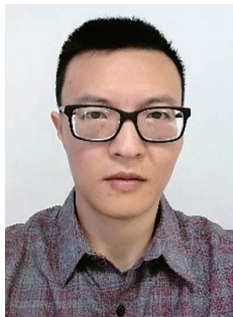




张晨, 首都医科大学教授, 博士生导师, 兼任麦戈文脑研究所研究员、北京大学孤独症中心主任、膜生物学国家重点实验室学术带头人。2003年毕业于中国科学院上海神经科学研究所并获理学博士学位, 曾在美国西南医学中心、斯坦福大学从事博士后研究。主要研究神经突触发育的分子机制以及神经突触失常导致神经精神疾病(譬如老年痴呆症和孤独症)的环路机制。在 *Nature*、*PNAS*、*Nature Neuroscience*、*Neuron*、*Cell Reports*、*Journal of Neuroscience* 等杂志发表多篇论文, 现任中国生物物理学会理事、中国实验动物学会理事、北京市神经科学学会理事、北京市痴呆诊治转化重点实验室学术委员会副主任等。负责国家级研究课题10余项, 包括国家重点研发计划“基于重大神经疾病非人灵长类模型的干细胞治疗评价研究”(首席科学家, 2017~2021)等。

http://www.ccmu.edu.cn/rczy_6468/jcrc_13876/gjjrejm_7903/yxqnxkj_7914/zc/index.htm



董伟, 西南医科大学心血管医学研究所、医学电生理学教育部重点实验室研究员, 课题组长。1999年于南京大学获得学士学位, 2005年于中国科学院上海神经科学研究所获得博士学位。2006~2017年先后在美国Brown University和Max Planck Florida Institute从事研究工作。现致力于运用电生理、成像、分子生物学等技术手段研究神经递质释放的突触前机制以及相关疾病的病理机制。研究论文发表于 *Neuron*、*Nature Neuroscience*、*Cell Reports*、*Journal of Neuroscience* 等著名杂志上。

<http://xxgyjs.swmu.edu.cn/info/1030/1407.htm>



阳小飞, 博士, 中南民族大学教授, 硕士生导师。曾在美国西南医学中心、斯坦福大学诺贝尔奖得主Thomas C. Südhof教授实验室从事博士后研究, 长期从事囊泡转运与释放, 钙离子调节神经递质释放机制的科学研究工作。在包括 *Science*、*Neuron*、*PNAS*、*EMBO Rep*、*J Neurosci* 等国际著名期刊中发表文章20余篇。主持多项国家自然科学基金、湖北省自然科学基金。先后入选湖北省“楚天学者计划”(楚天学子)、国家民委“中青年英才计划”及湖北省“优秀青年骨干人才计划”。目前主要运用分子/生化、遗传学、电生理和光学等手段, 在生理和病理情况下研究神经系统细胞信号跨膜传导的时空调节机制, 研究重点包括神经递质释放分子机制、神经突触形成与调节机理、神经网络发育调控、药物镇痛机制等。研究成果为诊断、治疗重大神经性疾病提供生物学基础。

<http://www.scuec.edu.cn/s/50/t/1310/a/62390/info.jspy>

神经递质释放的分子机制

陈瑛颀^{1,2} 张晨^{1,2*} 董伟^{3*} 阳小飞^{4*}

(¹首都医科大学基础医学院, 神经生物学系, 北京 100069; ²北京大学麦戈文脑科学研究所, 北京大学生命科学学院, 北京 100871; ³西南医科大学心血管医学研究所, 医学电生理学教育部重点实验室, 医学电生理四川省重点实验室, 泸州 646000; ⁴中南民族大学生物医学工程学院, 脑认知国家民委重点实验室, 医学信息分析及肿瘤诊疗湖北省重点实验室, 膜离子通道与药物研发实验室, 武汉 430074)

摘要 大脑中的神经细胞主要依赖神经突触进行细胞间信息传递。神经递质从突触前释放到突触间隙中, 将电信号转换为化学信号。释放的递质与突触后的相应受体结合, 引起受体通道的打开再将化学信号转换为突触后电信号。到目前为止, 对SNARE复合体介导的钙离子触发的神经递质释放分子机制已经有了深入理解, 囊泡融合的基本模型也得到了广泛认可, 但仍有问题没有解决。该文对近年来与神经递质释放分子机制相关的研究作一综述, 以期对递质释放过程中重要分子的深入解析提供理论依据。

关键词 神经递质; 突触; SNARE复合体; 囊泡融合

Molecular Mechanisms of Neurotransmitter Release

Chen Yingqi^{1,2}, Zhang Chen^{1,2*}, Dong Wei^{3*}, Yang Xiaofei^{4*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; ³Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education and Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province, Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; ⁴College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Key Laboratory of Cognitive Science, Key Laboratory of Medical Information Analysis and Tumor Diagnosis and Treatment, Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, Wuhan 430074, China)

Abstract Neurons in the brain mainly rely on synapses to transmit information between cells. Neurotransmitters are released from presynaptic neurons to synaptic space, converting electrical signals into chemical signals. The released transmitters bind to corresponding postsynaptic receptors, causing the opening of receptor channels and then the conversion of chemical signals into postsynaptic electrical signals. So far, the molecular mechanism of calcium-triggered neurotransmitter release mediated by SNARE complex has been well understood, and the basic model of vesicle fusion has been widely recognized. However, there are still problems unsolved. This paper reviews the recent research on the molecular mechanism of neurotransmitter release, so as to provide a theoretical basis for the further analysis of important molecules during neurotransmitter release.

Keywords neurotransmitter; synapse; SNARE complex; vesicle fusion

1 神经递质释放简介

在人的大脑中存在千亿级别的神经细胞

(neuron), 这些神经细胞主要是依赖于神经突触 (synapses)进行细胞间信息传递。神经突触(主

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2017YFA0105201、2014CB942804)和国家自然科学基金(批准号: 31670842、31670850)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18612791932, E-mail: czhang@ccmu.edu.cn; Tel: 0830-3160619, E-mail: dongwei@swmu.edu.cn; Tel: 15271869616, E-mail: sunlittleyfly@hotmail.com
This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2017YFA0105201, 2014CB942804) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670842, 31670850)

*Corresponding authors. Tel: +86-18612791932, E-mail: czhang@ccmu.edu.cn; Tel: +86-830-3160619, E-mail: dongwei@swmu.edu.cn; Tel: +86-15271869616, E-mail: sunlittleyfly@hotmail.com

网络出版时间: 2018-12-29 14:10:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181229.1409.002.html>

要为化学性突触)主要由突触前结构(presynaptic terminals)、突触间隙(synaptic clefts)、突触后结构(postsynaptic terminals)和支持细胞(主要是胶质细胞)组成^[1]。神经递质是在突触传递中担任“信使”的特定化学物质,它主要储存在突触前结构的囊泡中。Katz^[2]致力于研究神经肌肉接头,建立了突触传递基本途径的架构,神经和肌肉之间的突触传递是最早开始研究且了解最透彻的神经递质释放过程。动作电位引起的突触前去极化可以使电压敏感钙离子通道打开从而导致钙离子内流,进入胞内的钙离子直接触发囊泡和突触前膜的融合,融合孔的形成引起囊泡内容物(神经递质)从突触前释放到突触间隙中,将突触前的电信号转变为突触间隙的化学信号。释放的递质与突触后的相应受体结合,引起受体通道的打开从而介导离子流动产生电位变化,实现突触间隙的化学信号转变为突触后的电信号。这样,突触前神经细胞的电信号就通过突触这一结构跨细胞传递给突触后的细胞,并表现为突触后细胞的电信号^[1]。释放的神经递质与突触后膜上受体结合完成使命后,可以酶解(乙酰胆碱)或通过胞吞作用回收至囊泡(乙酰胆碱以外递质)填充囊泡储备^[3]。由此可见,神经递质释放这个过程是神经信号传导的关键过程,保证了神经信号在神

经细胞之间的精确、快速传递。神经递质释放紊乱是多种疾病(包括阿尔兹海默症^[4]和帕金森症^[5]等)的病因。

2 递质释放过程中重要的分子及其功能

虽然不同类型的囊泡包含的神经递质不同,但是神经递质释放过程的分子机制相对保守,包括囊泡拴系(tethering)、锚定(docking)、启动(priming)和膜融合(fusion)几个过程^[6]。神经递质释放主要是由可溶性N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感因子附着蛋白的受体蛋白(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptors, SNARE)^[7]、Sec1/Munc18样蛋白(Sec1/Munc18-like protein, SM)^[8]、突触结合蛋白(synaptotagmin, Syt)^[9]、复蛋白(complexin)、突触前膜内蛋白13(Munc13)、钙离子依赖的分泌活化蛋白(CAPS)和GTP结合蛋白(Rab)及其效应物等蛋白控制,这些突触结构中的囊泡释放相关蛋白示意见图1。

2.1 SNARE复合体

SNARE蛋白家族在哺乳动物中包含超过60个成员,进化上保守,广泛地分布在细胞质膜、内质网、线粒体和过氧化物体中介导胞吐作用的膜融合步骤^[7]。Rothman等^[10]于1993年提出SNARE

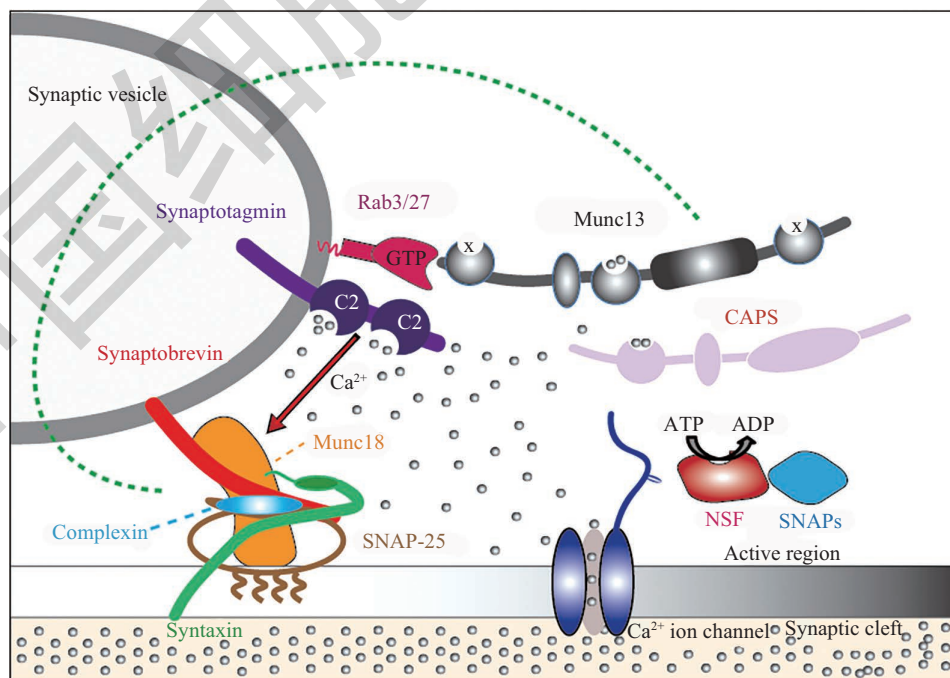


图1 突触结构中的囊泡释放相关蛋白示意图

Fig.1 Schematic diagram of vesicle release related proteins in synapses

假设, 将其分为位于囊泡上的v(vesicle)-SNARE和位于靶标膜上的t(target)-SNARE两大类, 它们相互作用形成反式SNARE复合物介导膜融合。除此之外, 还按照SNARE成员在核心SNARE复合物互作位点(称零离子层)的结构特征将它们分为R(提供精氨酸组成零离子层)-SNARE和Q(提供谷氨酰胺组成零离子层)-SNARE。突触前神经元中介导神经递质释放的SNARE复合物包括三个不同的成员: 突触融合蛋白-1(syntaxin-1)、突触相关蛋白-25(synaptosomal-associated protein-25, SNAP-25)和囊泡相关膜蛋白2(vesicle-associated membrane proteins 2, VAMP2)^[10]。它们以1:1:1的比例聚合成稳定的三聚体结构, 即SNARE核心复合体。SNARE复合体十分稳定, 只有在温度达到82 °C或用高浓度的变性剂时, 才能被打开^[11]。SNARE复合体中VAMP2可划分至v-SNARE分类和R-SNARE分类, 而SNAP-25和syntaxin-1属于t-SNARE分类和Q-SNARE分类。SNARE家族是分子量小(20~30 kDa)的尾部锚定膜蛋白, 大多数SNARE通过C末端跨膜结构域锚定在膜上, 还有包括SNAP-25在内的已知的7种SNARE通过脂质修饰(例如异戊烯化或棕榈酰化)与膜结合^[12]。它们都具有一段由60~70个氨基酸组成的含有七肽重复区并能形成卷曲螺旋的保守SNARE基序。核心SNARE卷曲螺旋区由4个SNARE基序的 α -螺旋组成, 其中Syntaxin-1和VAMP分别提供一个 α -螺旋而SNAP-25提供两个 α -螺旋。该螺旋卷曲结构域像一个拉链, 通过将囊泡膜和突触前膜锚定拉近的方式介导神经递质释放^[13]。

体外实验已经证明, 仅有构成SNARE复合体的三种蛋白就能介导慢速的囊泡融合事件, 因此, SNARE复合体被认为是触发囊泡分泌的“最小机器”^[14]。构成SNARE复合体的蛋白功能十分重要, 敲除syntaxin-1或VAMP2的小鼠均致死。在构成SNARE复合体的3种蛋白中, syntaxin-1的结构和功能最为复杂。除了C末端跨膜结构域外, syntaxin-1还包含有N-端序列、H_{abc}结构域、连接区域(linker region)和包含有SNARE基序的H3结构域^[15]。与VAMP2相似, syntaxin-1提供SNARE基序的 α -螺旋倾向于与其跨膜结构域形成一个连续的 α -螺旋, 因此, 能将SNARE复合体4个 α -螺旋束形成产生的能量传递到细胞膜, 促进融合孔打开以完成神经递质释

放^[16]。有实验结果证实, 增加syntaxin-1或VAMP2的SNARE基序与跨膜结构域间的距离极大地降低了它们促进神经递质释放的能力^[17-18]。

2.2 SM蛋白

SM蛋白是与分泌密切相关的一类亲水性蛋白质, 不同物种中SM蛋白同源性不高, 但其功能高度保守^[19]。游离的SM蛋白存在于胞质中, 可以分为四个亚家族, 即Sec1/Munc18、Vps45、Sly1和Vps33^[20], 它们各自参与的途径有所不同: Sec1/Munc18亚家族参与胞吐过程, Vps45亚家族参与内吞过程, Sly1亚家族参与蛋白质合成途径, Vps33亚家族参与蛋白质降解途径。在神经递质释放过程中, Sec1/Munc18亚家族通过调节SNARE复合物组装介导囊泡锚定融合过程。SM蛋白分子形状呈弓形, 拥有三个结构域(称为结构域1、2、3), 中间有“V”形裂口。在神经递质释放过程中, 弓形结构一侧的空腔可以与闭合构象的syntaxin-1结合并使后者保持闭合构象, 从而抑制SNARE复合物的聚集形成^[21]。

Munc18-1是SM蛋白家族在脑中起主要作用的亚型。由它与syntaxin-1结合并维持syntaxin-1的闭合构象以阻止SNARE基序暴露。Munc18-1对分泌应起到负调控作用, 如在大鼠 β 细胞中过表达Munc18-1即对分泌起到抑制作用^[22]。然而缺失Munc18-1的神经元神经递质释放被完全阻止^[8], 说明Munc18-1是囊泡融合必需的蛋白。如何解释这一看似矛盾的结果困扰了研究者很长时间。最近有观点认为, Munc18-1维持syntaxin-1的闭合构象能避免syntaxin-1与SNAP25形成异源二聚体而影响正常SNARE复合体形成, 从而起到保护作用^[23]。除了与syntaxin-1结合外, Munc18-1还可能为部分形成的SNARE复合体提供反应平台^[24]。

2.3 Synaptotagmin(Syt)家族

SNARE复合体和SM蛋白都是神经递质释放不可缺少的蛋白, 但体外实验发现的SNARE复合体介导分泌的速度比体内神经信号传导的速度慢很多, 因此, 体内神经信号快速传导还需要其他蛋白的帮助。Syt是进化上保守的跨膜蛋白家族, 已知在哺乳动物中包含17个成员(Syt1-17), 它们作为钙离子感受器介导神经递质释放的启动, 也能不依赖钙离子介导囊泡的融合。Syt的存在极大加速了囊泡融合过程, 实现了毫秒级的神经递质释放。Syt蛋白

具有一个N-端跨膜结构域(N-terminal transmembrane region, TMR)和两个位于胞质中的C-端C2结构域(C2A和C2B)。C2结构域具有磷脂依赖性的钙离子结合位点, C2A可以结合3个钙离子, C2B结合2个^[25]。Syt蛋白家族中只有Syt1、2、3、5、6、7、9、10可以与钙离子结合, 尽管其他Syt成员也具有C2结构域, 但它们的C2结构域上没有形成合适钙离子结合位点的氨基酸残基^[26]。此外, Syt蛋白的胞内定位也不尽相同, 在细胞膜上或者囊泡膜上各有不同亚型的Syt蛋白表达。

虽然有多种Syt因具有钙离子结合能力而可能作为钙离子感受器调控分泌, 但不同亚型Syt与钙离子的亲和力不同, 故功能也不同。Syt1是目前研究最多的亚型, 主要负责促进囊泡同步释放(synchronous release)。敲除Syt1的小鼠出生致死, 其海马神经元的递质快速同步释放大量减少, 而异步释放(asynchronous release)增多^[27]。Syt2的序列和功能与Syt1相似, 但两者分布的脑区不同^[28]。Syt9也可以介导囊泡的快速释放, 但不如Syt1快^[29]。Syt7可能作为负责囊泡慢速异步分泌的钙离子感受器, 与Syt1分别调控不同的分泌过程^[26]。同时, Syt7也是突触易化(facilitation)的钙离子感受器^[30]。Syt10则在嗅球神经元中调节生长因子的释放^[31]。

2.4 复蛋白(complexin, Cpx)

Cpx, 也称synaphin, 是一种可以与SNARE复合体结合的可溶性小分子蛋白。哺乳动物中表达有4种亚型的Cpx, 其中Cpx1和Cpx2主要在中枢神经系统中表达, 而3和4亚型的Cpx蛋白主要在视网膜中表达^[32]。从结构上Cpx蛋白可以分为N末端区域、“附加” α -螺旋、“中心” α -螺旋和C末端区域四个区域。Cpx“中心” α -螺旋与SNARE复合体结合, 稳定后者的结构, 是实现Cpx功能的基础^[33]。

缺失Cpx1和Cpx2的小鼠出生致死, 说明Cpx在神经递质释放中起重要作用^[34]。研究表明, Cpx对囊泡快速同步释放起促进作用, 但对囊泡自发释放过程的作用在不同实验条件和实验对象中有所不同^[35-36]。Cpx蛋白功能呈区域依赖性, 除与SNARE复合体结合的“中心” α -螺旋外, Cpx的N末端区域主要影响递质快速同步释放, “附加” α -螺旋钳制递质自发释放, C末端区域则起到约束Cpx胞内定位和维持囊泡启动状态的作用^[37-39]。研究还表明, Cpx的大部分功能在进化过程中是保守的^[40]。

2.5 突触前膜胞内蛋白13(Munc13)和钙离子依赖的分泌活化蛋白(CAPS)

*Munc13*是线虫*unc13*基因在哺乳动物的同源物, 含有多个结构域。目前在哺乳动物中已发现有4种亚型的Munc13^[41], 在神经递质释放中起主要作用的是Munc13-1。Munc13-1上有可以和甘油二酯(DAG)结合的C1结构域, 3个C2结构域(分别是C2A、C2B、C2C)以及由多条 α -螺旋组成的MUN结构域^[42]。CAPS是一类在结构和功能上与Munc13有一定相似度的蛋白, 两者尤其在C末端结构域保守性较高。目前发现, 主要有CAPS1和CAPS2参与递质释放过程^[43]。

*Munc13-1*基因缺陷型小鼠出生致死, 且神经元中启动状态的囊泡大量减少^[44-45], 说明维持可释放囊泡库大小是Munc13-1的主要功能之一。相对而言, CAPS的功能研究较少。虽然发现CAPS与Munc13-1都是囊泡启动所需蛋白, 但两者之间的作用关系还不清楚^[46]。有研究表明, 与Munc13-1主要作用于突触囊泡(synaptic vesicle)不同的是, CAPS蛋白在致密核心囊泡(dense core vesicle)分泌中作用更强^[47]。

2.6 GTP结合蛋白(Rab)

Rab是一类具有GTP酶活性, 能结合和水解GTP的蛋白^[48]。Rab蛋白家族成员众多, 与突触囊泡相关的至少有3类: Rab3(Rab3A、3B、3C和3D)、Rab5和Rab11, 其中又以Rab3最为重要。结合GTP的Rab3定位到囊泡上, 而GTP水解成GDP后, Rab3又可以与囊泡脱离。Rab蛋白与突触囊泡膜结合, 将囊泡定位到适宜的膜位点上。研究还发现了Rab亲和蛋白(rabphilin)和Rab3相互作用蛋白(RIM)两类Rab3效应物^[49]。除了与胞吐过程密切联系, 不同亚型Rab蛋白也参与胞吞过程^[50]。

2.7 N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感因子(N-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF)和可溶性NSF附着蛋白(soluble NSF attachment protein, SNAP)

NSF是一类AAA-ATP家族酶, 它与SNAP结合能够水解ATP, 生成ADP和磷酸。在囊泡与质膜融合后, 反式SNARE复合物变成顺式SNARE复合物。顺式SNARE复合物可以被NSF和SNAP解聚, 释放出组成SNARE复合物的各种成分供再次形成反式SNARE复合物使用^[10]。而反式SNARE复合物不能被NSF和SNAP解聚。

除了上述蛋白, 其他许多蛋白如mint^[51]、CASK^[52]、tomosyn^[53]、CAST/ELKS^[54]等都可能参与与SNARE蛋白的结合和分泌调控过程。

3 递质释放过程的分子相互作用

在动作电位尚未到达神经末梢时, 包含神经递质的囊泡就在突触前膜活跃区(active zone)^[55]聚集, 为神经递质释放做准备。

在电压敏感钙离子通道开启之前, SM家族的Munc-18与SNARE家族的syntaxin-1的N-端序列及Habc结构域结合^[56]使其后者处于关闭构象。胞吐过程启动后, Munc13的MUN结构域通过与syntaxin-1的连接区域的相互作用^[57], 促进Munc-18与syntaxin-1复合物构象改变使syntaxin-1从闭合构象打开而暴露其SNARE基序, 然后与SNAP-25结合, VAMP2再与它们的复合物结合, 三聚体的SNARE复合物形成。核心区域的卷曲螺旋从N-端至C-端像拉链一般逐渐拉起, 迫使囊泡膜与突触前膜紧密相接导致亲水表面稳定性下降。此时, 复蛋白附着于SNARE复合物的卷曲螺旋结构域上, 稳定螺旋结构使囊泡处于预融合的阶段, 等待钙离子信号的到来^[58]。

当动作电位传递至神经末梢, 电压敏感钙离子通道打开从而导致突触前膜钙离子浓度升高, Syt1作为钙离子感受器发挥作用^[59]。Syt1通过C2结构域与钙离子结合从而启动膜融合^[60]。Syt1的C2结构域与钙离子结合后发生变构, 消除了对SNARE复合物的钳制作用; Syt1插入突触前膜, 使膜局部曲率增加, 显著降低了融合孔形成的能垒^[61]。

当囊泡与突触前膜融合而融合孔形成后, 囊泡内神经递质分子扩散进入突触间隙, 与后膜表面的相关受体分子结合, 引发离子跨膜流动从而产生突触后膜电位变化, 将信号进行传递。融合孔扩展将最初的“反式”SNARE复合物转化为“顺式”SNARE复合物, 此时胞质中的SNAP和NSF募集与SNARE复合物结合。在与SNAP结合时, NSF能发挥其ATP水解酶的作用, 使SNARE复合物在MgATP作用下分解为单体游离蛋白, 参与下一轮神经递质释放过程^[62]。

在整个神经递质释放调控过程中, 还涉及多种蛋白相互作用。例如, syntaxin-1除了与Munc18形成复合物, 并在Munc13帮助下暴露出SNARE

基序与SNAP25和VAMP2共同组成SNARE复合体外, 还能与Syt^[63]、Cpx^[64]、钙离子通道^[65]等相互作用; 而Munc13还与RIM相互作用, 参与突触前膜活跃区钙离子通道的募集^[66-67]; Munc18能与mint^[68]、DOC2^[69]等蛋白相互作用。随着对神经递质释放机制研究的深入, 一些原有的工作模型也被不断修正。例如早期研究认为, Munc13通过促进Munc18解离使syntaxin-1从闭合构型转变为开放构型并参与形成SNARE复合体^[70], 现在提出了Munc18可以与syntaxin-1的N-端序列结合参与SNARE复合体组装过程的模型^[21]; 因为Cpx和Syt与SNARE复合体的结合位点重叠, 早期认为结合了钙离子的Syt会取代Cpx而促进囊泡分泌^[58], 后来又发现了Cpx和Syt可以同时结合SNARE复合体的证据^[71], 提出了Cpx和Syt共同控制SNARE复合体组装的模型^[39]; 参与顺式SNARE复合物解聚的NSF和SNAP蛋白也被认为还有解聚syntaxin-1-SNAP25异源二聚体的功能^[23], NSF和SNAP的这一功能可能与维持syntaxin-1-Munc18复合物有关。显然, 多蛋白共同调控SNARE复合体介导的钙离子触发的神经递质释放过程还有很多秘密等待研究者去揭示。

4 结语和展望

经过20多年的研究, 对SNARE复合体介导的钙离子触发的神经递质释放分子机制已经有了深入理解, 囊泡融合的基本模型也得到了广泛认可, 但至少仍有一些问题没有解决: (1)调控神经递质分泌和神经内分泌使用的SNARE蛋白及其他调控蛋白的亚型几乎一致, 但调控如免疫系统分泌活动的蛋白亚型却不同。那么参与不同类型分泌的SNARE复合体蛋白亚型及其相关调控蛋白亚型如何决定? (2)有观点认为细胞膜上有些区域更利于发生囊泡融合, 就像“热点(hot spot)”一样。那么, SNARE复合物介导囊泡与突触前膜融合的具体位点如何选择? 细胞骨架及动力蛋白如何参与分泌位点选择过程? (3)囊泡与细胞膜融合机制和其他类型膜融合, 如胞内细胞器间膜融合的调控机制有哪些异同? (4)除调节囊泡融合的核心蛋白如SNARE复合体、Syt、SM蛋白外, 其他分泌调控蛋白的作用顺序、机制如何? (5)随着研究的深入, SNARE复合体蛋白、Syt蛋白、SM蛋白等重要分

泌调控蛋白依次进入研究者的视野, 那么是否还存在未知的调控神经递质释放的蛋白? (6)神经元中每个突触在接受一次信号刺激时囊泡的释放几率并不高, 且不同类型的突触释放几率差异很大, 那么囊泡释放的几率和顺序是如何决定的? 同一突触的不同囊泡是否具有不同的释放几率, 这种不同是如何调节的? (7)囊泡融合后需要经历从质膜上回收、酸化、重新填充神经递质等循环再利用过程, 这些过程需要哪些蛋白参与? 作用机制如何? (8)已有证据表明, SNARE及其相关蛋白不仅参与神经递质分泌, 也参与突触可塑性调节, 则这些蛋白调节神经递质分泌和突触可塑性的机制有什么异同? SNARE及其相关蛋白与不同时程记忆有何关系? (9)神经递质释放与不同神经、精神类疾病的关系如何? (10)除了介导囊泡融合外, SNARE复合物及其他分泌相关蛋白还被认为参与了轴突导向(axon guidance)和神经退变(neurodegeneration), 那么这些蛋白是否还调控神经元生长发育的其他过程? 调控机制如何?

在研究神经递质释放调控过程中, 电生理技术仍应是最直接的研究手段。但随着现代科技手段的发展, 如基因编辑、人工质膜、冷冻电镜、超分辨荧光成像、光遗传学等技术的综合应用和发展, 上述问题会得到更多的研究和解答, 治疗疾病的新的药物靶点也可能被发现。要最终解释神经递质释放的分子机制, 我们仍有很长的路要走。

参考文献 (References)

- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Section 21.4, neurotransmitters, synapses, and impulse transmission. *Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2000.
- Katz B. Nature of the nerve impulse. *Rev Mod Phys* 1959; 8(3): 629-38.
- Saheki Y, De Camill P. Synaptic vesicle endocytosis. *CSH Perspectives*, 9th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, a005645.
- Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Winessamuelson M, Zhang D, Dragatsis I, *et al.* Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature* 2009; 460(7255): 632-6.
- OM S, Fornai F, MG A, Takamori S, Geppert M, Jahn R, *et al.* Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience* 2003; 118(4): 985-1002.
- Han J, Pluhackova K, Böckmann RA. The multifaceted role of SNARE proteins in membrane fusion. *Front Physiol* 2017; 8: 5.
- Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 2013; 80(3): 675-90.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, *et al.* Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 2000; 287(5454): 864-9.
- Hefft S, Jonas P. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron principal neuron synapse. *Nat Neurosci* 2005; 8(10): 1319-28.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 1993; 75(3): 409-18.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, *et al.* Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *Embo J* 1994; 13(21): 5051-61.
- Vogel K, Roche PA. SNAP-23 and SNAP-25 are palmitoylated *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258(2): 407-10.
- Mcnew JA, Sogaard M, Lampen NM, Machida S, Ye RR, Lacomis L, *et al.* Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J Biol Chem* 1997; 272(28): 17776-83.
- Weber T, Zemelman BV, Mcnew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, *et al.* SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 1998; 92(6): 759-72.
- Fernandez I. Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 1998; 94(6): 841-984.
- Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R. Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 2009; 460: 525-8.
- Zhou P, Bacaj T, Yang X, Pang ZP, Südhof TC. Lipid-anchored SNAREs lacking transmembrane regions fully support membrane fusion during neurotransmitter release. *Neuron* 2013; 80(2): 470-83.
- Deák F, Shin OH, Kavalali ET, Südhof TC. Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *J Neurosci* 2006; 26: 6668-76.
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, *et al.* Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 2001; 31(4): 581-92.
- Hong W. SNAREs and traffic. *BBA-Mol Cell Res* 2005; 1744(2): 120-44.
- Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009; 323(5913): 474-7.
- Dong Y, Wan Q, Yang X, Bai L, Xu P. Interaction of Munc18 and Syntaxin in the regulation of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360(3): 609-14.
- Ma C, Su L, Seven AB, Xu Y, Rizo J. Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science* 2013; 339(6118): 421-5.
- Baker RW, Jeffrey PD, Zick M, Phillips BP, Wickner WT, Hughson FM, *et al.* A direct role for the Sec1/Munc18-family protein Vps33 as a template for SNARE assembly. *Science* 2015; 349(6252): 1111-4.
- Daw MI, Erdelyi F. Asynchronous transmitter release

- from cholecystokinin-containing inhibitory interneurons is widespread and target-cell independent. *J Neurosci* 2009; 29(36): 11112-22.
- 26 Xu J, Mashimo T, Südhof TC. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca²⁺ sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 2007; 54(4): 567-81.
- 27 Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 1994; 79: 717-27.
- 28 Pang ZP, Sun J, Rizo J, Maximov A, Südhof TC. Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca²⁺-triggered neurotransmitter release. *EMBO J* 2006; 25(10): 2039-50.
- 29 Bacaj T, Wu D, Yang X, Morishita W, Zhou P, Xu W, *et al.* Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron* 2013; 80(4): 947-59.
- 30 Jackman SL, Turecek J, Belinsky JE, Regehr WG. The calcium sensor synaptotagmin 7 is required for synaptic facilitation. *Nature* 2016; 529(7584): 88-91.
- 31 Cao P, Maximov A, Südhof TC. Activity-dependent IGF-1 exocytosis is controlled by the Ca²⁺-sensor Synaptotagmin-10. *Cell* 2011; 145(2): 300-11.
- 32 Reim K, Wegmeyer H, Brandstätter J H, Xue M, Rosenmund C, Dresbach T, *et al.* Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses. *J Cell Biol* 2005; 169(4): 669-80.
- 33 Maximov A, Südhof TC. Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science* 2009; 323(5913): 516-21.
- 34 Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Südhof TC, Brose N, *et al.* Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 2001; 104(1): 71-81.
- 35 Martin J A, Hu Z, Fenz KM, Fernandez J, Dittman JS. Complexin has opposite effects on two modes of synaptic vesicle fusion. *Curr Biol* 2011; 21(2): 106-13.
- 36 Xue M, Stradomska A, Chen H, Brose N, Zhang W, Rosenmund C, *et al.* Complexins are facilitators of neurotransmitter release at mammalian central excitatory and inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105(22): 7875-80.
- 37 Gong J, Lai Y, Li X, Wang M, Leitz J, Hu Y, *et al.* C-terminal domain of mammalian complexin-1 localizes to highly curved membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(47): E7590-9.
- 38 Kaeserwoo YJ, Yang X, Südhof TC. C-terminal complexin sequence is selectively required for clamping and priming but not for Ca²⁺ triggering of synaptic exocytosis. *J Neurosci* 2012; 32(8): 2877-85.
- 39 Yang X, Kaeserwoo YJ, Pang ZP, Xu W, Südhof TC. Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary CaSensor via its accessory α Helix. *Neuron* 2010; 68(5): 907-20.
- 40 Yang X, Pei J, Kaeser-woo YJ, Bacaj T, Grishin NV, Südhof TC. Evolutionary conservation of complexins: from choanoflagellates to mice. *EMBO Rep* 2015; 16(10): 1308-17.
- 41 Koch H, Hofmann NK. Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J* 2000; 349(Pt 1): 247-53.
- 42 Yang X, Shen W, Yi S, Zhang M, Zou W, Wu L, *et al.* Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(7): 547-54.
- 43 Jockusch WJ, Speidel D, Sigler A, Sørensen JB, Varoqueaux F, Rhee JS, *et al.* CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell* 2007; 131(4): 796-808.
- 44 Kang L, He Z, Xu P, Fan J, Betz A, Brose N, *et al.* Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic beta cells. *Cell Metab* 2006; 3(6): 463-8.
- 45 Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 1999; 400(6743): 457-61.
- 46 James DJ, Martin TFJ. CAPS and Munc13: CATCHRs that SNARE vesicles. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 187.
- 47 Speese S, Petrie M, Schuske K, Ailion M, Ann K, Iwasaki K, *et al.* UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2007; 27(23): 6150.
- 48 Mignogna ML, D'Adamo P. Critical importance of RAB proteins for synaptic function. *Small GTPases* 2017; 9(1/2): 1-13.
- 49 Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 1997; 388(6642): 593-8.
- 50 Shi A, Grant BD. Interactions between Rab and Arf GTPases regulate endosomal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate during endocytic recycling. *Small GTPases* 2013; 4(2): 106-9.
- 51 Ho A, Morishita W, Atasoy D, Liu X, Tabuchi K, Hammer RE, *et al.* Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family. *J Neurosci* 2006; 26(50): 13089-101.
- 52 Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, *et al.* Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(7): 2525-30.
- 53 Pobbati AV, Razeto A, Böddener M, Becker S, Fasshauer D. Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *J Biol Chem* 2004; 279(45): 47192.
- 54 Dong W, Radulovic T, Goral RO, Thomas C, Suarez MM, Guerrerogiven D, *et al.* CAST/ELKS proteins control voltage-gated Ca²⁺ channel density and synaptic release probability at a mammalian central synapse. *Cell Rep* 2018; 24(2): 284.
- 55 Liu K S, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, *et al.* RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 2015; 334(6062): 1565-9.
- 56 Zhou P, Pang ZP, Yang X, Zhang Y, Rosenmund C, Bacaj T. Syntaxin-1 N-peptide and H_{abc}-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *Embo J* 2013; 32(1): 159-71.
- 57 Wang S, Choi UB, Gong J, Yang X, Li Y, Wang AL, *et al.* Conformational change of syntaxin linker region induced by Munc13s initiates SNARE complex formation in synaptic exocytosis. *EMBO J* 2017; 36(6): 816-29.
- 58 Wang T, Li L, Hong W. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* 2017; 18(12): 767-75.
- 59 Chapman ER, Davis AF. Direct interaction of a Ca²⁺-binding

- loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J Biol Chem* 1998; 273(22): 13995-4001.
- 60 Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Südhof TC. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell* 2006; 126(6): 1175-87.
- 61 Krishnakumar SS, Kümmel D, Jones SJ, Radoff DT, Reinisch KM, Rothman JE. Conformational dynamics of calcium-triggered activation of fusion by synaptotagmin. *Biophys J* 2013; 105(11): 2507-16.
- 62 Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 1997; 90(3): 523-35.
- 63 Zhou Q, Lai Y, Bacaj T, Zhao M, Lyubimov AY, Uervirojnangkoom M, *et al.* Architecture of the Synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature* 2015; 525(7567): 62-7.
- 64 Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Araç D, Machius M, Südhof TC, *et al.* Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 2002; 33(3): 397-409.
- 65 Zamponi GW. Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* 2003; 92(2): 79-83.
- 66 Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, *et al.* RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 2011; 144(2): 282-95.
- 67 Deng L, Kaeser PS, Wei X, Südhof TC. RIM proteins activate vesicle priming by reversing auto-inhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 2011; 69(2): 317-31.
- 68 Okamoto M, Südhof TC. Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31459-64.
- 69 Verhage M, de Vries KJ, Røshol H, Burbach JP, Gispen WH, Südhof TC. DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron* 1997; 18(3): 453-61.
- 70 Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N. Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 1997; 272(4): 2520-6.
- 71 Xu J, Brewer KD, Perez-Castillejos R, Rizo J. Subtle interplay between synaptotagmin- and complexin-binding to the SNARE complex. *J Mol Biol* 2013; 425(18): 3461-75.