

神经递质释放过程中的可溶性 NSF 附着蛋白受体 (SNARE) 和相关蛋白

王堰婷¹⁾ 陆佩华¹⁾ 盛祖杭^{2)*}

(¹⁾上海第二医科大学神经生物学实验室, 上海 200025;

²⁾美国国家健康研究院突触功能研究室, 马里兰 20892, 美国)

摘要 近年来, 对突触小泡释放神经递质分子机制的研究迅速发展, 发现了大量位于神经末梢的蛋白质, 它们之间的相互作用与突触小泡释放神经递质相关, 特别是位于突触小泡膜上的突触小泡蛋白/突触小泡相关膜蛋白 (synaptobrevin/VAMP), 位于突触前膜上的 syntaxin 和突触小体相关蛋白 (synaptosome associated protein of 25 ku), 三者聚合形成的可溶性 NSF 附着蛋白受体 (SNARE) 核心复合体在突触小泡的胞裂外排、释放递质过程中有重要作用。而一些已知及未知的与 SNARE 蛋白有相互作用的蛋白质, 可通过调节 SNARE 核心复合体的形成与解离来影响突触小泡的胞裂外排, 从而可以调节突触信号传递的效率及强度, 在突触可塑性的形成中起重要作用。

关键词 SNARE 蛋白, 神经递质释放, 突触小泡

学科分类号 Q189

化学突触是神经元之间进行信息交流的重要结构, 通过神经递质来进行细胞间的信息传递, 其突触可塑性对脑的学习记忆功能非常重要。突触末梢神经递质的释放是神经系统正常行使功能以及传递信息的基础, 因此对突触递质释放的分子机制研究日益成为神经科学家们关注的热点。

近期对神经末梢蛋白的研究揭示, 作为可溶性 NSF 附着蛋白受体 (SNARE) 蛋白的突触小泡蛋白/突触小泡相关膜蛋白 (synaptobrevin/VAMP), syntaxin 和 SNAP-25 可聚合形成 SNARE 核心复合体, 该复合体可作为膜融合构件 (fusion machinery), 在神经递质释放中发挥重要作用。与 SNARE 蛋白有相互作用的蛋白质可通过调节 SNARE 核心复合体的形成与解离来影响突触小泡的胞裂外排作用, 从而可调节突触信号传递的强度, 在突触可塑性的形成及记忆中有重要意义。

1 SNARE 蛋白及 SNARE 假说

1.1 SNARE 蛋白

突触末梢的 3 种蛋白——突触小泡膜上的蛋白 (synaptobrevin/VAMP), 突触前膜上的蛋白 syntaxin 和 SNAP-25 被称为 SNARE 蛋白是因为它们都是 NSF (NEM 敏感融合蛋白) 和 SNAPs (可溶性 NSF 附着蛋白) 的膜受体。SNARE 的概念最先由 Sollner 等^[1]提出, 因为 NSF 和 SNAPs 是介导多种细胞内膜融合的重要可溶性蛋白, 所以作为

SNAPs 受体的 SNARE 蛋白与突触小泡的胞裂外排有直接的联系。几位研究者发现破伤风毒素和肉毒神经毒素可通过选择性酶解不同 SNARE 蛋白而抑制神经递质的释放^[2], 这证明了 SNARE 蛋白在神经递质释放中的重要作用。

Synaptobrevin/VAMP, syntaxin 及 SNAP-25 可以 1: 1: 1 的比例聚合形成稳定的三聚体结构, 即 SNARE 核心复合体。前者属于 v-SNARE, 后两者属于 t-SNARE。在实验条件下, 这种聚合是不可逆的。而在细胞内部, NSF 和 SNAPs 通过消耗 ATP 可将 SNARE 核心复合体解离开来, 使 SNARE 蛋白重新处于游离状态并可以参与下次的聚合^[2, 3]。

生理条件下, 钙离子进入突触末梢可触发小泡与胞膜融合而释放神经递质, 但每次钙离子进入仅仅引起小部分突触小泡与突触前膜融合, 这提示突触小泡搭靠在突触前膜后有一个依赖 SNARE 蛋白的成熟过程, 使其进入预融合状态 (prefusion), 这一状态的突触小泡才能在钙信号作用下发生迅速的膜融合反应。Weber 等^[4]的实验显示构建入磷脂小泡的重组 synaptobrevin, syntaxin 和 SNAP-25 可以介导小泡外层磷脂发生缓慢的混合, 从而可以推

* 通讯联系人。

Tel: 0301-4354596, E-mail: ShengZ@ninds.nih.gov

收稿日期: 2001-05-28, 接受日期: 2001-08-29

测在这个成熟过程中, 两对应膜上的 SNARE 蛋白发生聚合形成了 SNARE 核心复合体, 促使两膜进入预融合状态. 此时若接受到触发信号就可发生膜的完全融合. 有实验发现 SNARE 蛋白本身并不介导最后的膜融合过程^[3]. 这样就使人们推测在 SNARE 核心复合体形成后可能有融合物质 (fusogen) 的存在. 它们的存在是膜融合必不可少的条件, 各种引起膜融合的条件都是通过这个最终通路而达到膜的完全融合. 到目前为止, 这些融合物质仍是一个谜, 它们的结构特点、具体定位、生理生化性质、作用机理以及可能与 SNARE 蛋白的关系都是有待突破的领域. 了解这些融合物质对最终解神经递质释放的分子机制有极其重要的作用.

1.2 SNARE 假说

SNARE 假说由 Sollner 等^[1]提出, 早期用来解释 SNARE 核心复合体的形成与解离在膜融合中的作用. 假说主要有以下三个观点: a. SNARE 蛋白介导突触小泡搭靠在突触前膜的过程 (docking). b. NSF 可通过解离 SNARE 核心复合体而最终导致膜融合的完成. c. v-SNARE 与 t-SNARE 的相互结合决定突触小泡在突触前膜融合的特异性. 但是后来的相关实验结论对这三点提出质疑. 通过神经毒素的功能性试验发现, 破坏 SNARE 蛋白后并不影响突触小泡在突触前膜上的正确搭靠^[2]. 所以推断 SNARE 核心复合体的形成是在突触小泡完成搭靠以后. 而 Littleton 等^[5]找到证据显示 NSF 是在膜融合后解离位于突触前膜的 SNARE 核心复合体, 使 SNARE 蛋白重新恢复游离状态而进入下次的膜融合过程. Yang 等^[6]的实验说明 v-SNARE 与 t-SNARE 的相互作用并没有特异性. 所以他们认为突触小泡与突触前膜的搭靠过程是介导膜融合特异性的过程. 而最近 Scales 等^[7]用功能性实验证明了 t-SNARE 与 v-SNARE 可决定小泡和靶膜相互作用的特异性, 他们认为 SNARE 蛋白相互结合的特异性并不是完全取决于可形成稳定的复合体, 而可能与其他蛋白质的作用有关. 在这个过程中决定特异性的蛋白质及调节因子 (如细胞骨架结构或其他因素) 都有待进一步阐明.

2 与 SNARE 蛋白相互作用的几种重要蛋白

2.1 Synaptotagmin

Synaptotagmin 是一种突触小泡膜蛋白^[8], 含有 C2A 和 C2B 结构区. 它通过其 C2A 结构区可与钙离子及磷酸脂类结合, 钙离子与 synaptotagmin

结合后触发其与 syntaxin 及磷酸脂的结合. 目前认为它是突触小泡胞裂外排作用中的一个重要钙离子感受器. 在 synaptotagmin I 基因敲除小鼠, 其钙离子触发的快速突触小泡胞裂外排作用表现出严重障碍, 而高渗糖溶液引起的胞裂外排作用不受影响^[9], 因而从遗传学角度证明了 synaptotagmin 参与由钙离子激发的突触小泡与细胞膜融合及神经递质的释放. 钙离子通过调节 synaptotagmin I, II 与 syntaxin 及其他 SNARE 蛋白的相互作用而触发胞裂外排. 一项近期的研究表明钙离子可触发 synaptotagmin I 穿入突触前膜, 同时增强其与 SNARE 蛋白的结合.

2.2 Complexin

Complexin 可与 SNAPs 竞争结合 SNARE 核心复合体, 从而调节其功能. Ono 等^[10]的实验提示 complexin II 对神经递质释放有抑制作用, 将重组 complexin II 注入突触前神经元可以抑制神经递质的释放. Complexin II 的作用可以被随后注入的重组 SNAPs 所逆转. 近来有研究报道, 缺乏 complexin II 小鼠正常的突触传递和短期可塑性不受影响, 而海马神经细胞的长时程增强 (LTP) 受到削弱. Complexin II 似乎是神经递质释放过程中的一个多功能性调控因子, 通过调节 SNARE 核心复合体的形成而发挥作用. 但有关 complexin 在神经递质释放的精确作用还有待进一步的研究.

2.3 Munc-18

Munc-18 与 syntaxin 结合可调节 SNARE 核心复合体的形成. 体外结合实验显示 munc-18 与 syntaxin 结合后能抑制后者与 SNAP-25 或 synaptobrevin 的结合从而抑制 SNARE 核心复合体的形成. Munc-18 经 PKC 磷酸化后 syntaxin 与 synaptobrevin 的结合增强, 促进了突触递质的释放^[11]. 在突触前神经细胞注入 munc-18 的部分肽段能抑制突触小泡的胞裂外排作用, 这说明 munc-18 与 syntaxin 的相互作用对 SNARE 核心复合体的形成以及突触小泡与前膜的融合有重要调节作用.

2.4 Snapin

Snapin 是近期本文作者实验室应用酵母双杂交方法克隆的突触小泡膜蛋白^[12]. 它通过直接结合 SNAP-25 而与 SNARE 核心复合体相连, 从而调节 (促进) SNARE 核心复合体与 synaptotagmin 的相互作用. 将外源性重组 snapin 羧基端肽段注入突触前神经元胞体可抑制神经递质的释放, 说明它可竞争性抑制内源性 snapin 与 SNARE 核心复合体的

结合,从而削弱了 synaptotagmin 与 SNARE 核心复合体的相互作用. 进一步对 snapin 的研究发现^[13], snapin 经 PKA 磷酸化后与 SNAP-25 的结合显著增加,而且 PKA 磷酸化的 snapin 可增强 synaptotagmin 与 SNARE 核心复合体的结合,从而促进神经递质的释放.

2.5 Syntaphilin

Syntaphilin 也是最近本文作者实验室克隆的位于突触前膜上的蛋白^[14]. 它可与 SNAP-25 竞争结合 syntaxin, 使得能与 SNAP-25 结合的游离 syntaxin 减少,从而抑制 SNARE 核心复合体的形成,削弱突触小泡的胞裂外排. 培养的海马神经元短暂过度表达 syntaphilin 后其神经递质的释放可明显降低,说明 syntaphilin 可作为一个“分子钳”控制形成 SNARE 核心复合体所需的游离 syntaxin,从而有效地调节突触小泡的胞裂外排及神经递质的释放过程. 研究 syntaphilin 的氨基酸序列发现了许多蛋白质磷酸化位点,从而推测第二信号系统可通过 syntaphilin 调节神经递质的释放.

2.6 Septin CDCre1

Septin 是一类细胞分裂过程中需要的 GTPase. 最近 Beites 等^[15]的研究发现 CDCre1 (septin 的一种) 主要在脑中表达. CDCre1 是一种与突触小泡相关的 GTPase,可直接结合 syntaxin. CDCre1 还可与其他 septin 聚合形成细丝样结构. 引入野生型 CDCre1 可抑制胞裂外排作用. 突变型 CDCre1 失去结合 GTP 以及相互聚合的能力后与 syntaxin 的亲合力增高. 引入的突变型 CDCre1 可将内源性 CDCre1 聚合形成的细丝样结构解聚而增强胞裂外排作用.

2.7 钙离子通道

Rettig 等^[16~18]发现, N 型钙离子通道的 $\alpha 1B$ 亚基以及 P/Q 型钙离子通道的 $\alpha 1A$ 亚基可通过 synprint 位点与 syntaxin、SNAP-25、synaptotagmin 以及 SNARE 核心复合体结合,这个结合是钙离子依赖性的. 将含 synprint 的肽段引入突触前神经元可抑制即时性递质释放^[19],而钙离子内流并不受影响,这说明钙离子通道与 SNARE 核心复合体的结合在突触递质释放中是必需的,除了介导钙离子内流外,钙离子通道还可通过直接与 SNARE 蛋白相互作用而影响递质释放,其与 SNARE 蛋白的相互作用可将 SNARE 核心复合体拉近钙离子通道. 当钙离子通道打开,钙离子涌入细胞内,使成熟的突触小泡直接位于高浓度的钙离子区域内,从而促进

递质释放.

3 结 语

近来对神经递质释放的研究成为科学家们关注的热点. 凭借迅速发展的技术手段,如膜片钳、酵母双杂交、基因敲除等技术,许多与神经递质释放过程相关的蛋白相继被发现,对它们的功能也有了初步的了解. SNARE 蛋白可能是突触小泡融合构件中重要的成分. 一些与 SNARE 蛋白有相互作用的蛋白能调节 SNARE 核心复合体的形成与解离,从而调控突触传递的效率及强度. 这些蛋白质的调控作用与突触可塑性及学习记忆有关. 尽管这些已发现的蛋白质对我们了解突触递质释放的分子机制有很大帮助,但仍然有许多疑团需要解开,而不断深入的研究也可能会对已建立的假说提出质疑. 随着新蛋白质的发现及相应功能的研究,对突触小泡胞裂外排的机制及调控将会有更深入的了解.

参 考 文 献

- 1 Sollner T, Whiteheart S W, Brunner M, *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 1993, **362** (6418): 318~324
- 2 Siegel G J, Agranoff B W, Albers R W, *et al.* Basic Neurochemistry. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. 183~186
- 3 Jahn R, Sudhof T C. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 863~911
- 4 Weber T, Zemelman B V, Mcnew J A, *et al.* SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998, **92** (6): 759~772
- 5 Littleton J T, Chapman E R, Kreber R, *et al.* Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron*, 1998, **21** (2): 401~413
- 6 Yang B, Gonzalez L, Prekeris R, *et al.* SNARE Interactions are not selective. *J Biol Chem*, 1999, **274** (9): 5649~5653
- 7 Scales S J, Chen Y A, Yoo B Y, *et al.* SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron*, 2000, **26** (2): 457~464
- 8 Brose N, Petrenko A G, Sudhof T C, *et al.* Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 1992, **256** (5059): 1021~1025
- 9 Geppert M, Goda Y, Hammer R E, *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 1994, **79** (4): 717~727
- 10 Ono S, Baux G, Sekiguchi M, *et al.* Regulatory roles of complexins in neurotransmitter release from mature presynaptic nerve terminals. *Eur J Neurosci*, 1998, **10** (6): 2143~2152
- 11 Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, *et al.* Phosphorylation of munc-18/rSec1/rbSec1 by protein kinase C. *J Biol Chem*, 1996, **271** (13): 7265~7268
- 12 Ilardi J M, Mochida S, Sheng Z-H. Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 1999, **2** (2): 119~124

- 13 Chheda M, Rettig J, Sheng Z-H, *et al.* Phosphorylation of snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (4): 331~ 338
- 14 Lao G F, Scheuss V, Sheng Z-H, *et al.* Syntaphilin: a syntaxin 1 clamp that controls SNARE assembly. *Neuron*, 2000, **25** (1): 191~ 201
- 15 Beites C L, Xie H, Bowser R, *et al.* The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci*, 1999, **2** (5): 434 ~ 439
- 16 Rettig J, Sheng Z-H, Kim D K, *et al.* Isoform-specific interaction of the $\alpha 1A$ subunits of brain Ca^{2+} channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (14): 7363~ 7368
- 17 Sheng Z-H, Yokoyama C T, Catterall W A, *et al.* Interaction of the synprint site of N-type Ca^{2+} channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (10): 5405~ 5410
- 18 Sheng Z-H, Rettig J, Cook T, *et al.* Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature*, 1996, **379** (6564): 451~ 454
- 19 Mochida S, Sheng Z-H, Baker C, *et al.* Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca^{2+} channels. *Neuron*, 1996, **17** (4): 781~ 788

SNARE and Interacting Proteins Involved in Neurotransmitter Release

WANG Yan-Ting¹⁾, LU Pei-Hua¹⁾, SHENG Zu-Hang^{2)*}

¹⁾ Department of Neurobiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

²⁾ Synaptic Function Unit, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, Maryland 20892, USA)

Abstract Synaptic vesicle docking and fusion at release sites require the association of proteins on both vesicle and plasma membranes. Syntaxin interacts with synaptobrevin/ VAMP and SNAP-25, constituting the SNARE core complex. This complex's formation comprises the minimal molecular requirement for membrane fusion *in vitro*. However, the Ca^{2+} -triggered synaptic vesicle fusion with presynaptic plasma membrane can be regulated rapidly and tightly when the main SNARE intermediate is so stable. Some synaptic proteins, which regulate the accessibility of SNARE components by interacting with the individual SNARE proteins, might tightly control assembly of functional fusion machinery. Thus, the identification of regulators or molecular switches involved in the assembly of the fusion core complexes is critical for elucidating the molecular mechanisms underlying neurotransmitter release and synaptic plasticity.

Key words SNARE, neurotransmitter release, synaptic vesicles

* Corresponding author. Tel: 86-301-4354596, E-mail: ShengZ@ninds.nih.gov

Received: May 28, 2001 Accepted: August 29, 2001