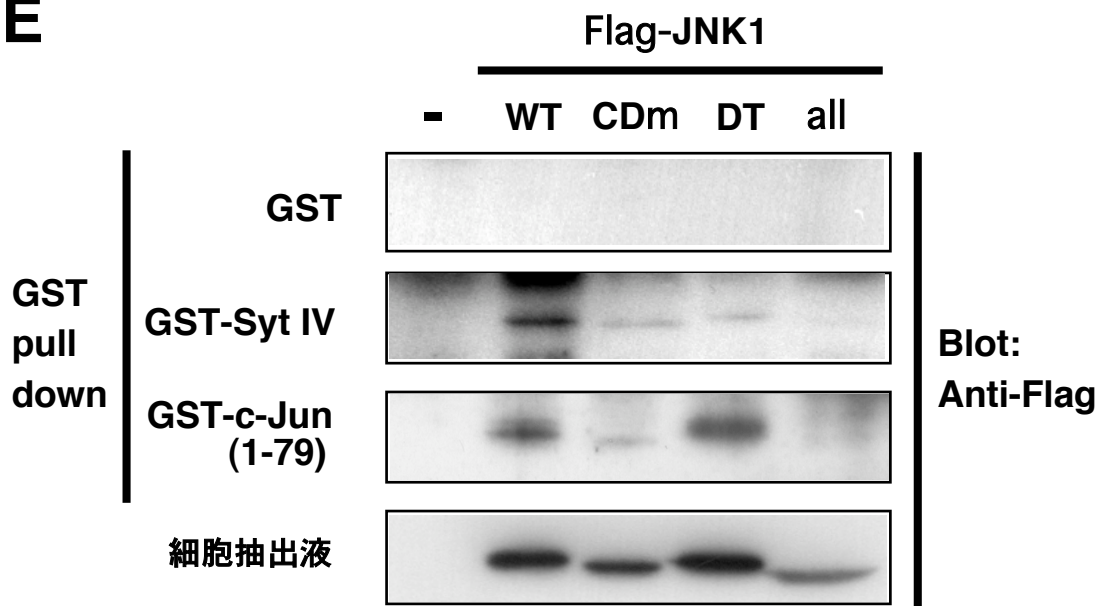
(B) GST-Syt IVの各種欠損体の構造模式図

(C) COS-1細胞にFlagタグ付きのJNKを発現させ、その細胞抽出液と組み替えGST-Syt IVの各種欠損体を混合しグルタチオンセファロースで沈降しGST-Syt IVの各種欠損体と結合してくるJNK1, JN2, JNK3をイムノブロットにより検出した。

D



E



(D) JNK1の構造模式図

(E) COS-1細胞の細胞抽出液と組み替えGST-Syt IVもしくはGST-c-Jun (1-79)を混合しグルタチオンセファロースで沈降しGST-Syt IVもしくはGST-c-Jun (1-79)と結合してくるJNK1の各種変異体をイムノプロットにより検出した。

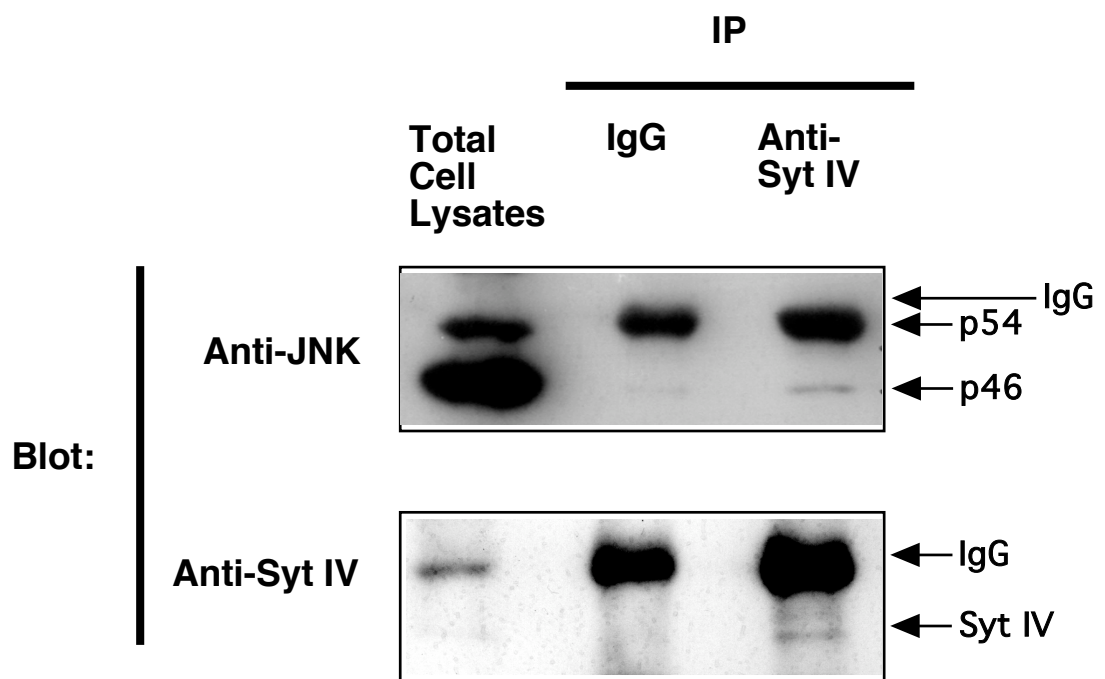


Fig.12 PC12細胞内における内在性のJNKとSyt IVの結合

PC12細胞抽出液に抗Syt IV抗体で免疫沈降し、共沈してくるJNKをJNK抗体によるイムノプロットで検出した。

A

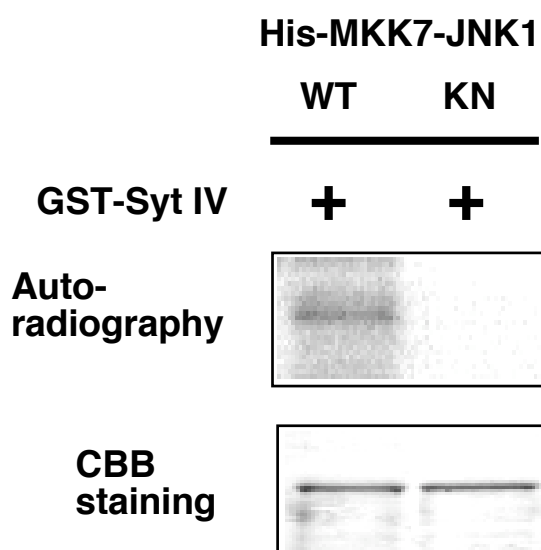
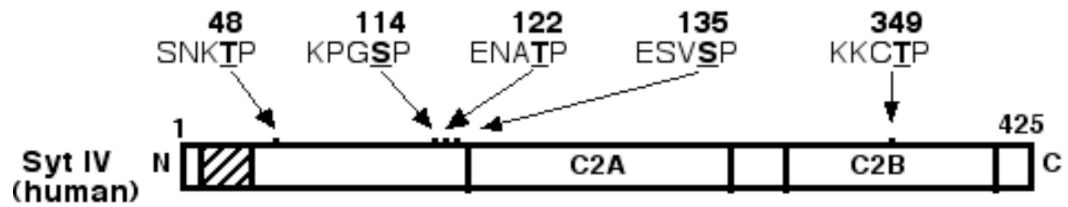


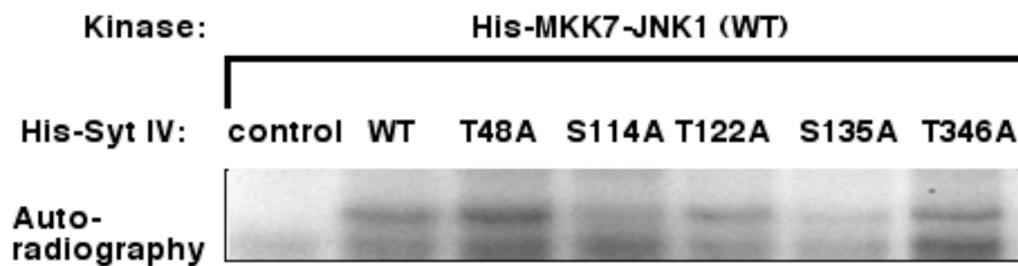
Fig.13 In vitroでのJNKによるSyt IVのリン酸化

(A) 組み替え体GST-Syt IVと組み替え体His-MKK7-JNK1でリン酸化反応を行い、リン酸化されたGST-Syt IVをオートラジオグラフィーを用いて検出した。

B



C



D

		114	122	135
human Syt IV	KPGSP	SDLENATP	PKLFLEGEKESV	SPES
mouse Syt IV	KAGSSSD	LENVT	PKLFTETEKEAN	SPES
rat Syt IV	KAGSSSD	LENVT	PKLFPETEKEAV	SPES

(B) JNKによるSyt IVのリン酸化候補部位。

(C) 組み換え体His-Syt IVと組み換え体His-MKK7-JNK1でリン酸化反応を行い、リン酸化されたHis-Syt IVをオートラジオグラフィーを用いて検出した。

(D) ヒト、マウス、ラットSyt IVでのアミノ酸配列の比較

A

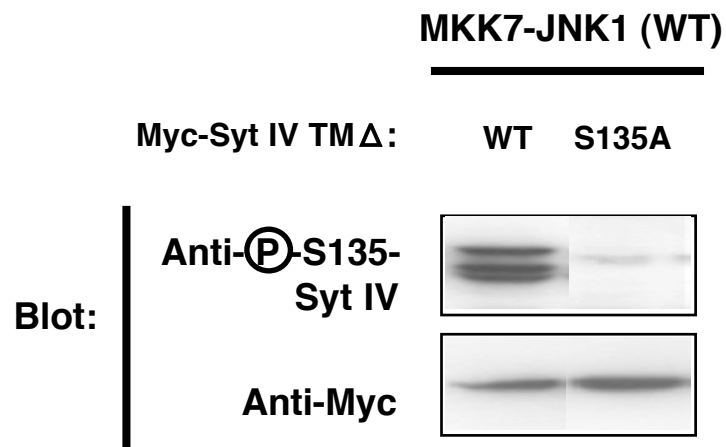
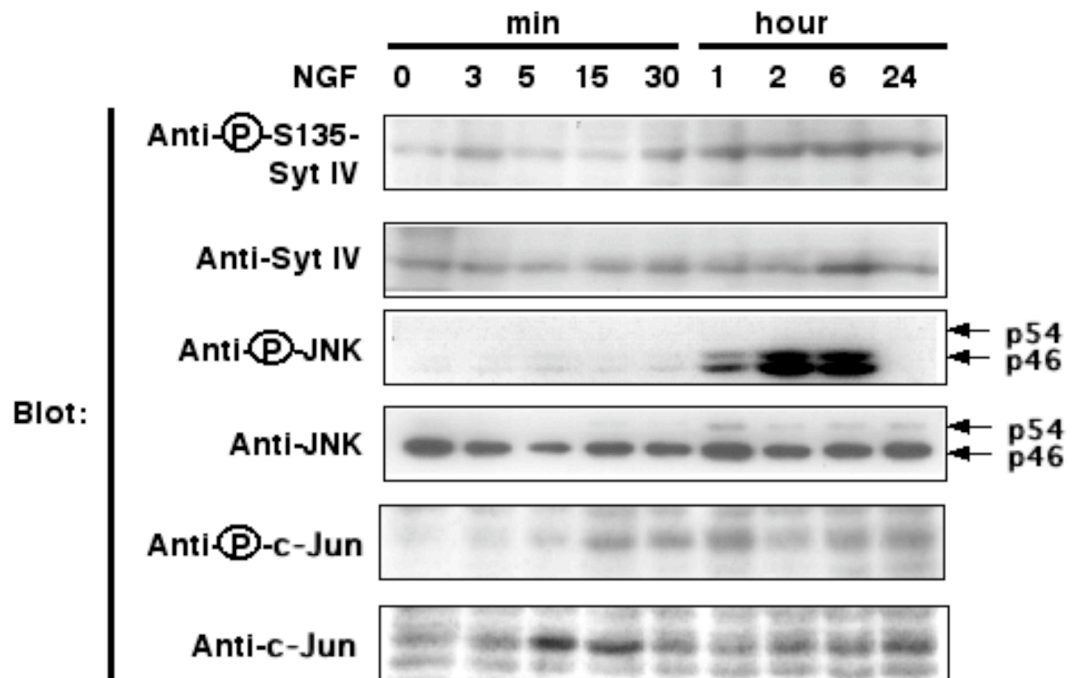


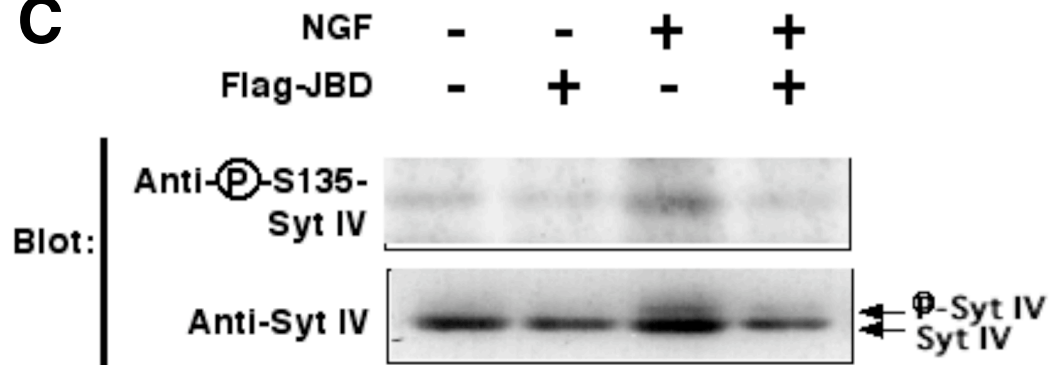
Fig.14 Syt IV Ser135 の細胞内でのリン酸化

(A) COS-1細胞に活性型JNKとMyc-Syt IV TMΔ（膜貫通領域欠損型）の野生型もしくはS135A変異体を発現させ、リン酸化されたSyt IVを抗リン酸化Syt IV抗体を用いたイムノブロットにより検出した。

B



C



(B) PC12細胞にNGFを経時的に刺激し、リン酸化されたSyt IV, JNKおよびc-Junを抗リン酸化Syt IV抗体, 抗リン酸化JNK抗体もしくは抗リン酸化c-Jun抗体を用いたイムノブロットにより検出した。

(C) PC12細胞にJBDを発現させNGFで2時間刺激した後にリン酸化されたSyt IVを抗リン酸化Syt IV抗体を用いたイムノブロットにより検出した。

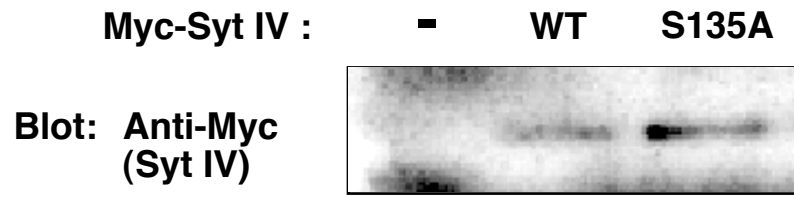
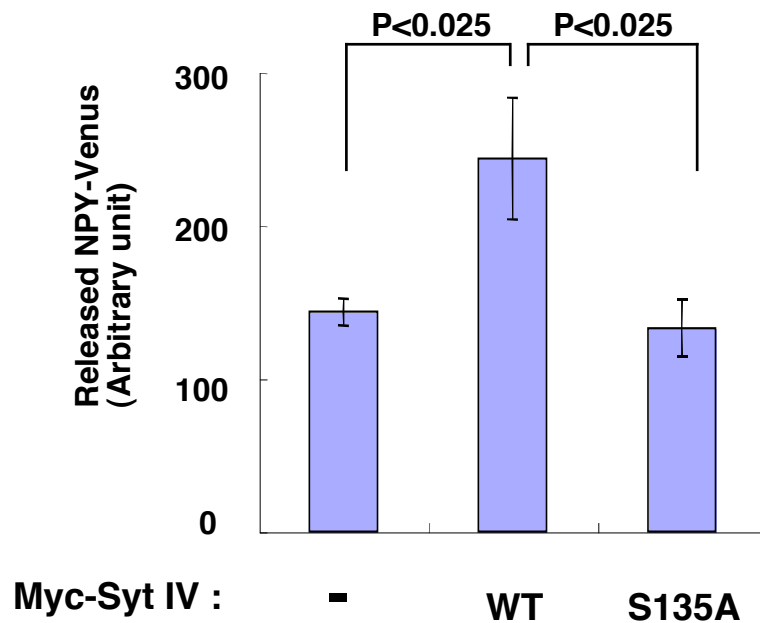
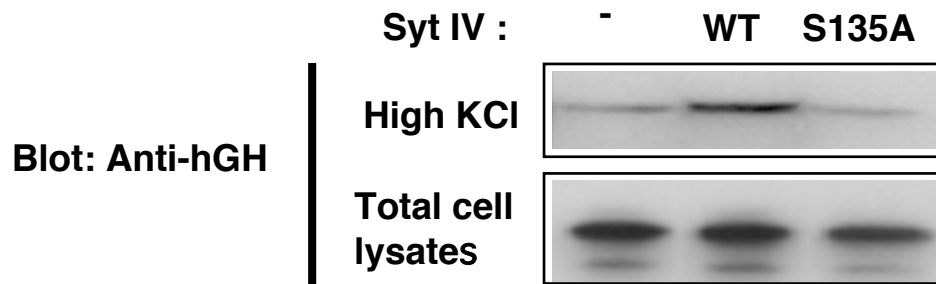
A**B**

Fig.15 Syt IVのSer135依存的な開口放出の促進

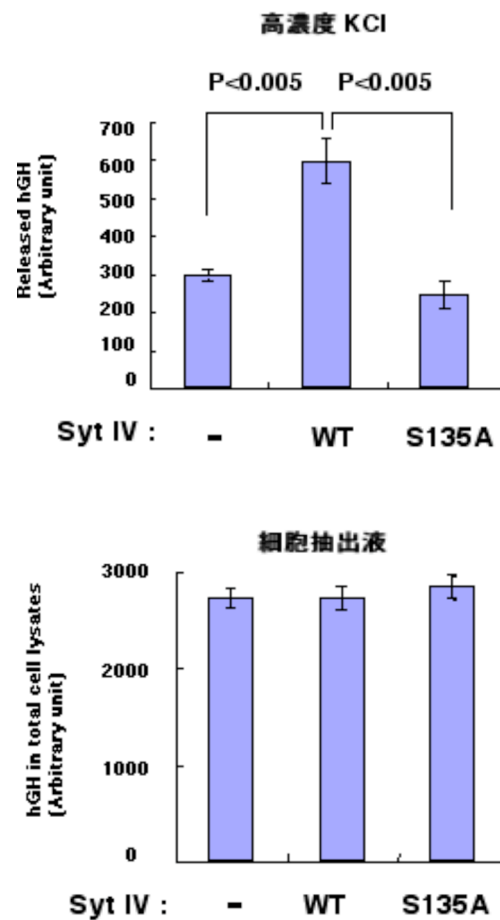
(A) PC12:NPY-Venus細胞にMyc-Syt IVの野生型もしくはS135A変異体を発現させ、発現しているMyc-Syt IVを抗Myc抗体を用いたイムノブロットにより検出した。

(B) PC12:NPY-Venus細胞にMyc-Syt IVの野生型もしくはS135A変異体を発現させ、高濃度KClを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるNPY-Venusの量を定量した。

C



D



(C) PC12細胞にヒト成長ホルモンあるいはSyt IVの野生型もしくはS135A変異体を発現するプラスミドを同時に導入して、高濃度KClを含む培地で3分培養した後に培地中に放出されるヒト成長ホルモンの量をイムノブロットにより検出した。

(D) Fig.15Cの実験を3回行い、得られた結果を定量化した。

A

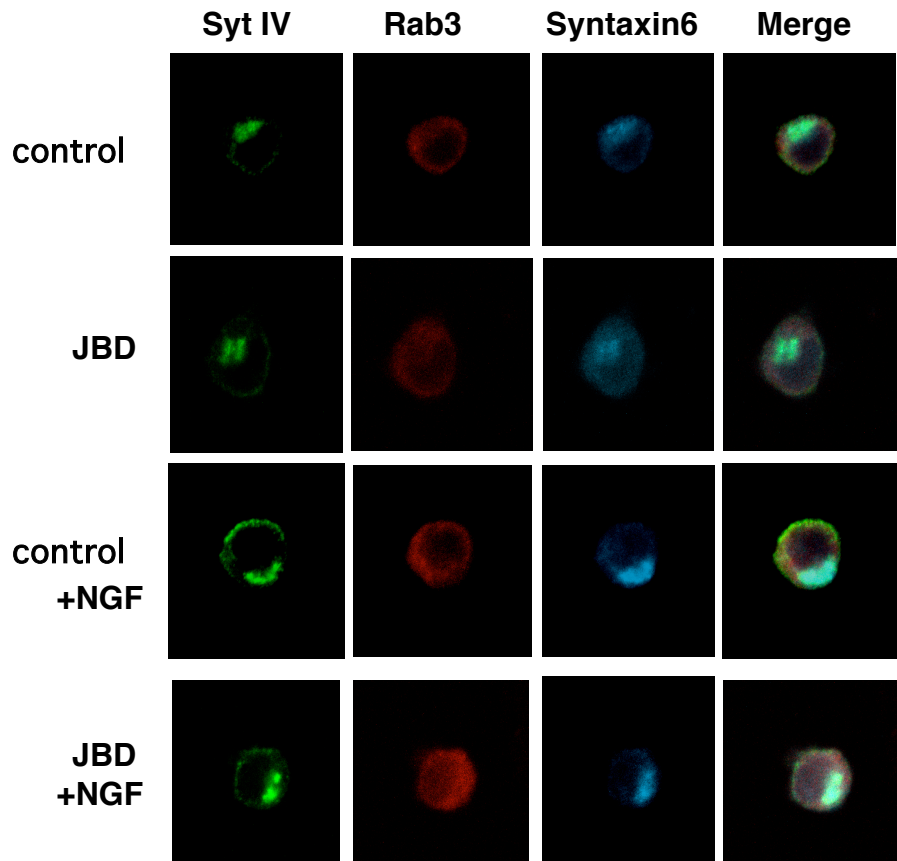
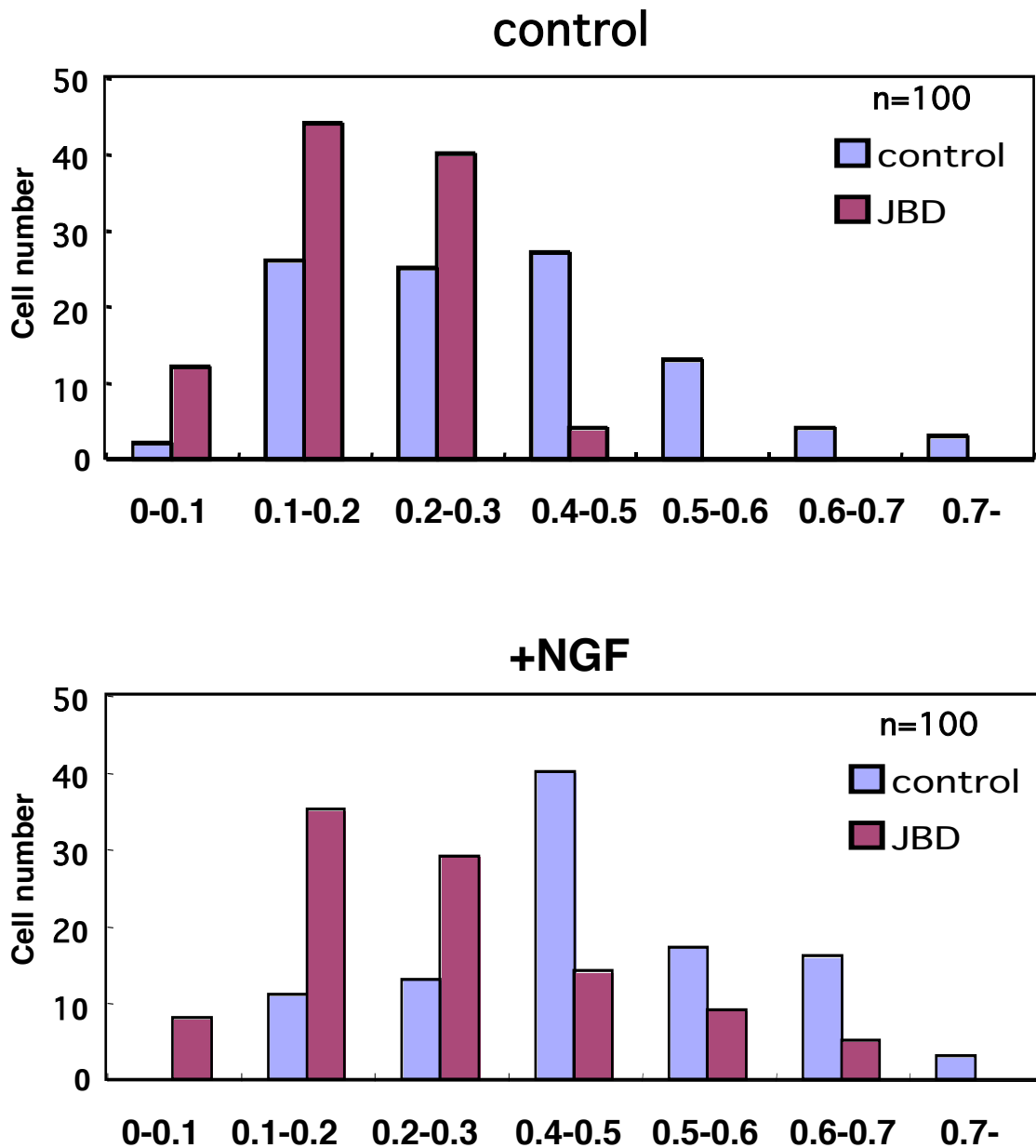


Fig.16 NGF依存的なSyt IVの局在移行におけるJNKの必要性

(A) PC12細胞にJBDを発現させてNGFで6時間刺激した後に、抗 Syt IV抗体、成熟小胞のマーカーとして抗Rab3抗体、未成熟小胞およびゴルジ体のマーカーとして抗Syntaxin6抗体を用いて細胞染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて代表的な蛍光画像を撮影した。

B

(B) 共焦点レーザー顕微鏡で細胞膜近傍（成熟小胞）に存在する Syt IVの蛍光強度を測定し、この数値を細胞全体に存在するSyt IVの蛍光強度の数値（細胞膜近傍のSyt IVの蛍光強度とゴルジ体のSyt IVの蛍光強度を加えた値）で割った値を細胞ごとに算出した。なお、各サンプルとも細胞100個の結果を示した、

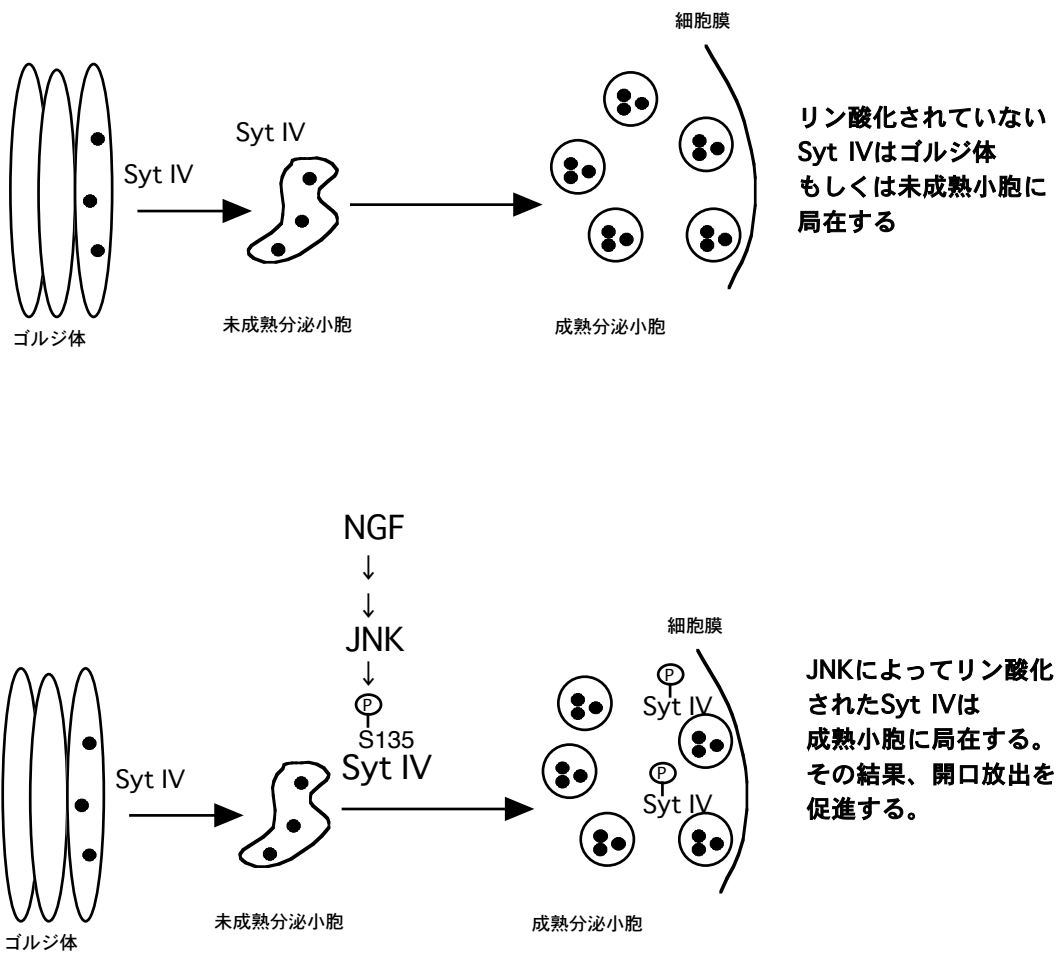


Fig.17 JNKによりリン酸化されたSyt IVの意義に関する作業仮説

考察

[JNK経路の開口放出への関与について]

これまでの実験からPC12細胞においてJNKが開口放出の促進に重要な役割を果たし、またJNKが開口放出に関与するSyt IVをターゲットにしていることが示された。JNK経路は今回明らかになった開口放出への関与以外にもストレス応答によるアポトーシス、運動性の上昇、発生への関与などが報告されており同一の経路でありながら多様な働きがある(Huang et al., 2003; Kuan et al., 1999; Tournier et al., 2000)。それではなぜ同一の経路が多様な機能を制御できるのだろうか？。ほ乳類のJNKにはJNK1, JNK2, JNK3の3種類があり、さらにJNK1とJNK2には $\alpha 1$, $\beta 1$ (46KDa)と $\alpha 2$, $\beta 2$ (55KDa) の4つのスプライシングアイソフォームが存在し、JNK3には $\alpha 1$ (48KDa)と $\alpha 2$ (57KDa)の2つのスプライシングアイソフォームが存在する(Gupta et al., 1996)。JNK1, JNK2, JNK3の3種類では機能が異なることが知られている。今回の実験からSyt IVはJNK1, JNK3と強く結合し、一方JNK2との結合は弱いことが示された(Fig.11)。よって開口放出の促進に関与しているJNKは主にJNK1もしくはJNK3である可能性が考えられる。また今回の実験からPC12細胞においてNGF刺激によりリン酸化されるJNKはp46, p54の2つのスプライシングアイソフォームのうちC末端が一部欠損したp46のみであることが判明した(Fig.5C)。アニソマイシンおよび紫外線照射といったストレス刺激ではp46とp54のどちらのアイソフォームもリン酸化されることが知られている。よってNGFのような開口放出を促進する刺激とストレス刺激では活性化されるJNKのスプライシングアイソフォームが異なる可能性が考えられる。

[神経機能へのJNK-Syt IV 経路の関与について]

今回、開口放出のモデル系として用いられているPC12細胞を用いた解析からJNK経路が開口放出に関与していることが明らかになった。PC12細胞は神経細胞と同様に外胚葉由来の副腎随質細胞より得られた細胞株で、カルシウム依存的な開口放出により大型有芯小胞から神経ペプチドやホルモンが放出されることが知られている。この機構は神経終末におけるシナプス小胞からの神経伝達物質の放出機構との共通点が多い。よって今回得られた結果から神経終末におけるシナプス小胞からの神経伝達物質の放出にもJNK経路が関与することが期待される。しかし大型有芯小胞とシナプス小胞では小胞膜と細胞膜の融合が起こる際のカルシウム濃度が異なることや、小胞存在しているタンパク質が部分的に異なることが知られている。またシナプス小胞にSyt IVが存在するかどうかは議論がわかれている。よって今後、神経終末からの神経伝達物質放出にもJNK経路が関与するかどうかについては検討する必要がある。

最近Syt IVは神経細胞の軸索以外にも樹上突起に多く局在することが大脳切片の電子顕微鏡による観察から明らかになっている(Ibata et al., 2002)。またSyt IVはアストロサイトにも存在しグルタミン酸の放出を促進していることが示されている(Zhang et al., 2004)。さらにショウジョウバエの系においてSyt IVは軸索ではなく樹上突起に存在していることから、ショウジョウバエでのSyt IVの働きとしてポストシナプスからプレシナプス形成を促すリガンドの分泌に関与するのではないかと推測されている(Yoshihara et al., 2003)。よってJNK経路は神経終末のシナプス小胞からの神経伝達物質放出ではなく、ポストシナプスおよびアストロサイトからの開口放出機構に関与している可能性も考えられる。

Syt IVのノックアウトマウスでは運動能力および学習機能に異常がみられる

ことが報告されている(Ferguson et al., 2000)。これまでにJNK経路が運動および学習に関与するという報告はないがJNKは脳などの神経系にも発現していることからJNKがこれらの機能に関与する可能性は考えられる。

一方線虫の系でJNK経路は神経機能に関与することが報告されているが(Byrd et al., 2001; Kawasaki et al., 1999)、このときJNKはどのような基質をターゲットにしているかはわかっていない。線虫にもSyt IVのホモログ分子は存在していることから、線虫でもJNKはSyt IVをターゲットにしている可能性がある。

[Syt IVのリン酸化による活性化機構について]

今回の結果からJNKはSyt IVによってリン酸化され、かつNGF依存的な成熟小胞への局在移行にJNKが必要であることが明らかになった。このことからSyt IVはリン酸化依存的に未成熟小胞から成熟小胞へと局在を移行させている可能性が示唆された (Fig.16)。それではSyt IVを含む小胞ではどのようなメカニズムで開口放出が促進されているのだろうか？開口放出を制御する過程には小胞膜と細胞膜の移動もしくは接着 (Docking) もしくはPrimingの過程の促進による放出可能プールの増加を制御する過程と、小胞膜と細胞膜の融合 (Fusion) を制御する過程の2種類が存在していることが知られている。これまで Synaptotagminは小胞膜と細胞膜の融合に関係することが知られていることから、Syt IVを含む小胞では小胞膜と細胞膜の融合過程が促進されている可能性が考えられる。最近Syt IVを過剰発現させたインシュリン分泌細胞では小胞膜と細胞膜の融合している時間がより長くなっていることがエバネッセント顕微鏡による解析から示されている(Tsuboi and Rutter, 2003)。このことから NGF-JNK経路はSyt IVを介して小胞膜と細胞膜の融合時間を制御することによ

り開口放出の促進に関与している可能性がある。そこで今後エバネッセント顕微鏡を用いてNGF-JNK経路が小胞膜と細胞膜の融合の過程に関与するか、またSyt IVの過剰発現による小胞膜と細胞膜の融合の過程の促進にSer135が関与するのか検討したい。

今回の結果からSyt IVの活性化機構に局在の変化に関与している可能性が示唆されたが、これ以外の活性化機構も考えられる。Syt IVの機能にはカルシウム依存的なリン脂質およびタンパク質との相互作用が知られている(Fukuda et al., 1996; Thomas et al., 1999)。今回JNKによるリン酸化部位として同定されたSer135はカルシウム依存的にリン脂質であるフォスファチジルセリンおよびSyntaxinと相互作用するC2A領域に近い部位に存在する。よってSer135のリン酸化によりこれらの結合に影響がある可能性も考えられ今後検討する予定である。

[Syt IVの機能について]

Syt IVの機能についてはSynaptotagmin Iと異なり、開口放出を促進するという報告と抑制するという相反する報告が出されており意見が対立している。今回の実験でPC12細胞においてSyt IVの過剰発現によって開口放出が促進され、かつNGFによる開口放出の促進がSyt IVのsiRNAを導入した場合では起こらなかったことが明らかになった (Fig.10, Fig.15)。これらの結果はSyt IVの機能が開口放出を促進する方向に働くという仮説を支持している。ただし、NGF刺激をしていない状態でSyt IVをノックダウンしておいても開口放出はほとんど減少しなかった(Fig.10)。よってPC12細胞においてSyt IVはNGF刺激によるカルシウム流入依存的な開口放出を促進する過程に関与していると考えられる。

Synaptotagminには少なくともほ乳類では13種類のアイソフォームが存在している。Syt IVと80%以上の相同性がある分子にSynaptotagmin XIが報告されており、Syt IVのSer135に相当する部分は保存されている(von Poser et al., 1997)。よってSynaptotagmin XIについてもJNKもしくは他のMAPキナーゼファミリーによってリン酸化される可能性が考えられる。一方Synaptotagmin Iにはリン酸化モチーフは保存されていないことから基質にはならないのではないかと推測している。

結言

今後の予定としてまずリン酸化されたSyt IVがいかなるメカニズムで開口放出に関与しているか検討したい。リン酸化されたSyt IVの活性化機構に今回の結果から示唆された局在の変化、もしくはリン脂質または他のタンパク質との結合能の変化が考えられる。局在の変化に関しては野生型Syt IVとSyt IV Ser135Aで局在に違いが生じるか検討する予定である。またリン脂質との結合能に関してはin vitroの系でSyt IVのリン酸化によって変化が生じるか検討したい。Syntaxinおよびその他のSNARE複合体との結合能に関しても違いがあるか検討したい。それに加えて今後エバネッセント顕微鏡を用いてNGF-JNK経路が小胞膜と細胞膜との融合過程に関与するか、またSyt IVの過剰発現による小胞膜と細胞膜の融合の過程の促進にSer135が関与するのか調べる必要がある。さらにNGFによるSyt IVの成熟小胞への局在移行にJNKが必要かを電子顕微鏡による観察により明らかにしたい。

第二章. A2Aアデノシン受容体による開口放出の制御機構について

緒言

アデノシンは神経、筋肉、胎盤、マスト細胞などの様々な細胞の機能を制御するリガンドとして機能することが知られている(Daval et al., 1991)。アデノシンは、分泌小胞内に神経伝達物質などの他の分泌物と共に蓄積されているATPに由来する (Fig. 1)。ATPは他の分泌物と共に細胞外に放出された後に、細胞外の酵素によってアデノシンに変換される。細胞外のアデノシンは自己もしくは他の細胞のアデノシン受容体と結合することにより下流にシグナルが伝わる(Daval et al., 1991)。アデノシン受容体にはA1, A2A, A2B, A3の少なくとも4つの遺伝子が存在する。これらの受容体はいずれも7回膜貫通型Gタンパク質結合受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) に分類されており、細胞内のcAMP、phospholipase Cおよび細胞内カルシウムの濃度を制御することが知られている(Klinger et al., 2002; Olah and Stiles, 1995)。A2Aアデノシン受容体は脳内において線条体もしくは嗅結節などに強く発現しそれ以外の領域でも少し発現している。またA2Aアデノシン受容体は神経以外の筋肉、胎盤、マスト細胞にも発現していることが報告されている(Rosin et al., 1998)。大脳の線条体では、A2Aアデノシン受容体はD2ドーパミン受容体とGABA作動性ニューロンにおいて共局在していることが報告されている(Ferre et al., 1993)。

生体におけるA2Aアデノシン受容体の役割に関しては、ノックアウトマウスの解析によりいくつかの知見が得られている。A2Aアデノシン受容体をノックアウトしたマウスでは運動性の減少（個体の水平維持の欠如）、攻撃性の上昇、急性痛刺激による応答性の減少、血圧および心拍数の増加、血小板の凝集

の減少、体重の増加、炎症への過敏反応が見られることが報告されている (Ledent et al., 1997; Ohta and Sitkovsky, 2001)。またパーキンソン病を引き起こす薬剤MPTPを投与して運動異常を起こしているマウスにA2Aアデノシン受容体のアンタゴニストを投与すると運動異常が回復することから、A2Aアデノシン受容体が神経疾患に関与していることが示されている (Kobayashi and Millhorn, 1999; Richardson et al., 1997; Sebastiao and Ribeiro, 1996)。さらにA2Aアデノシン受容体を特異的に活性化させるアゴニストを投与したマウスでは睡眠時間が増加することから、A2Aアデノシン受容体が睡眠行動に関与していることが報告されている (Scammell et al., 2001)。

このようにA2Aアデノシン受容体は生体の機能に重要な役割を果たすことが知られているが、A2Aアデノシン受容体の細胞内での機能はほとんど解明されていない。しかし最近A2Aアデノシン受容体の活性化が海馬などにおいてGABA、セロトニン、グルタミン酸などの様々な神経伝達物質の放出を促進することが示唆されている (Cunha and Ribeiro, 2000a; Cunha and Ribeiro, 2000b; Marchi et al., 2002; Okada et al., 2001; Sebastiao and Ribeiro, 2000)。またパーキンソン病治療薬KW-6002はA2Aアデノシン受容体のアンタゴニストとして働き、パーキンソン病の患者で起こっている線条体ニューロンからのGABAの過剰放出が抑制されることが報告されている (Fig. 2) (Mori and Shindou, 2003)。これらの知見からA2Aアデノシン受容体の下流ではカルシウム依存的な開口放出を促進する経路が存在すると考えられる。

PC12細胞にはA2Aアデノシン受容体が発現しており、A2Aアデノシン受容体を活性化させると3量体Gタンパク質 (Gs) を介したcAMPの上昇によるPKAの活性化、PKCの活性化及びRasを介したMAPキナーゼの活性化が起こることが報告されている (Fig. 3) (Arslan and Fredholm, 2000; Chern et al.,

1995; Huang et al., 2001; Lai et al., 1997; Schulte and Fredholm, 2003; Seidel et al., 1999)。これまでPC12細胞においてNGFの刺激によるカルシウム依存的な開口放出の促進にはMAPキナーゼ、PI3キナーゼが関与することが報告されている(Amino et al., 2002)。しかし、PC12細胞においてA2Aアデノシン受容体がカルシウム依存的な開口放出の促進に関与するか、また促進するならばどのような経路が関与しているかは明らかになっていない。

本研究ではPC12細胞を用いてカルシウム流入依存的なNPY-Venusの放出量を測定した結果、A2Aアデノシン受容体の活性化によりカルシウム流入依存的な開口放出が促進されることが明らかになった。またA2Aアデノシン受容体の下流ではPKA経路とPI3キナーゼ-Akt経路が協調して開口放出に関与することが判明した。さらにA2Aアデノシン受容体の活性化により、NPY-Venusを含む小胞が細胞膜近傍に局在移行することが明らかになった。

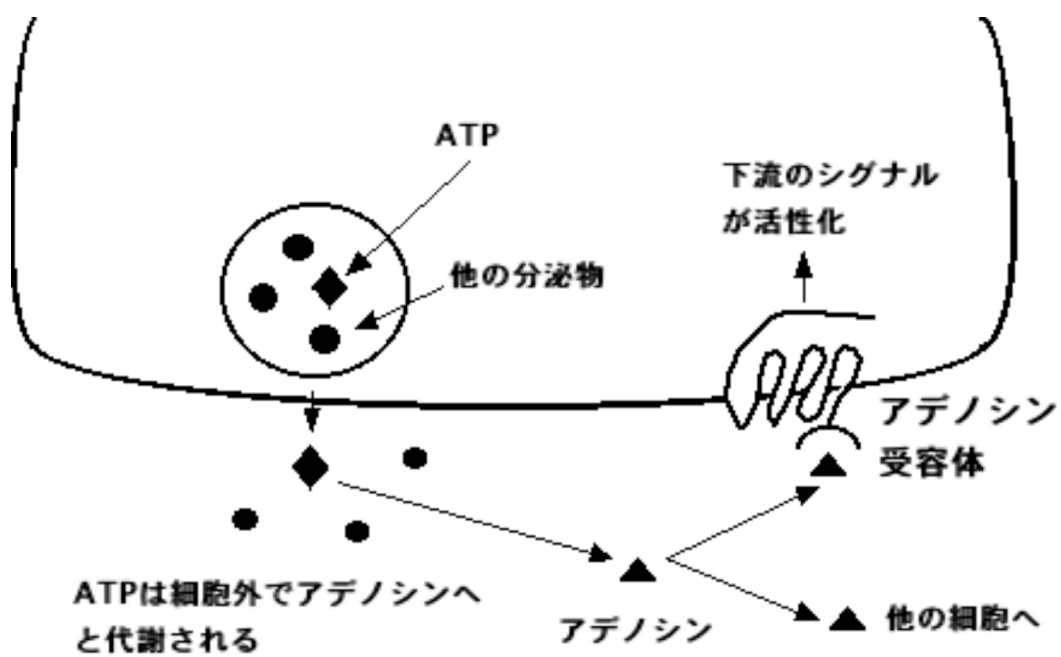


Fig.1 リガンドとして働くアデノシンの由来

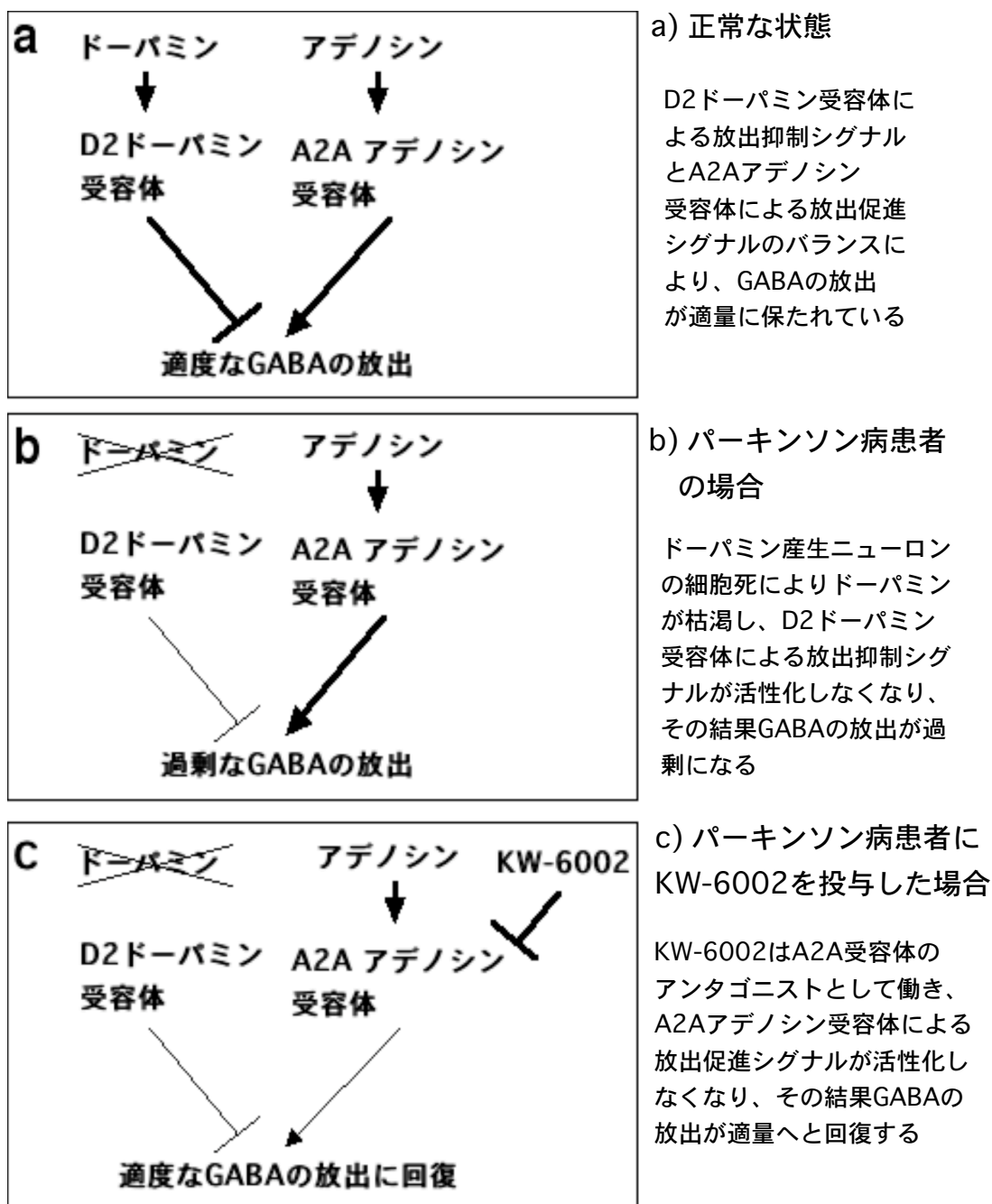


Fig.2 線条体GABA作動性ニューロンでのGABAの放出制御機構

a)正常な状態 b)パーキンソン病患者の場合 c)パーキンソン病患者にKW-6002を投与させた場合でのA2Aアデノシン受容体とD2ドーパミン受容体によるGABAの放出制御機構について記載した。

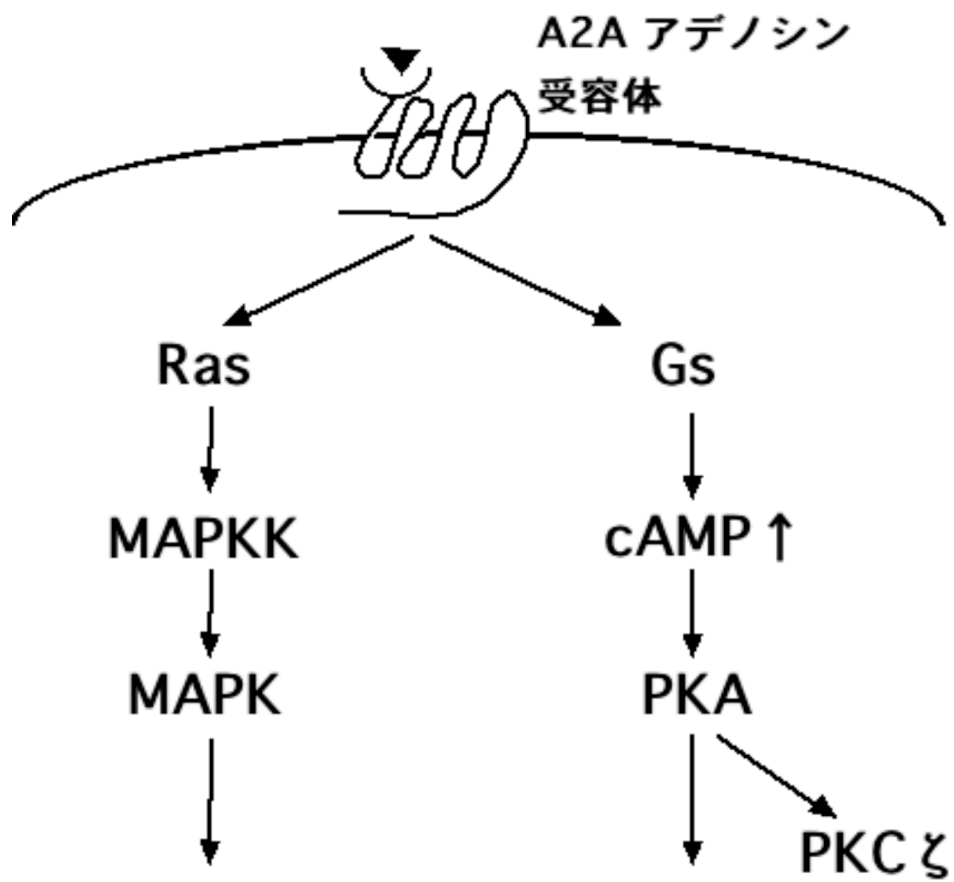


Fig.3 PC12細胞においてこれまで報告されているA2A
アデノシン受容体により活性化する細胞内シグナル分子

方法

材料

SP600125はBioMolより、KT5720, LY294002, U0126, SB202190はCalbiochemより、CGS21680はSigmaより購入した。PC12細胞はDulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) に10% Fetal Bovine serum (FBS) と5% Horse Serum (HS) を加えた培地を用いて5%CO₂存在下の37℃の条件下で培養した。

抗体

抗リン酸化JNK抗体、抗リン酸化p38抗体、抗リン酸化AKT抗体、抗リン酸化ATF-2抗体、抗リン酸化CREB抗体、抗Akt抗体、抗CREB抗体はCell Signalingより、抗リン酸化MAPK抗体はPromegaより、抗ヒト成長ホルモン抗体はDAKOより、抗GAPDH 抗体はChemiconより入手した。

プラスミド

ニューロペプチドYと改変型GFPであるVenusの融合タンパク質をほ乳類細胞で発現するプラスミド (pEF-BOS NPY-Venus) は宮脇 博士 より頂いた (Nagai et al., 2002)。ヒト成長ホルモン発現プラスミド (pCDNA3-hGH) は HGH-TGES 100T KitをNicholes Instituteより購入し付属のヒト成長ホルモンのcDNAをpCDNA3 (invitrogen) の *Bam* HIと *Eco* RI部位に導入して作成した。優性抑制型のAkt (DN-Akt) はLys179, Thr308, Ser473をAlaに置換してpCS2+の *Bam* HI部位に導入したものを用いた (Masuyama et al., 2001)。protein kinase inhibitor (PKI) の発現プラスミドはM. Greenberg 博士 より

頂いた。

イムノブロット法

細胞をPBSで洗浄後、可溶化バッファー [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM β -glycerophosphate, 5 mM EGTA, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 mM NaF, 1 mM NaVO_3 , 1 mM dithiothreitol, 0.5% Triton X-100 + protease inhibitor (1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)]で細胞を破碎し細胞破碎液とした。細胞破碎液を遠心し (20000g, 4°C, 20分) 上清を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離しPolyvinylidene Fluoride(PVDF) 膜 (Millipore) に転写した。0.3%スキムミルクを含むTBSバッファーで1時間インキュベーションしてブロッキングした後、一次抗体を含む0.3%スキムミルク/TBSバッファー中に4°Cで終夜反応させ、0.05%Tween-20を含むTBSバッファーで3回洗浄したのちhorse radish peroxidaseを結合した二次抗体を含む0.3%スキムミルク/TBSバッファー中に室温で1時間反応させた。最後にTBS-T Bufferで3回洗浄したあと発色反応をおこなった。発色にはWestern Blot Chemiluminescence 試薬 (PerkinElmer) を用いて行いX線フィルムを用いて検出した。

カルシウム流入依存的に放出されたNPY-Venusの測定

培地中に放出されたNPY-Venusの検出は以下の方法で行った。

PC12:NPY-Venus細胞を6 wellのplateあたり 3×10^5 cellsまき48時間培養した。その後培地中のフェノールレッドはNPY-Venusの蛍光を阻害するためDME培地からフェノールレッドを含まないDME培地 (10%FBS, 5%HS) に

置換した。次に高濃度 KCl 培地 (85 mM NaCl, 60 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES (pH7.4), 11 mM Glucose)、もしくは低濃度 KCl 培地 (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES (pH7.4), 11 mM Glucose) 220 μl に置換し、3分, 37°Cで培養した。その後に培養上清を200 μl 回収してELISA-PLATE (Sumilon) に入れ、Venusの蛍光を SPECTRAmax Gemini (Molecular Devices) で励起波長507、検出波長537で検出した。この実験は3回おこないグラフにはmean \pm SDを記載した。

カルシウム流入依存的に放出されたヒト成長ホルモンの測定

培地中に放出されたヒト成長ホルモンの検出は以下の方法で行った。PC12細胞を6wellのplateあたり 3×10^5 cellsまき、24時間培養後3 μg の pCDNA3-hGHおよび0.5 μg の他の発現プラスミドをLipofectamine2000を用いて導入した。72時間後に細胞を低濃度 KCl 培地で洗浄後、高濃度 KCl 培地もしくは低濃度 KCl 培地を220 μl 加えて3分, 37°Cで培養した。その後高濃度 KCl 培地を加えたサンプルは培養後上清をを200 μl 回収し、低濃度 KCl 培地を加えたサンプルは上清を除いた後200 μl の細胞破碎液を加えた。回収した高濃度 KCl 培地および細胞抽出液をSDSサンプル処理後に抗ヒト成長ホルモン抗体によるイムノプロットにより検出した。イムノプロットで検出された発光はATTO Cool Saver (Atto) で検出し、得られた発光強度は ATTO CS analyzer software (ver 1.0) (Atto) を用いて定量した。この実験は3回おこないグラフにはmean \pm SDを記載した。

乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) の活性測定

培地中に放出されるLDHの活性は LDH Cyototoxicity detection Kit (Takara) を用いて検出した。

NPY-Venusの観察

NPY-Venusを含む分泌小胞の観察は以下の方法で行った。PC12:NPY-Venus細胞をポリリジンコートした35 mmガラスボトムディッシュにまき48時間培養した。1 μ M CGS21680で刺激後、蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Zeiss) を用いて観察した。NPY-Venusを含む小胞の局在を定量的に調べるためにLSM5 Image Browserを用いてNPY-Venusの蛍光強度を測定した。

結果

2-1 PC12細胞におけるA2Aアデノシン受容体によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進

まず、A2Aアデノシン受容体の活性化がカルシウム流入依存的な開口放出を促進するか検討した。実験材料にはNPY-Venusが安定的に発現しているPC12細胞 (PC12:NPY-Venus)を、A2Aアデノシン受容体を活性化させる刺激にはA2Aアデノシン受容体の特異的なアゴニストであるCGS21680を用いた (Fig.4 A)。実験の結果、PC12:NPY-Venusに1 μ M CGS21680を15分刺激すると高濃度KClによる開口放出は約4倍促進されることが判明した (Fig.4 B)。このとき高濃度KClの塩濃度の条件で細胞が破碎していないことは、細胞質に存在する乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) が培地中に漏出していないことで確認した (Fig. 4B)。CGS21680の量依存性を調べたところ量依存的に開口放出が促進されることが示された ($EC_{50} \approx 0.005$ mM) (Fig. 4C)。さらにCGS21680による開口放出を刺激の時間を変化させて行った結果、刺激後10-15分で放出のピーク (刺激なしに比べて約4倍) となり、その後減少していくことが明らかになった (Fig. 4D)。これらの結果からA2Aアデノシン受容体はPC12細胞においてカルシウム流入依存的な開口放出を促進することが示された。

2-2 A2Aアデノシン受容体の下流で活性化するシグナル分子

次にPC12細胞においてA2Aアデノシン受容体の下流でどのようなシグナル分子が活性化しているか検討した。その結果、これまで報告されているMAPキナーゼファミリーであるERK1のリン酸化に加え、他のMAPキナーゼファミ

リーであるJNK、p38もリン酸化されていることが判明した (Fig. 5)。また、PI3キナーゼの下流で活性化されるAKTのリン酸化も観察された。これらのリン酸化は刺激後10-15分をピークにいずれもその後が減少していくことが明らかになった (Fig. 5)。またこれらのキナーゼの下流でリン酸化されるCREBのSer133 (PKA、AKT、およびMAPKの下流にあるRskによってリン酸化されることが知られている) およびATF-2のThr71 (JNK, p38によってリン酸化されることが知られている) も同様に10-15分でリン酸化がピークになりその後減少していることが明らかになった (Fig. 5)。

2-3 A2Aアデノシン受容体によるPKAとPI3-kinaseを介した開口放出の制御

次にこれらのキナーゼのうちどれがA2Aアデノシン受容体によるカルシウム流入依存的な開口放出を促進するのに関与しているのかを検討した。まずキナーゼ阻害剤をあらかじめ加えて30分培養した後、CGS21680で15分刺激してカルシウム流入依存的に培地中に放出されるNPY-Venusの量を定量した (Fig. 4A)。その結果、MEK阻害剤U0126、JNK阻害剤SP600125、p38阻害剤SB202190、PKA阻害剤KT5720、PI3キナーゼ阻害剤LY294002を単独で加えた場合ではほとんどCGS21680によるカルシウム流入依存的な開口放出を抑制しなかった。しかしPKA阻害剤KT5720 (1 μ M) とPI3キナーゼ阻害剤LY294002 (20 μ M) を共に加えたときにはCGS21680の刺激による開口放出が部分的に (31.68% \pm 5.6%) 減少することが判明した (n=3, $P < 0.005$, Student's t-test) (Fig. 6A)。

この時加えたキナーゼ阻害剤の濃度でPKAもしくはPI3キナーゼが阻害できるかどうかをリン酸化抗体によるイムノブロットにより検討した。その結果10 μ Mもしくは100 μ MのLY294002を加えた場合ではリン酸化AKTの割合が減少

していた (Fig. 6B)。またKT5720を単独で加えた場合はCREBのリン酸化に変化はなかったが、10 μ M LY294002と共に1 mMもしくは10 μ MのKT5720を加えた場合ではリン酸化CREBの割合は減少していた (Fig. 6B)。従って、Fig 6Aで用いたキナーゼ阻害剤の濃度で内在性のPKAとAKTは抑制されていることが示唆された。以上よりPKA経路とPI3キナーゼ(-AKT)経路がA2Aアデノシン受容体の活性化によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進に参与している可能性が示唆された。

この可能性をさらに検討するために、PKAと直接結合することにより下流へのシグナルを抑制するPKI (protein kinase inhibitor) および優性抑制型のAKT (dominant-negative AKT: DN-AKT) を用いて検討した。ヒト成長ホルモンの発現プラスミドと共にPKI 発現プラスミドもしくはDN-AKTの発現プラスミドを導入し、カルシウム流入依存的に培地中に放出されたヒト成長ホルモンの量をイムノブロットにより検出した。その結果PKI 発現プラスミドもしくはDN-AKT発現プラスミドを単独で導入した場合ではほとんど開口放出は抑制されなかった。しかし、PKI 発現プラスミドとDN-AKT発現プラスミドを共に導入した場合にはヒト成長ホルモンの放出量が部分的に ($31.4\% \pm 9.7\%$) 減少していることが判明した ($n=3$, $P<0.025$, Student's t-test) (Fig. 6C)。またそれぞれのサンプル間で導入されたヒト成長ホルモンの量は一定であることを、細胞破碎液によるイムノブロットで確認した。以上の結果から、A2Aアデノシン受容体によって活性化されるPKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路が協調的にカルシウム流入依存的な開口放出の促進に貢献していることが明らかになった。

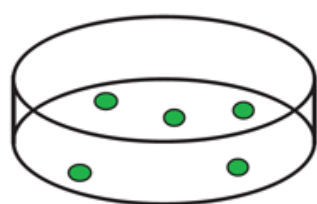
2-4 A2Aアデノシン受容体の活性化によるNPY-Venusの局在移行

次にA2Aアデノシン受容体がどのようなメカニズムで開口放出を促進しているのか検討した。A2Aアデノシン受容体が開口放出を促進する可能性の一つとして、A2Aアデノシン受容体の活性化によってNPY-Venusを含む小胞がより細胞膜近傍に集まり即時放出可能プール (Readily releasable pool) が増加している可能性が考えられる。そこで共焦点レーザー顕微鏡を用いてCGS21680で刺激をしてからのNPY-Venusを含む小胞の局在の変化を経時的に観察した。その結果CGS21680の刺激をしていない細胞ではNPY-Venusを含む小胞は主に細胞質に存在しているが、刺激後10分から15分ではNPY-Venusを含む小胞がより細胞膜近傍に局在している様子が観察された (Fig. 7A, B)。この様子を刺激前および刺激後の細胞質および細胞膜近傍のNPY-Venusの蛍光量を測定し定量的に解析した。その結果CGS21680の刺激をした細胞では刺激前の細胞に比べて有為にNPY-Venusを含む小胞が細胞膜近傍に局在していることが明らかになった ($n=12$, $P<0.0005$, Student's t-test) (Fig. 7C)。NPY-Venusを含む小胞の細胞膜近傍への移行は一過的であり、CGS21680処理後約30分頃から細胞膜近傍から消失している様子が観察された (Fig. 7A)。先ほどの実験結果からA2Aアデノシン受容体の活性化によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進にPKA経路およびPI3キナーゼ-Akt経路が必要であることが示されている。そこでA2Aアデノシン受容体の活性化によるNPY-Venusを含む小胞の膜移行にPKA経路およびPI3キナーゼ-Akt経路が関与する可能性について検討を行った。あらかじめPKA阻害剤KT5720およびPI3キナーゼ阻害剤LY294002を共に加えた場合でのCGS21680の刺激によるNPY-Venusを含む小胞の局在を観察した。その結果、これらのキナーゼ阻害剤を共に加えてもCGS21680の刺激によりNPY-Venusを含む小胞はキナーゼ阻害剤を加えない時と同様に細胞膜近傍に移行する様子が観察された (Fig. 7D)。従ってA2Aアデノシン受容体

の活性化による分泌小胞の局在移行にPKA経路およびPI3キナーゼ-AKT経路は関与しない可能性が示唆された。

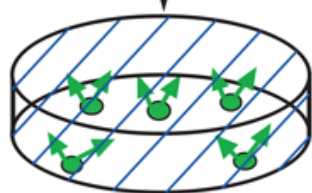
A

NPY-Venus-expressing PC12 cells



↓ ± Kinase inhibitors (30 min)

↓ ± CGS21680 (15 min)



Replacement of the medium
with a 60 mM KCl-containing solution
to induce depolarization

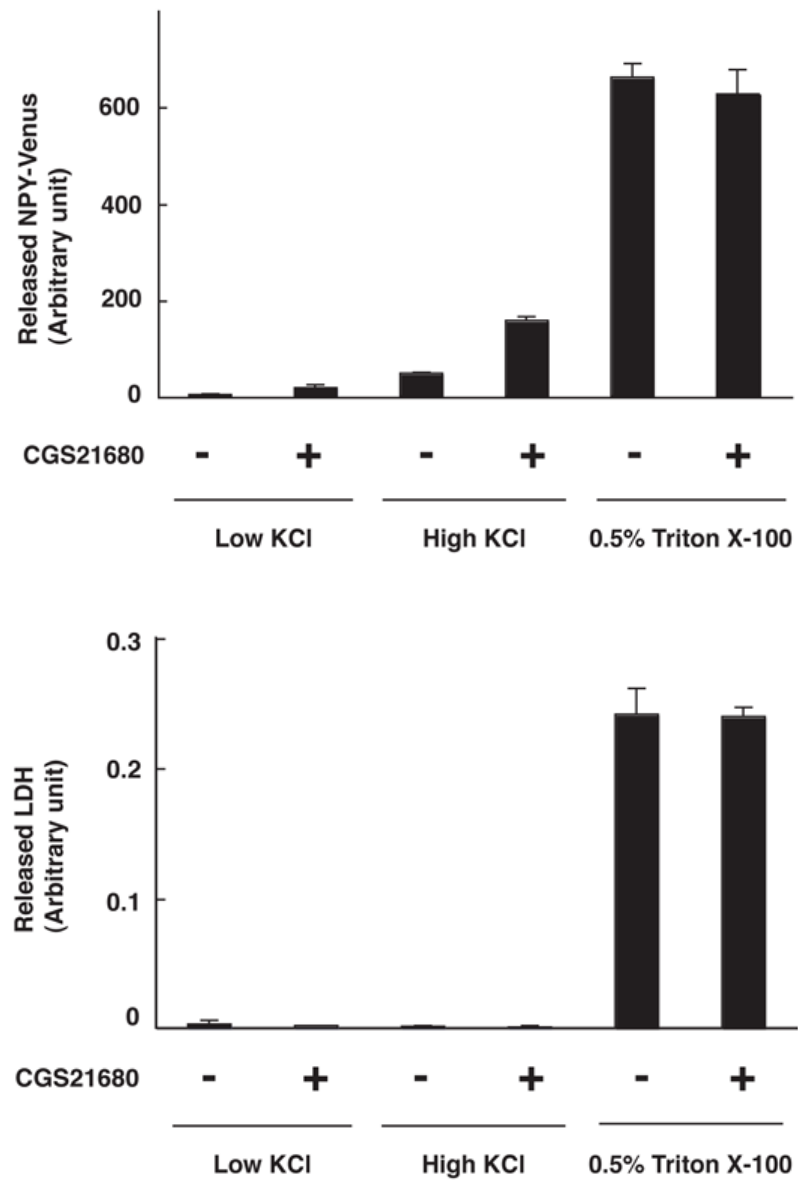
↓ (3 min)

Detection of secreted NPY-Venus
by fluorescence intensity in the medium

Fig.4 A2Aアデノシン受容体アゴニストCGS21680はカルシウム流入依存的なNPY-Venusの放出を促進する

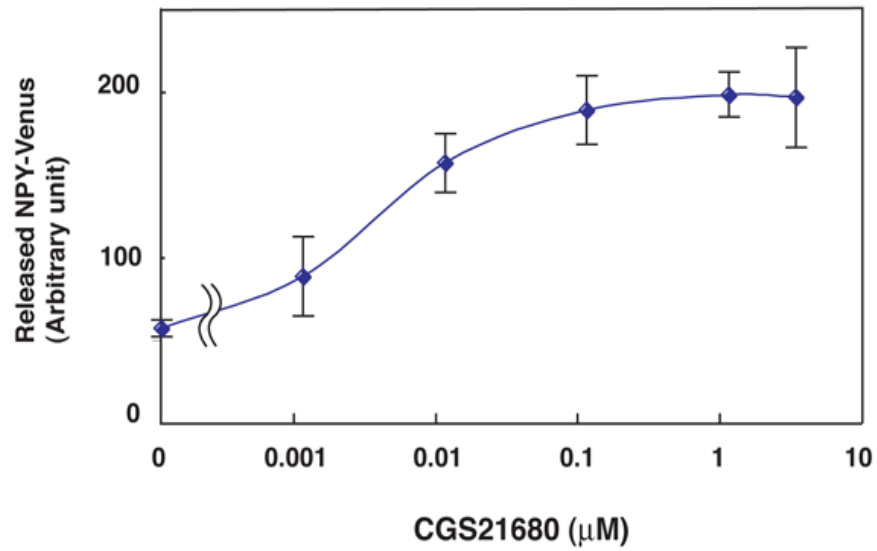
(A) PC12:NPY-Venus細胞を用いたカルシウム流入依存的な開口放出の測定方法

B

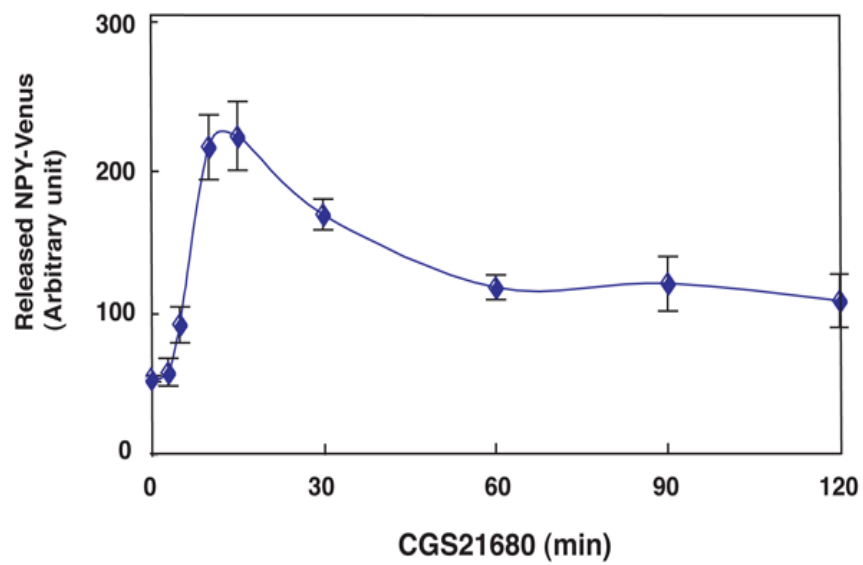


(B) PC12:NPY-Venus細胞に1 μ M CGS21680で15分刺激した後、4.7 mM KClを含む培地 (Low KCl 培地)、60 mM KClを含む培地 (High KCl 培地)、0.5% Triton X-100を含む培地を加え、培地中に放出された NPY-Venusを蛍光強度を測定することにより検出した。同時に培地中に漏出したLDHも測定した。

C



D



(C) PC12:NPY-Venus細胞に様々な濃度のCGS21680で15分刺激した後、High KCl 培地を加え培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

(D) PC12:NPY-Venus細胞に1 μM CGS21680で様々な時間刺激した後、High KCl 培地を加え培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

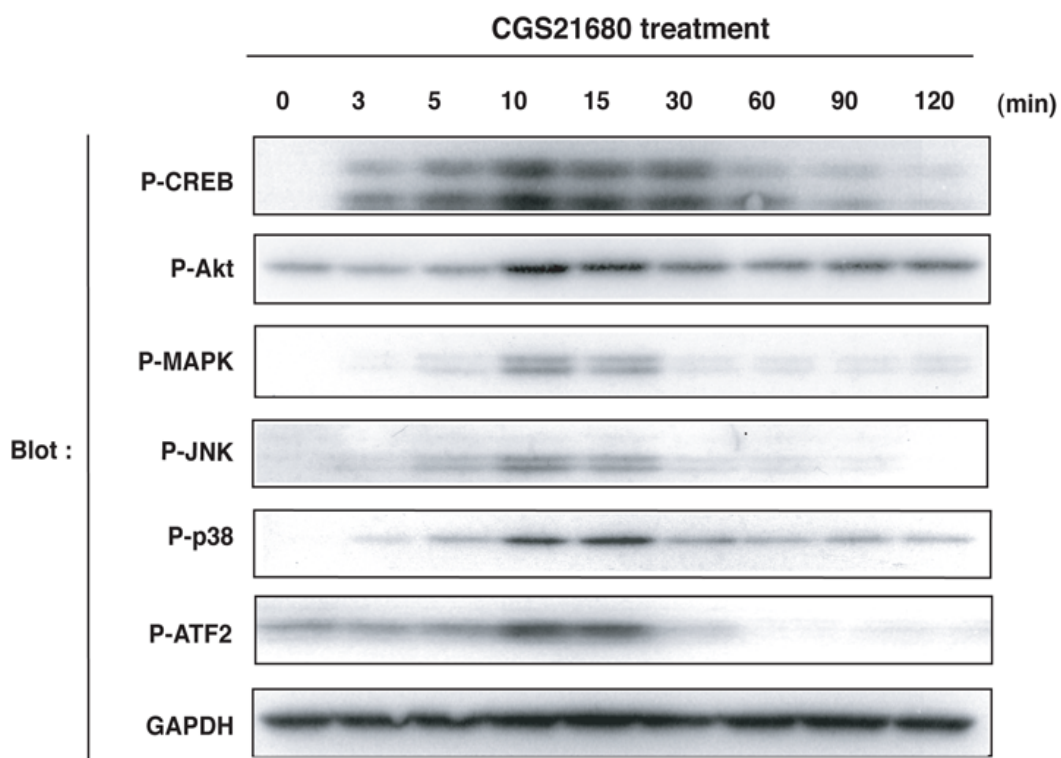


Fig.5 PC12細胞においてCGS21680の刺激により様々なシグナル分子がリン酸化される

PC12:NPY-Venus細胞に1 μ M CGS21680で15分刺激した後に、CREB, Akt, MAPK, JNK, p38, ATF-2のリン酸化をイムノブロットにより検出した。GAPDHはローディングコントロールとして用いた。

A

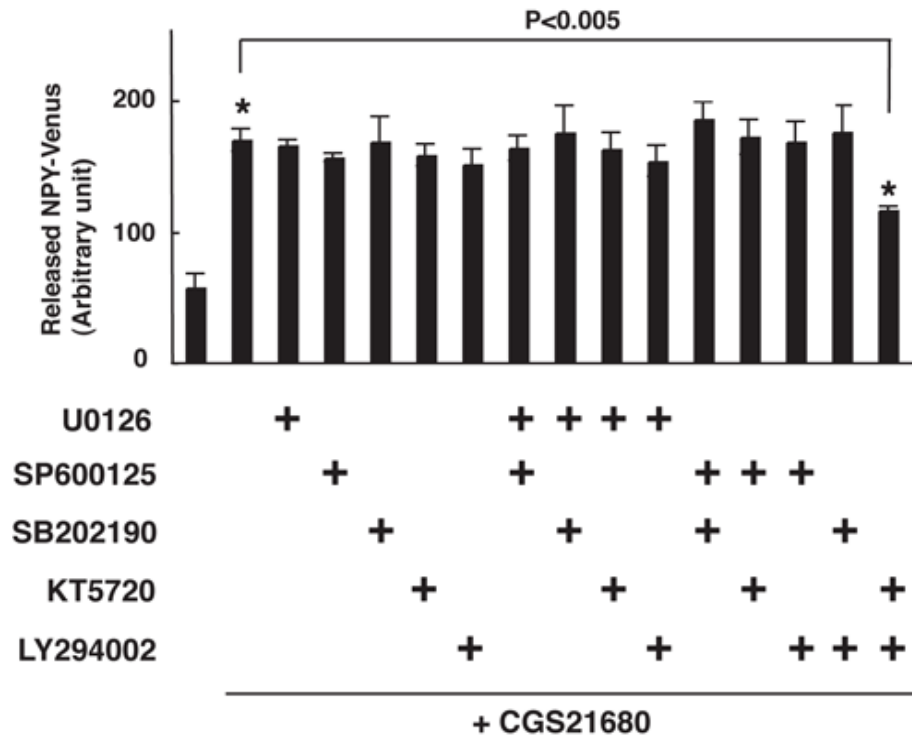
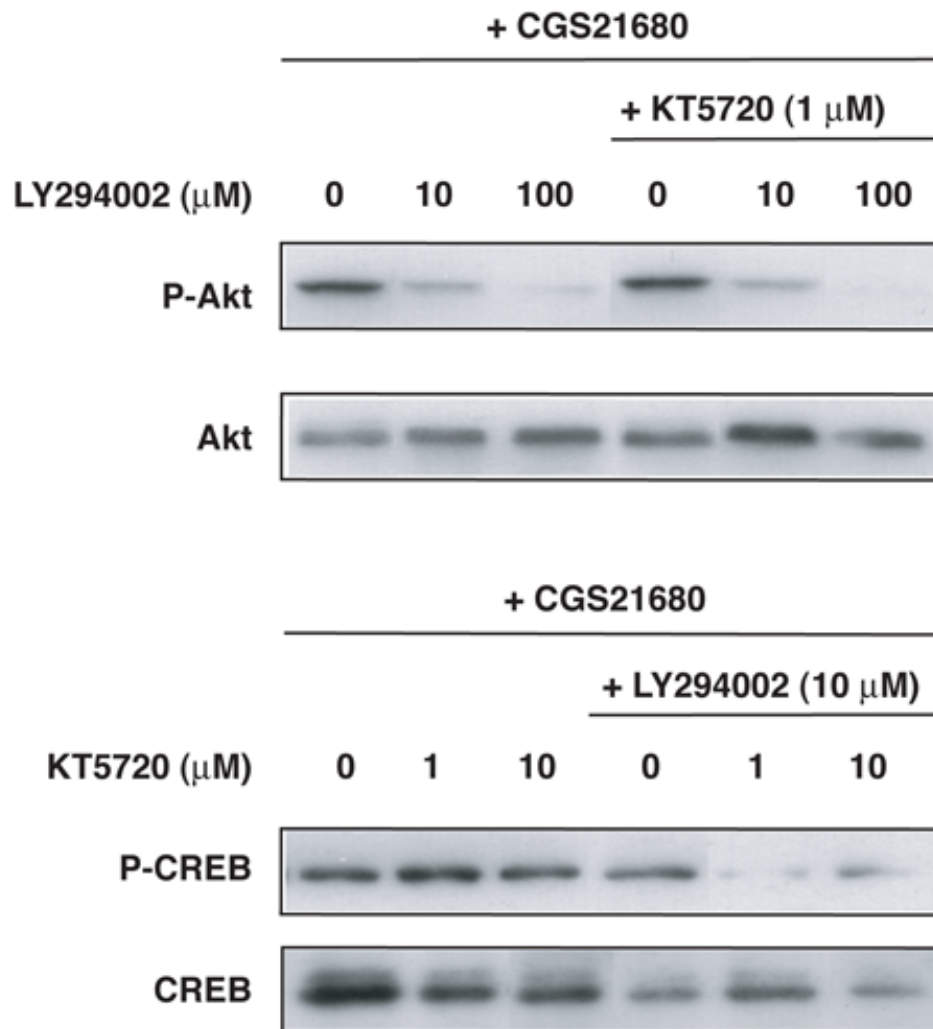


Fig.6 PC12細胞においてCGS21680の刺激によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進にはPKA経路とPI3キナーゼ-Akt経路が必要である。

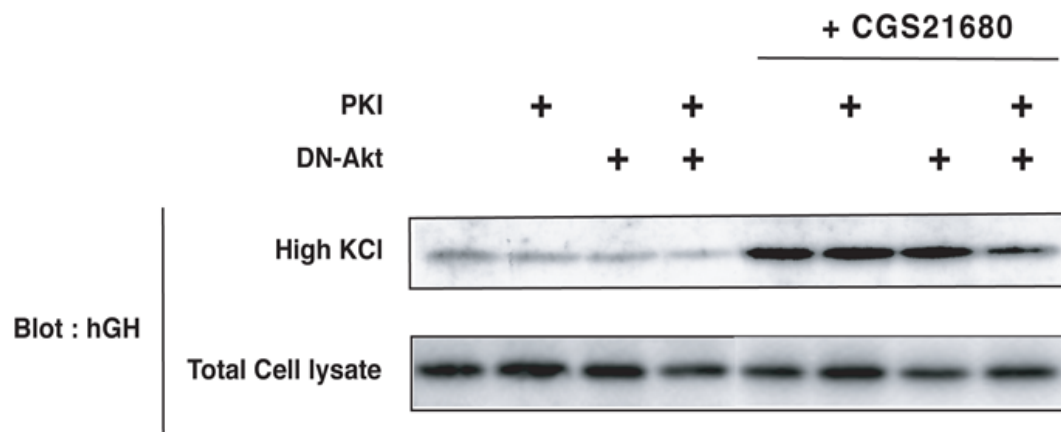
(A) PC12:NPY-Venus細胞に10 μ M U0126 (MEK1阻害剤)、20 μ M SP600125 (JNK阻害剤)、10 μ M SB202190 (p38阻害剤)、1 μ M KT5720 (PKA阻害剤)、20 μ M LY294002 (PI3キナーゼ阻害剤)で30分処理した後に1 μ M CGS21680で15分刺激し、その後High KCl 培地を加え培地中に放出されるNPY-Venusの量を測定した。

B



(B) PC12:NPY-Venus細胞に様々な濃度のKT5720 (PKA阻害剤)、LY294002 (PI3キナーゼ阻害剤) で30分処理した後に1 μM CGS21680で15分刺激し、その後CREB, Aktのリン酸化をイムノブロットにより検出した。

C



(C) PC12細胞にヒト成長ホルモン (human growth hormone :hGH) と Protein kinase inhibitor (PKI) もしくは優性抑制型Akt (dominant-negative Akt: DN-Akt) の発現プラスミドを導入し、72時間後1 μ M CGS21680で15分刺激し、その後High KCl 培地を加え培地中に放出されるhGHの量をイムノブロットにより検出した。

A

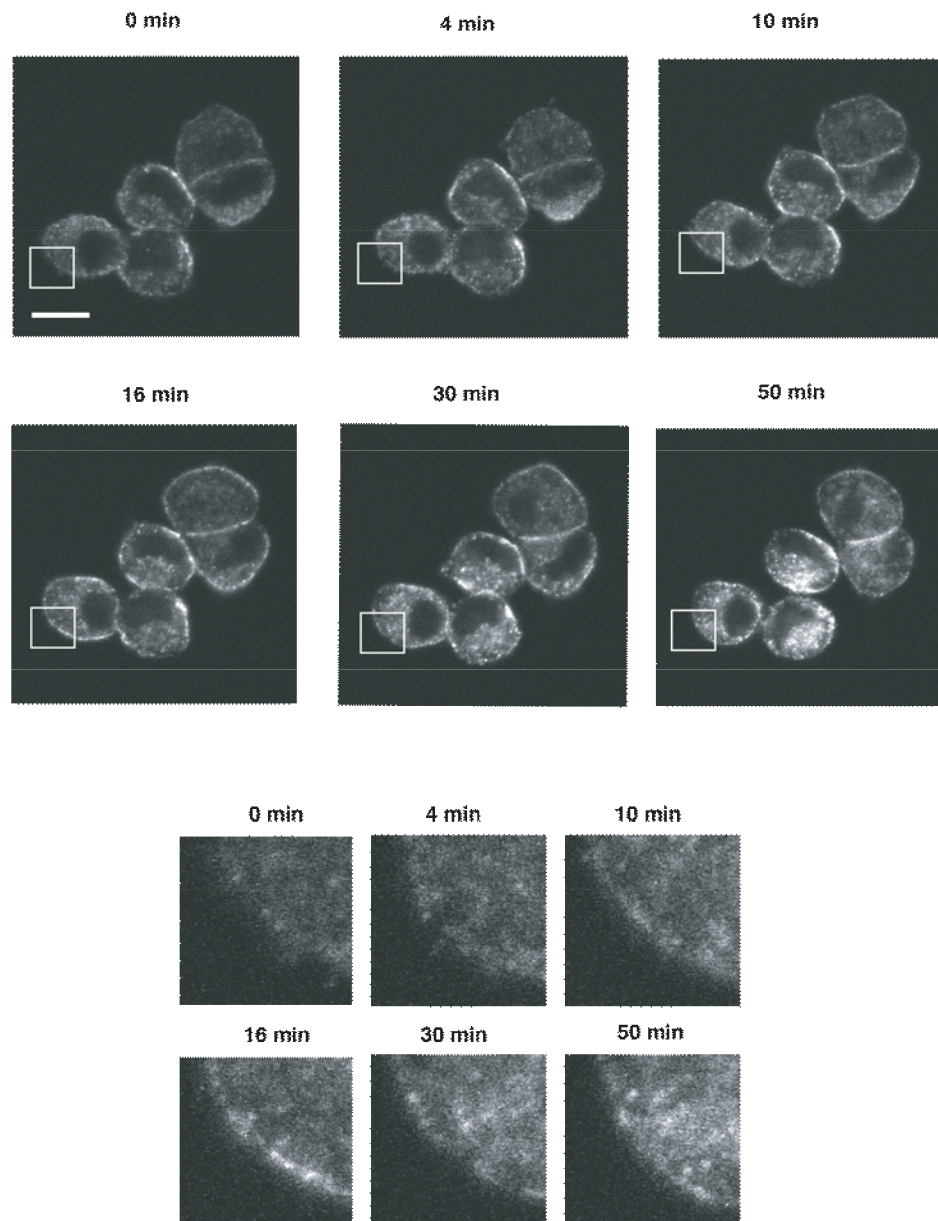
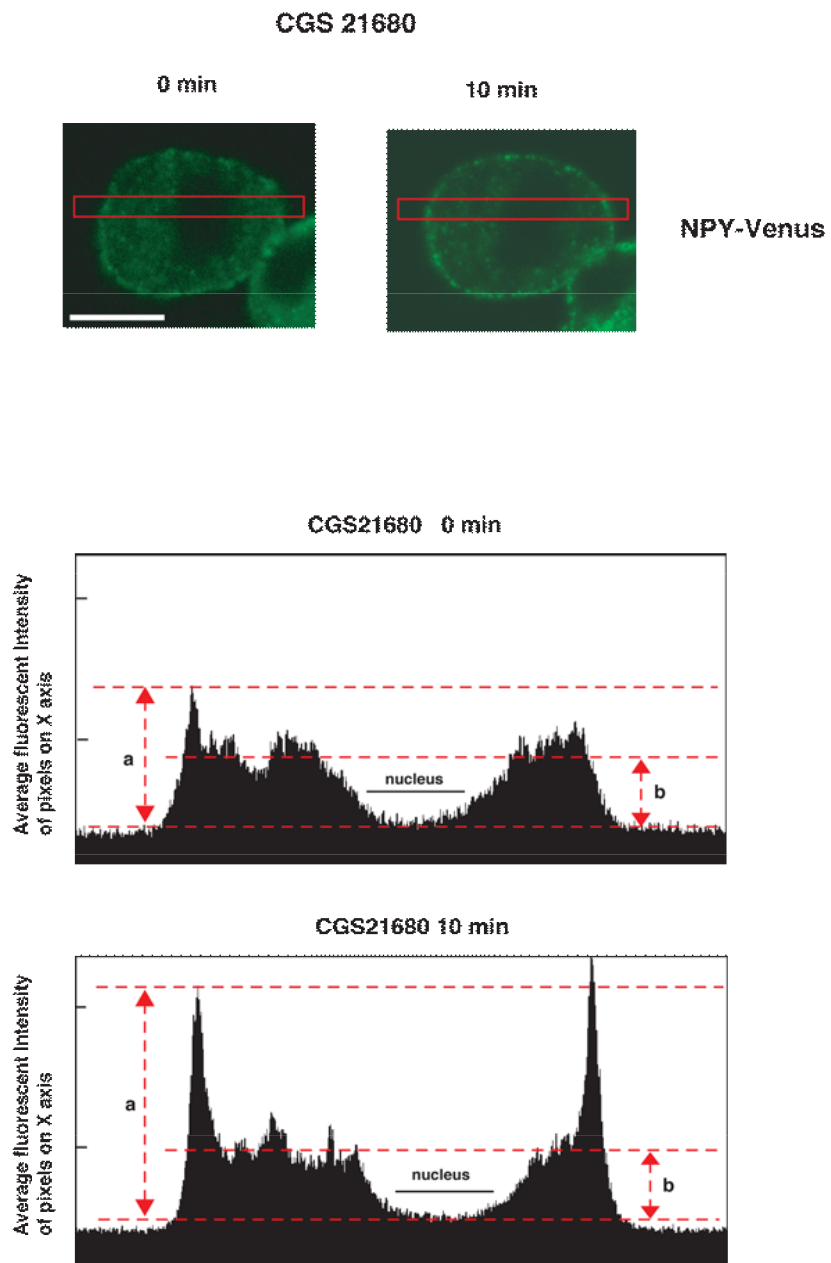


Fig.7 PC12細胞においてCGS21680の刺激によりNPY-Venusを含む小胞が細胞膜近傍に局在移行する

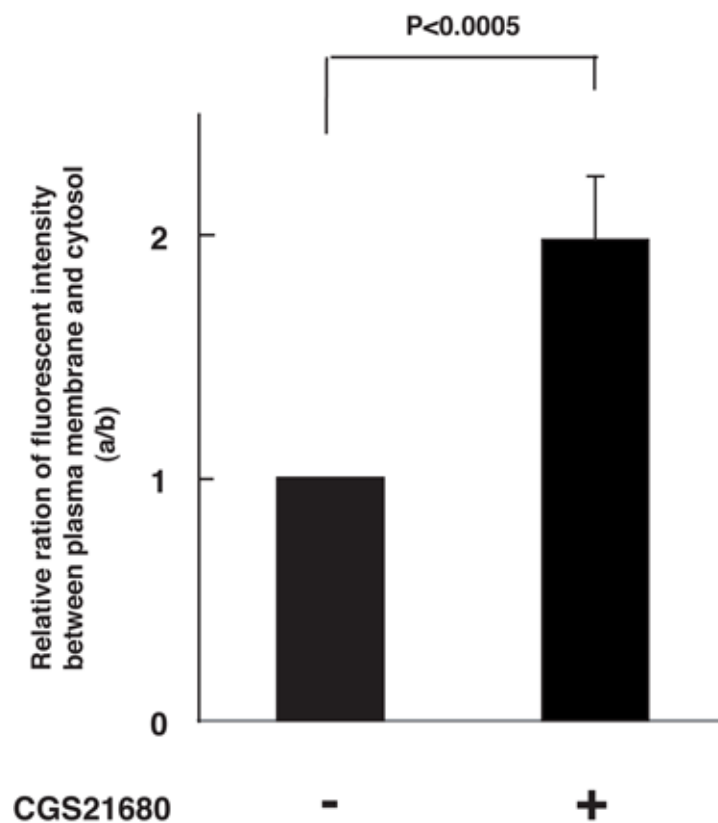
(A) PC12:NPY-Venus細胞に1 μ M CGS21680で刺激した後に共焦点レーザー顕微鏡を用いてNPY-Venusを含む小胞の局在を経時的に観察した (Scale Bar, 10 μ m)。

B



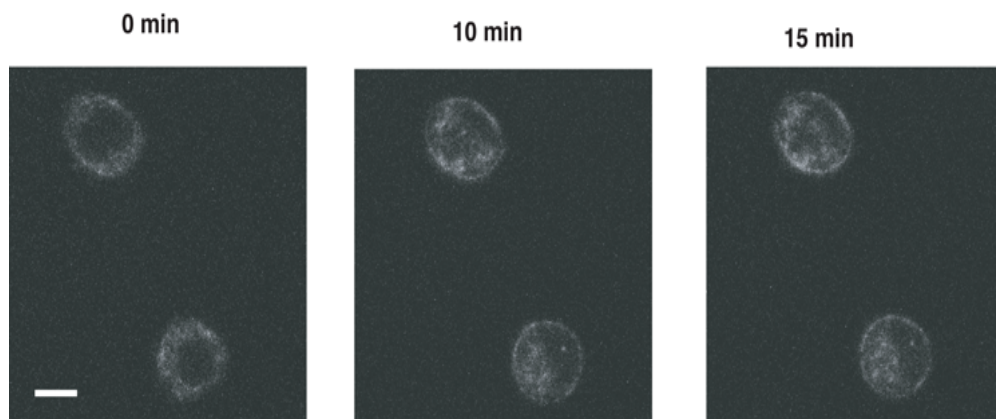
(B) IP lab softwareを用いて細胞の中央部を選択し（赤線で囲んだ長方形の領域）、その領域内でのNPY-Venusの蛍光強度を測定した（上図）。測定により得られた長方形内のX軸上の平均蛍光強度を下図に示した（Scale Bar, 10 μ m）。

C



(C) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて得られたNPY-Venusの蛍光強度をLSM Image Browserを用いて定量化した。核内の蛍光強度をバックグラウンドとして、細胞膜付近の蛍光強度のピークの値 (a) を細胞質での平均の蛍光強度 (b) で割った値 (a/b) を算出した (n=12)。

D



(D) PC12:NPY-Venus細胞に1 μ M KT5720 (PKA阻害剤) と20 μ M LY294002 (PI3キナーゼ阻害剤) で30分処理した後に、1 μ M CGS21680で刺激した後に共焦点レーザー顕微鏡を用いてNPY-Venusを含む小胞の局在を経時的に観察した (Scale Bar, 10 μ m)。

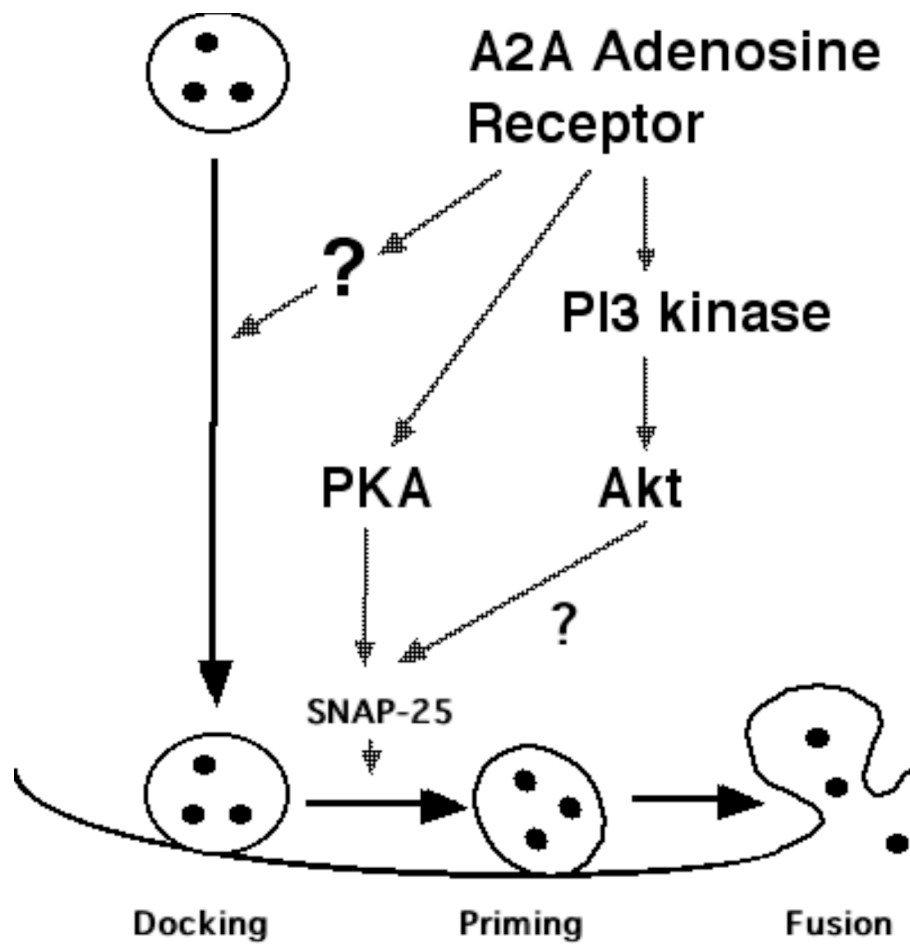


Fig.8 PC12細胞でのA2Aアデノシン受容体によるカルシウム流入
依存的な開口放出促進機構のモデル

考察

今回、PC12細胞の系においてA2Aアデノシン受容体を活性化させるアゴニストCGS21680を用いた解析から、1) A2Aアデノシン受容体の活性化によりカルシウム流入依存的な分泌小胞の開口放出が促進されること、2) A2Aアデノシン受容体によってこれまで知られていたPKAおよびERKのリン酸化に加えてAkt, p38, JNKがリン酸化されること、3) A2Aアデノシン受容体の活性化によるカルシウム流入依存的な分泌小胞の開口放出促進には部分的にPKA経路とPI3キナーゼ-Akt経路が関与すること、及び4) A2Aアデノシン受容体の活性化により一過的にNPY-Venusを含む分泌小胞が細胞膜近傍に局在移行すること、が明らかになった。

PC12細胞においてA2Aアデノシン受容体の活性化によりこれまで知られているMAPKおよびPKAの活性化に加えて、JNK経路、p38経路およびPI3キナーゼ-Akt経路も活性化していることが今回の実験より明らかになった。これまでPC12細胞においてA2Aアデノシン受容体の活性化が細胞の生存促進に関与することが報告されている(Huang et al., 2001)。A2Aアデノシン受容体の活性化による生存促進にPKA経路とPKC ϵ 経路が関わっているがMAPキナーゼ経路およびPI3キナーゼ経路は関与しない可能性が示唆されている。よって開口放出の促進経路と生存の促進経路は一部は共通しているものの、一部は別な経路を用いていると考えられる。

今回の実験からA2Aアデノシン受容体の活性化によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進にPKA経路とPI3キナーゼ-Akt経路が協調して関与していることが示された。これまでにPKA経路に関しては開口放出の促進に関与する可能性はいくつか報告されている。一方PI3キナーゼ-Akt経路の開口放出への関与に関しては、PI3キナーゼが関与している可能性は示唆されていたがPI3キ

ナーゼがどのように働いているかは明らかではなかった。今回PKA経路の阻害と共にPI3キナーゼの下流で働くAktを阻害することによりA2Aアデノシン受容体の活性化による開口放出の促進が抑制されることが示された。よって、これまで細胞の生存、増殖、運動への関与が報告されているAktがカルシウム流入依存的な開口放出の促進にも関与することが初めて明らかになった。

それではPKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路はカルシウム流入依存的な開口放出のどのような過程に関係するのだろうか？今回の実験結果からPKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路が分泌小胞の移動もしくは細胞膜の接着には関与しないことが示されているので、分泌小胞の膜融合移行後の過程、即ち膜融合の準備段階（Priming）もしくは膜融合（Fusion）の段階に関与している可能性が考えられる。これまでPKA経路はPrimingに関与するSNAP-25のThr138のリン酸化を介して放出可能プールを増加させることにより開口放出の促進に関与していることが報告されている(Nagy et al., 2004)。これまでPKAとAktとは同じ基質をリン酸化していることがCREB、Bad、Nur77で報告されている(Datta et al., 2000; Du and Montminy, 1998; Masuyama et al., 2001)。よってカルシウム流入依存的な開口放出の促進に関してもPKAとAKTが同じ基質をリン酸化している可能性が考えられる。よってAktもPKAと同様にSNAP-25のリン酸化を介してカルシウム流入依存的な開口放出の促進に関与しているのではないかという可能性を考えている (Fig. 8)。

今回A2Aアデノシン受容体の活性化により分泌小胞が細胞膜近傍に局在移行することが明らかになった。この局在移行過程にはPKA経路およびPI3キナーゼ-AKT経路は関与しないことが示唆されたので、A2Aアデノシン受容体はこれら以外の何らかの分子を介して分泌小胞の局在移行に関与していると考えられる (Fig. 8)。これまでにA2Aアデノシン受容体はアクチン結合タンパク質で

ある α -Actinin と細胞質領域で相互作用していることが報告されている (Burgueno et al., 2003)。よって A2A アデノシン受容体は α -Actinin を介してアクチン骨格を制御することにより分泌小胞の移動に関与しているのかもしれない。また小胞と細胞膜の接着には低分子量 G タンパク質である Rab3 の関与が報告されている (Nonet et al., 1997)。よって A2A アデノシン受容体は何らかの分子を介して Rab3 の活性を制御している可能性も考えられる。

また A2A アデノシン受容体の刺激によって一過的に細胞膜近傍に移行してきた分泌小胞が、時間経過と共に細胞膜近傍から消失する現象も観察された。最近、新規合成されて細胞膜近傍に移行した分泌小胞のうち細胞膜と融合せず古くなった分泌小胞は再びゴルジ体付近に戻っていくことが報告されている (Duncan et al., 2003)。よって A2A アデノシン受容体の活性化により移行してきた分泌小胞は一定の期間を過ぎると再びゴルジ体付近に戻っていくのではないかと推測している。

A2A アデノシン受容体は特にパーキンソン病との関連が知られている。パーキンソン病は運動症状に異常をきたす疾患であり、その原因は随意運動を司る大脳基底核の黒質緻密部に存在するドーパミン産生ニューロンの細胞死によるドーパミンの枯渇による。ドーパミンの枯渇によって線条体に存在する GABA 作動性ニューロンでは GABA が過剰に放出される (Fig. 2)。その結果大脳新皮質および脊髄の活性化が減弱することにより無動性の運動性障害を生じる。パーキンソン病の治療には枯渇したドーパミンを補うために D2 ドーパミン受容体を活性化させるアゴニストである L-DOPA などの投薬が行われている。しかし L-DOPA には様々な副作用もあることが報告されていることから、D2 ドーパミン受容体の活性化以外の方法によるパーキンソン病の治療について研究が行われている。近年開発されたパーキンソン病の治療薬 KW-6002 は A2A アデノ

シン受容体のアンタゴニストとして働きA2Aアデノシン受容体による開口放出シグナルを抑制し、線条体ニューロンからのGABAの放出量が適切な量へと回復する効果があることが報告されている (Fig. 2) (Mori and Shindou, 2003)。しかし線条体ニューロンにおいてA2Aアデノシン受容体がいかなるメカニズムでGABA放出の促進に関与しているのかについては明らかになっていなかった。今回得られた結果から線条体に存在するGABA作動性ニューロンでもA2Aアデノシン受容体による開口放出の促進にPKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路が部分的に関与している可能性を考えている。

またA2Aアデノシン受容体は睡眠行動にも関与している。アデノシン受容体のアンタゴニストとして働くカフェインには睡眠行動を抑制する作用があることや、アデノシンの投与により睡眠行動が誘導されること知られている (Scammell et al., 2001)。またA2Aアデノシン受容体のノックアウトマウスはノンレム睡眠が顕著に減少していることから、A2Aアデノシン受容体が睡眠行動に関与していることが示されている (Urade et al., 2003)。睡眠調節中枢であると考えられている前部視床下部の原側外側視索 (VLPO) にはA2Aアデノシン受容体が発現しており、この領域に存在するGABA作動性神経の活性化に関与していると考えられている。このように睡眠行動に関する細胞外の分子機構は徐々に解明されてきているが、細胞内の分子メカニズムに関してはほとんど解明されていない。今回得られた結果から睡眠調節中枢領域でのA2Aアデノシン受容体の機能にPKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路が部分的に関与している可能性を考えている。

結言

今回の研究によりPC12細胞においてA2Aアデノシン受容体の活性化によるカルシウム流入依存的な開口放出の促進に、PKA経路とPI3キナーゼ-AKT経路が部分的に関与することが明らかになった。この経路の開口放出への関与およびメカニズムについてはより詳細な解析が必要であると考えている。例えばPKA経路と同様にPI3キナーゼ-AKT経路を活性化させるだけで開口放出が促進が起こるか、またPKA経路による開口放出の促進機構であるSNAP-25のリン酸化による放出可能プールの増加がPI3キナーゼ-AKT経路でも同様に起こるのか検討したい。またA2Aアデノシン受容体の活性化により放出可能プールが増加しているのか、もしくは小胞膜と細胞膜の融合過程が促進されているのか検討したい。またA2Aアデノシン受容体の活性化による分泌小胞の局在移行にいかなる分子に関与するのか検討したい。さらにA2Aアデノシン受容体がGABA作動性ニューロンの機能への関与が知られていることから、PKA経路およびPI3キナーゼ-AKT経路がGABA作動性ニューロンにおいてGABAの放出に関与しているのかを検討したい。

引用文献

Adolfson, B., Saraswati, S., Yoshihara, M. and Littleton, J.T. (2004) Synaptotagmins are trafficked to distinct subcellular domains including the postsynaptic compartment. *J Cell Biol*, 166, 249-260.

Amino, S., Itakura, M., Ohnishi, H., Tsujimura, J., Koizumi, S., Takei, N. and Takahashi, M. (2002) Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca^{2+} -responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biochem (Tokyo)*, 131, 887-894.

Aravanis, A.M., Pyle, J.L. and Tsien, R.W. (2003) Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*, 423, 643-647.

Arslan, G. and Fredholm, B.B. (2000) Stimulatory and inhibitory effects of adenosine $\text{A}(2\text{A})$ receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci Lett*, 292, 183-186.

Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C. and Brose, N. (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*, 400, 457-461.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. and Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, 371, 199-204.

Barclay, J.W., Aldea, M., Craig, T.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (2004) Regulation of the fusion pore conductance during exocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem*, 279, 41495-41503.

Barclay, J.W., Craig, T.J., Fisher, R.J., Ciufo, L.F., Evans, G.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (2003) Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem*, 278, 10538-10545.

Barr, R.K., Kendrick, T.S. and Bogoyevitch, M.A. (2002) Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol*

Chem, 277, 10987-10997.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. and Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13681-13686.

Berton, F., Cornet, V., Iborra, C., Garrido, J., Dargent, B., Fukuda, M., Seagar, M. and Marqueze, B. (2000) Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles. *Eur J Neurosci*, 12, 1294-1302.

Burgueno, J., Blake, D.J., Benson, M.A., Tinsley, C.L., Esapa, C.T., Canela, E.I., Penela, P., Mallol, J., Mayor, F., Jr., Lluís, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003) The adenosine A_{2A} receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J Biol Chem*, 278, 37545-37552.

Byrd, D.T., Kawasaki, M., Walcoff, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K. and Jin, Y. (2001) UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*. *Neuron*, 32, 787-800.

Castillo, P.E., Janz, R., Sudhof, T.C., Tzounopoulos, T., Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1997) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 388, 590-593.

Castillo, P.E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T.C. and Malenka, R.C. (2002) RIM1 alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*, 415, 327-330.

Chern, Y., Chiou, J.Y., Lai, H.L. and Tsai, M.H. (1995) Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A_{2A} adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A. *Mol Pharmacol*, 48, 1-8.

Chheda, M.G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J. and Sheng, Z.H. (2001) Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol*, 3, 331-338.

Cunha, R.A. and Ribeiro, J.A. (2000a) Adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci Lett*, 289, 127-130.

Cunha, R.A. and Ribeiro, J.A. (2000b) Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*, 39, 1156-1167.

Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B. and Greenberg, M.E. (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*, 6, 41-51.

Daval, J.L., Nehlig, A. and Nicolas, F. (1991) Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci*, 49, 1435-1453.

Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-252.

Du, K. and Montminy, M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, 273, 32377-32379.

Duncan, R.R., Greaves, J., Wiegand, U.K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D.K., Shipston, M.J. and Chow, R.H. (2003) Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*, 422, 176-180.

Eaton, B.A., Haugwitz, M., Lau, D. and Moore, H.P. (2000) Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. *J Neurosci*, 20, 7334-7344.

Fergestad, T., Wu, M.N., Schulze, K.L., Lloyd, T.E., Bellen, H.J. and Broadie, K. (2001) Targeted mutations in the syntaxin H3 domain specifically disrupt SNARE complex function in synaptic transmission. *J Neurosci*, 21, 9142-9150.

Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J. and Herschman, H.R. (2000) Deficits in memory and motor performance in Synaptotagmin IV mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5598-5603.

Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S.H., Garcia, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. and Sudhof, T.C. (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410, 41-49.

Fernandez-Chacon, R., Shin, O.H., Konigstorfer, A., Matos, M.F., Meyer, A.C., Garcia, J., Gerber, S.H., Rizo, J., Sudhof, T.C. and Rosenmund, C. (2002) Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of Synaptotagmin 1. *J Neurosci*, 22, 8438-8446.

Ferre, S., O'Connor, W.T., Fuxe, K. and Ungerstedt, U. (1993) The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J Neurosci*, 13, 5402-5406.

Fisher, R.J., Pevsner, J. and Burgoyne, R.D. (2001) Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science*, 291, 875-878.

Fletcher, A.I., Shuang, R., Giovannucci, D.R., Zhang, L., Bittner, M.A. and Stuenkel, E.L. (1999) Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18. *J Biol Chem*, 274, 4027-4035.

Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y.P. and Yamamoto, A. (2003) Nerve growth factor-dependent sorting of Synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem*, 278, 3220-3226.

Fukuda, M., Kojima, T. and Mikoshiba, K. (1996) Phospholipid composition dependence of Ca²⁺-dependent phospholipid binding to the C2A domain of Synaptotagmin IV. *J Biol Chem*, 271, 8430-8434.

Fukuda, M., Kowalchuk, J.A., Zhang, X., Martin, T.F. and Mikoshiba, K. (2002) Synaptotagmin IX regulates Ca²⁺-dependent secretion in PC12 cells. *J Biol Chem*, 277, 4601-4604.

Gandhi, S.P. and Stevens, C.F. (2003) Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*, 423, 607-613.

Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F. and Sudhof, T.C. (1997) The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*, 387, 810-814.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B. and Davis, R.J. (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J*, 15, 2760-2770.

Garcia, R.A., Forde, C.E. and Godwin, H.A. (2000) Calcium triggers an intramolecular association of the C2 domains in Synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5883-5888.

Heo, Y.S., Kim, S.K., Seo, C.I., Kim, Y.K., Sung, B.J., Lee, H.S., Lee, J.I., Park, S.Y., Kim, J.H., Hwang, K.Y., Hyun, Y.L., Jeon, Y.H., Ro, S., Cho, J.M., Lee, T.G. and Yang, C.H. (2004) Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *Embo J*, 23, 2185-2195.

Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D. and Jacobson, K. (2003) JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature*, 424, 219-223.

Huang, N.K., Lin, Y.W., Huang, C.L., Messing, R.O. and Chern, Y. (2001) Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by A(2A) adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J Biol Chem*, 276, 13838-13846.

Ibata, K., Hashikawa, T., Tsuboi, T., Terakawa, S., Liang, F., Mizutani, A., Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2002) Non-polarized distribution of Synaptotagmin IV in neurons: evidence that Synaptotagmin IV is not a synaptic vesicle protein. *Neurosci Res*, 43, 401-406.

James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*,

144, 1425-1436.

Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P. and Czernik, A.J. (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3679-3683.

Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P. and Sihra, T.S. (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci*, 3, 323-329.

Kawasaki, M., Hisamoto, N., Iino, Y., Yamamoto, M., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (1999) A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *Embo J*, 18, 3604-3615.

Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal*, 14, 99-108.

Kobayashi, S. and Millhorn, D.E. (1999) Stimulation of expression for the adenosine A_{2A} receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *J Biol Chem*, 274, 20358-20365.

Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*, 22, 667-676.

Lai, H.L., Yang, T.H., Messing, R.O., Ching, Y.H., Lin, S.C. and Chern, Y. (1997) Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A_{2a}-adenosine receptor-mediated cAMP response. *J Biol Chem*, 272, 4970-4977.

Ledent, C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G. and Parmentier, M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Nature*, 388, 674-

678.

Lee, B.H., Min, X., Heise, C.J., Xu, B.E., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E.J. and Cobb, M.H. (2004) WNK1 phosphorylates Synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding. *Mol Cell*, 15, 741-751.

Li, L. and Chin, L.S. (2003) The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 60, 942-960.

Littleton, J.T., Serano, T.L., Rubin, G.M., Ganetzky, B. and Chapman, E.R. (1999) Synaptic function modulated by changes in the ratio of Synaptotagmin I and IV. *Nature*, 400, 757-760.

Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C.J., Sudhof, T.C. and Linden, D.J. (2003) Phosphorylation of RIM1 alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*, 115, 49-60.

Lonart, G. and Sudhof, T.C. (2000) Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Biol Chem*, 275, 27703-27707.

Lynch, M.A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84, 87-136.

Machado, H.B., Liu, W., Vician, L.J. and Herschman, H.R. (2004) Synaptotagmin IV overexpression inhibits depolarization-induced exocytosis in PC12 cells. *J Neurosci Res*, 76, 334-341.

Mackler, J.M., Drummond, J.A., Loewen, C.A., Robinson, I.M. and Reist, N.E. (2002) The C(2)B Ca(2+)-binding motif of Synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature*, 418, 340-344.

Marchi, M., Raiteri, L., Risso, F., Vallarino, A., Bonfanti, A., Monopoli, A., Ongini, E. and Raiteri, M. (2002) Effects of adenosine A1 and A2A receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. *Br J Pharmacol*, 136, 434-440.

Marqueze, B., Berton, F. and Seagar, M. (2000) Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie*, 82, 409-420.

Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. and Gotoh, Y. (2001) Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 32799-32805.

Mooney, L.M. and Whitmarsh, A.J. (2004) Docking interactions in the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem*, 279, 11843-11852.

Mori, A. and Shindou, T. (2003) Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists. *Neurology*, 61, S44-48.

Moriguchi, T., Kawachi, K., Kamakura, S., Masuyama, N., Yamanaka, H., Matsumoto, K., Kikuchi, A. and Nishida, E. (1999) Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J Biol Chem*, 274, 30957-30962.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 20, 87-90.

Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E. and Sorensen, J.B. (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron*, 41, 417-429.

Nakhost, A., Houeland, G., Castellucci, V.F. and Sossin, W.S. (2003) Differential regulation of transmitter release by alternatively spliced forms of Synaptotagmin I. *J Neurosci*, 23, 6238-6244.

Nonet, M.L., Staunton, J.E., Kilgard, M.P., Fergestad, T., Hartweg, E., Horvitz, H.R., Jorgensen, E.M. and Meyer, B.J. (1997) *Caenorhabditis*

C. elegans rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *J Neurosci*, 17, 8061-8073.

O'Connor, V., Heuss, C., De Bello, W.M., Dresbach, T., Charlton, M.P., Hunt, J.H., Pellegrini, L.L., Hodel, A., Burger, M.M., Betz, H., Augustine, G.J. and Schafer, T. (1997) Disruption of syntaxin-mediated protein interactions blocks neurotransmitter secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12186-12191.

Ohnishi, H., Yamamori, S., Ono, K., Aoyagi, K., Kondo, S. and Takahashi, M. (2001) A src family tyrosine kinase inhibits neurotransmitter release from neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10930-10935.

Ohta, A. and Sitkovsky, M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414, 916-920.

Oishi, H., Sasaki, T., Nagano, F., Ikeda, W., Ohya, T., Wada, M., Ide, N., Nakanishi, H. and Takai, Y. (1998) Localization of the Rab3 small G protein regulators in nerve terminals and their involvement in Ca²⁺-dependent exocytosis. *J Biol Chem*, 273, 34580-34585.

Okada, M., Nutt, D.J., Murakami, T., Zhu, G., Kamata, A., Kawata, Y. and Kaneko, S. (2001) Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci*, 21, 628-640.

Olah, M.E. and Stiles, G.L. (1995) Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 581-606.

Pereira, D.B., Carvalho, A.P. and Duarte, C.B. (2002) Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology*, 42, 9-19.

Poo, M.M. (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2, 24-32.

Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H.T., Sudhof, T.C., Brose, N. and Rosenmund, C. (2001) Complexins regulate a late step in Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release. *Cell*, 104, 71-81.

Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C. and Brose, N. (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell*, 108, 121-133.

Richardson, P.J., Kase, H. and Jenner, P.G. (1997) Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 338-344.

Rizzoli, S.O. and Betz, W.J. (2003) Neurobiology: All change at the synapse. *Nature*, 423, 591-592.

Robinson, I.M., Ranjan, R. and Schwarz, T.L. (2002) Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca^{2+} binding in the C(2)A domain. *Nature*, 418, 336-340.

Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G. and Linden, J. (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 401, 163-186.

Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Izumi, G., Yasumi, M. and Takai, Y. (2004) Regulation of SNAREs by tomosyn and ROCK: implication in extension and retraction of neurites. *J Cell Biol*, 166, 17-25.

Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2001) An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, 107, 653-663.

Schluter, O.M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R.A., Janz, R., Malenka, R.C., Geppert, M. and Sudhof, T.C. (1999) Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J Neurosci*, 19, 5834-5846.

Schoch, S., Castillo, P.E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C. and Sudhof, T.C. (2002) RIM1 alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, 415, 321-326.

Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T.C. and Kavalali, E.T. (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science*, 294, 1117-1122.

Schulte, G. and Fredholm, B.B. (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*, 15, 813-827.

Sebastiao, A.M. and Ribeiro, J.A. (1996) Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol*, 48, 167-189.

Sebastiao, A.M. and Ribeiro, J.A. (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 341-346.

Seidel, M.G., Klinger, M., Freissmuth, M. and Holler, C. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274, 25833-25841.

Shin, O.H., Rizo, J. and Sudhof, T.C. (2002) Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells. *Nat Neurosci*, 5, 649-656.

Shoji-Kasai, Y., Itakura, M., Kataoka, M., Yamamori, S. and Takahashi, M. (2002) Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur J Neurosci*, 15, 1390-1394.

Sudhof, T.C. (2002) Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem*, 277, 7629-7632.

Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M. and Nishida, E. (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the

specificity of docking interactions. *Embo J*, 20, 466-479.

Taylor, S.C., Green, K.N., Carpenter, E. and Peers, C. (2000) Protein kinase C evokes quantal catecholamine release from PC12 cells via activation of L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem*, 275, 26786-26791.

Thomas, D.M., Ferguson, G.D., Herschman, H.R. and Elferink, L.A. (1999) Functional and biochemical analysis of the C2 domains of Synaptotagmin IV. *Mol Biol Cell*, 10, 2285-2295.

Tokumaru, H., Umayahara, K., Pellegrini, L.L., Ishizuka, T., Saisu, H., Betz, H., Augustine, G.J. and Abe, T. (2001) SNARE complex oligomerization by synaphin/complexin is essential for synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 104, 421-432.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288, 870-874.

Trudeau, L.E., Emery, D.G. and Haydon, P.G. (1996) Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron*, 17, 789-797.

Tsuboi, T. and Rutter, G.A. (2003) Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Curr Biol*, 13, 563-567.

Tucker, W.C., Weber, T. and Chapman, E.R. (2004) Reconstitution of Ca^{2+} -regulated membrane fusion by Synaptotagmin and SNAREs. *Science*, 304, 435-438.

Turner, K.M., Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1999) Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci*, 22, 459-464.

Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W.M., Sakata, M., Huang, Z.L., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S. and Hayaishi, O. (2003) Sleep regulation in

adenosine A2A receptor-deficient mice. *Neurology*, 61, S94-96.

Valtorta, F., Meldolesi, J. and Fesce, R. (2001) Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence? *Trends Cell Biol*, 11, 324-328.

Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J. and

Sudhof, T.C. (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 287, 864-869.

Vician, L., Lim, I.K., Ferguson, G., Tocco, G., Baudry, M. and Herschman, H.R. (1995) Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2164-2168.

von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J. and Sudhof, T.C. (1997) The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of Synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca^{2+} binding. *J Biol Chem*, 272, 14314-14319.

Wang, C.T., Grishanin, R., Earles, C.A., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R. and Jackson, M.B. (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science*, 294, 1111-1115.

Wang, C.T., Lu, J.C., Bai, J., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R. and Jackson, M.B. (2003) Different domains of Synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature*, 424, 943-947.

Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. and Sudhof, T.C. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388, 593-598.

Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D. and

Wilson, M.C. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25

distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci*, 5, 19-26.

Weber, T., Parlati, F., McNew, J.A., Johnston, R.J., Westermann, B., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (2000) SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. *J Cell Biol*, 149, 1063-1072.

Weimer, R.M., Richmond, J.E., Davis, W.S., Hadwiger, G., Nonet, M.L. and Jorgensen, E.M. (2003) Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci*, 6, 1023-1030.

Wick, P.F., Senter, R.A., Parsels, L.A., Uhler, M.D. and Holz, R.W. (1993) Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J Biol Chem*, 268, 10983-10989.

Wu, L.G. and Saggau, P. (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*, 20, 204-212.

Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A.R., Neher, E. and Jahn, R. (1999) Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 99, 713-722.

Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, 389, 865-870.

Yoshihara, M., Adolfsen, B. and Littleton, J.T. (2003) Is Synaptotagmin the calcium sensor? *Curr Opin Neurobiol*, 13, 315-323.

Zakharenko, S.S., Zablow, L. and Siegelbaum, S.A. (2002) Altered presynaptic vesicle release and cycling during mGluR-dependent LTD. *Neuron*, 35, 1099-1110.

Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O. and Haydon, P.G. (2004) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9441-9446.

Zhang, X., Kim-Miller, M.J., Fukuda, M., Kowalchyk, J.A. and Martin, T.F.
(2002) Ca^{2+} -dependent Synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential
for Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Neuron*, 34, 599-611.

謝 辞

本研究をおこなううえにあたって指導教官としてさまざまな面で御指導してくださった大矢偵一教授にこの場を借りてお礼申し上げます。また、本研究は東京大学の分子細胞生物学的研究所・情報伝達研究分野で行われ、6年間という長期にわたって後藤由季子助教授に暖かく御指導いただきましたことに厚く感謝の意を表します。そして、情報伝達研究分野の方々にはさまざまな面で御支援をしていただいたことに感謝します。特に樋口麻衣子博士には共焦点レーザー顕微鏡によるNPY-Venusを含む小胞の経時的な観察および解析、さらにCell Structure and Function誌への投稿から受理にいたるまでの間に様々な面で多大な貢献をしていただき心から感謝しております。最後に、研究を行う際に心の支えとなった家族に感謝します。