

全く新しいトモシンによる小胞融合の制御機構

匂坂敏朗

神経機能の発現において、小胞輸送はシナプスでの神経伝達物質の放出や軸索の伸長に重要な働きをしている。これら小胞輸送には SNARE 複合体が最も重要な小胞融合装置として機能しているが、最近私共は全く新しいトモシンによる SNARE 複合体の活性制御機構を見出している。トモシンは、SNARE 複合体形成の抑制作用と SNARE 複合体多量体形成の促進作用の二つの作用により、強力に小胞融合を抑制する。また、この相反する二つの作用は分子内相互作用により活性調節されている。トモシンは、酵母からヒトまで保存された Lgl ファミリーに属しており、その中でトモシンは進化的に最も起源が古い。したがって、トモシンによる SNARE 複合体の活性制御機構は、進化的に保存された普遍的な小胞融合制御機構と考えられる。

1. はじめに

トモシンは、シンタキシン-1 に結合するタンパク質として私共が単離、同定したタンパク質である¹⁾。トモは日本語の友だち、シンはシンタキシンのことで、シンタキシンの友だちという意味である。N 末側領域に 14 個の WD 40 リピートを、その後に tail 領域、C 末側領域に VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) と似た SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) モチーフ様の領域を有する (図 1A)。トモシンは、Lgl (lethal giant larvae) ファミリーに属する。Lgl 遺伝子の構造上の特徴として N 末側の 14 個の WD40 リピートの繰り返し (7 個の WD40 リピートで一つの β プロペラー構造をとり、二つの β プロペラー構造を持つと考えられる) があり、現在では酵母からヒトまで進化的に保存されたファミリーを形成していることが知られている (図 1B)。ファミリーの中で、Lgl のみが tail 領域と VAMP 様領域を有していない。ショウジョウバエでがん抑制遺伝

子として見出された Lgl は、ほ乳類の上皮細胞において極性形成や細胞接着形成に必須の役割をしていることが知られている²⁾。Sro7 と Sro77 は、酵母において分泌小胞のエキソサイトosis を調節していることが知られている³⁾。Lgl, トモシン, Sro7 はいずれも普遍的膜融合装置である SNARE 系タンパク質と結合することから⁴⁾、SNARE 系に依存した小胞輸送の調節との関係が指摘されているが、ファミリーに共通した作用は明らかにはなっていない。Lgl ファミリーの中ではトモシンと Sro7 が進化上最も起源が古い⁵⁾。単細胞真核生物から後生動物への進化の過程で、トモシンの遺伝子重複により Lgl 遺伝子が生じたと考えられている。従って、トモシンや Sro7 の作用機構を明らかにすることは、Lgl ファミリー分子の機能を理解する上で大変重要である。これまで、私共はトモシンに着目して研究を行ってきた。本稿では、トモシンの作用機構について、これまで得られた私共の成果を紹介する。なお、脊椎動物の神経系において、トモシン-1 は脳全体に多く発現し、トモシン-2 は脳内のごく限られた領域にのみ発現している⁶⁾。以降では、トモシン-1 を単にトモシンと呼ぶことにする。

2. SNARE によるシナプス小胞の融合制御機構

神経細胞が次の神経細胞に情報を伝えるシナプス伝達の主たる過程は、神経伝達物質の放出により行われている。従って、神経伝達物質の放出の過程を解明していくこと

神戸大学大学院医学研究科生理学・細胞生物学講座膜動態学分野 (〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1)

Novel roles of tomosyn in regulated vesicle fusion
Toshiaki Sakisaka (Division of Membrane Dynamics, Department of Physiology and Cell Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Kobe 650-0017, Japan)

本総説は 2008 年度奨励賞を受賞した。

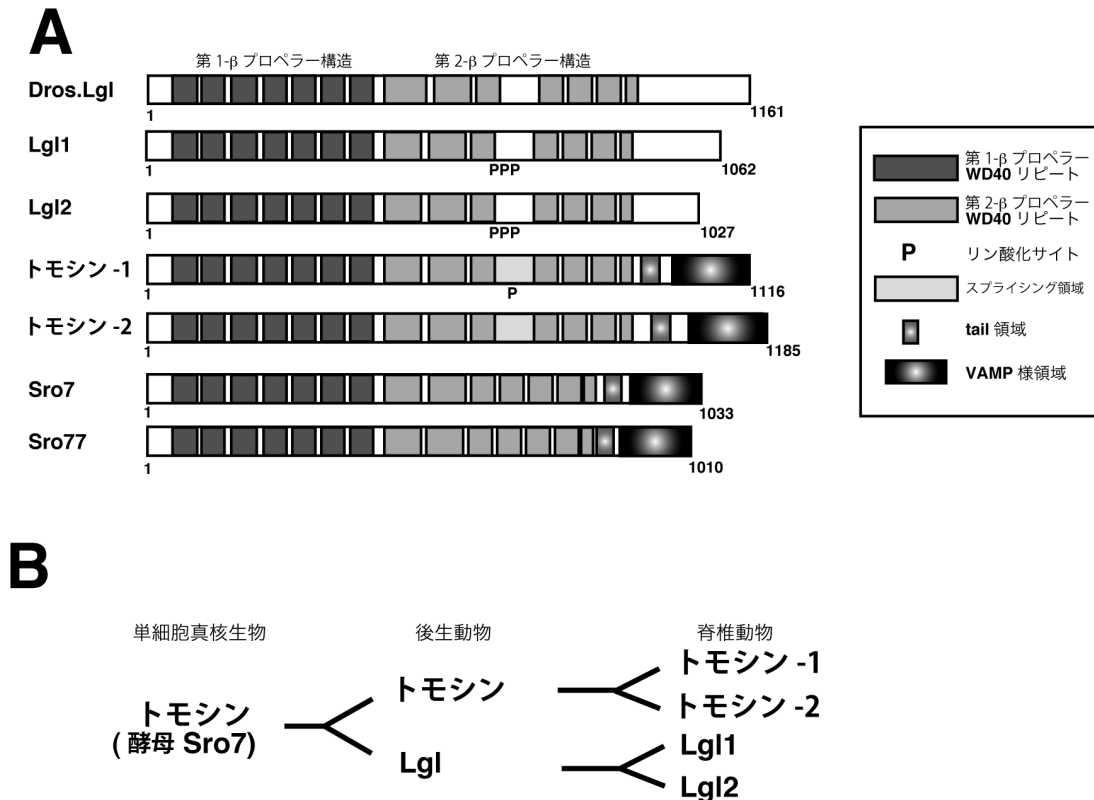


図1 Lgl ファミリー

(A) Lgl ファミリーには、神経細胞において神経伝達物質の放出を調節するトモシン、酵母において分泌小胞のエクソサイトosisを調節する Sro7 と Sro77 が含まれる。Lgl ファミリーの構造上の特徴は、N 末側の 14 個の WD40 リピート（前半 7 個の WD40 リピートで第 1-β プロペラー構造をとり、後半 7 個の WD40 リピートで第 2-β プロペラー構造をとる）である。トモシン、Sro7、Sro77 は、WD40 リピートの他に tail 領域と VAMP 様領域を持つ。トモシンには、後半 3 個目と 4 個目の WD40 リピートの間に異なったスプライシングを受ける領域がある。

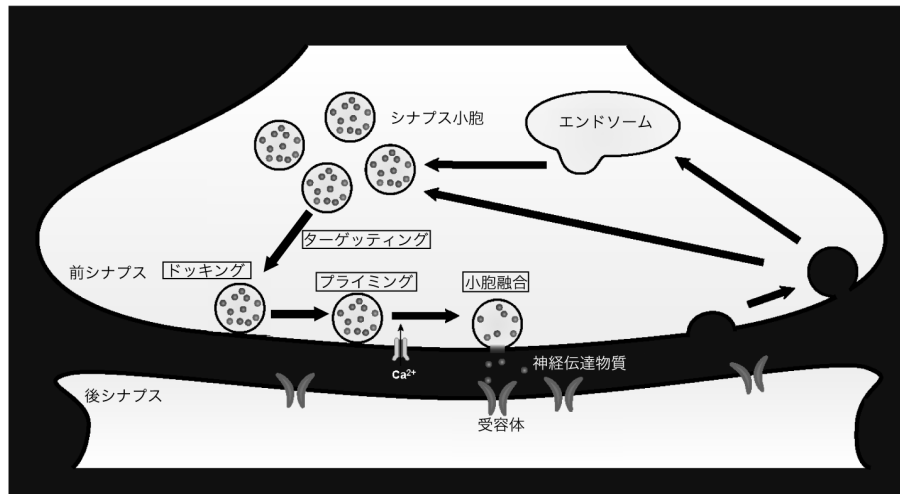
(B) Lgl ファミリーの中で、トモシンと Sro7 が進化上最も起源が古い。Lgl は、単細胞真核生物から後生動物への進化の過程で、トモシンの遺伝子重複により生じたと考えられる。

は、シナプスの可塑性ひいては記憶形成の過程を理解する上で重要である。神経繊維を伝わってきた活動電位がシナプス終末を脱分極させると、電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが開き、 Ca^{2+} がシナプス前部に流入する。神経伝達物質の放出は、この流入した Ca^{2+} が引き金になって引き起こされる。まず、シナプス小胞はシナプス前膜（ターゲットとなる膜）に運ばれる（ターゲッティング）（図 2A）。シナプス小胞は、アクティブゾーンにおいて、シナプス前膜の Ca^{2+} チャンネルの近傍にドッキングした状態（ドッキング）になり、さらに Ca^{2+} 濃度の上昇に応答できる状態に成熟する（プライミング）。 Ca^{2+} が流入した際、 Ca^{2+} チャンネル周辺の局所的に上昇した Ca^{2+} 濃度に依存して、シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり、シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。ターゲッティングには Rab3A 系のタンパク質、ドッキングと融合には普遍的膜融合装置を構成する SNARE 系のタンパク質、そしてプライミングにはアクティブゾーン構成タンパク質が関与して

いる。

SNARE 系のタンパク質はシナプス前膜に局在するシンタキシン-1、SNAP-25 と、シナプス小胞の膜に局在する VAMP2 により構成される（図 2B）。シンタキシン-1 には一つ、SNAP-25 には二つ、VAMP2 には一つの SNARE モチーフと呼ばれる保存された領域がある⁷⁾。シンタキシン-1、VAMP2 は C 末端の膜貫通領域により、シナプス前膜とシナプス小胞にそれぞれ局在している。SNAP-25 には膜貫通領域はなく、翻訳後修飾により中央付近に脂質が付加されることで、シナプス前膜に局在する。シンタキシン-1、SNAP-25、VAMP2 の四つの SNARE モチーフが集まり三者複合体（SNARE 複合体）を形成し、シナプス小胞がシナプス前膜にドッキングする。シナプス小胞融合時には、SNARE 複合体の四つの SNARE モチーフが安定なヘリックス状構造を形成し、ジッパーを閉じるような要領でシナプス小胞膜とシナプス前膜を近づけ、膜融合を引き起こすと考えられている（zippering 仮説⁷⁾。実際、シンタ

A



B

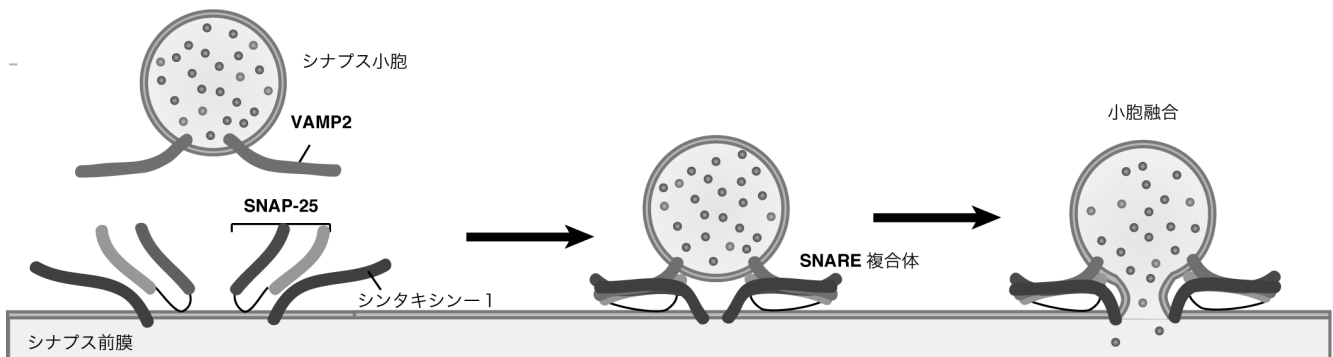


図2 神経伝達物質の放出機構

(A) シナプス小胞はシナプス前膜に運ばれ(ターゲッティング), シナプス前膜の Ca^{2+} チャンネルの近傍にドッキングした状態(ドッキング)になる。そして, Ca^{2+} 濃度の上昇に応答できる状態に成熟し(プライミング), Ca^{2+} チャンネルによる Ca^{2+} の流入に依存して, シナプス前膜とシナプス小胞の融合が起こり, シナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。

(B) シナプス前膜に局在するシンタキシン-1, SNAP-25 と, シナプス小胞の膜に局在する VAMP2 が SNARE モチーフを介して三者複合体 (SNARE 複合体) を形成し, シナプス小胞がシナプス前膜にドッキングする。SNARE 複合体は, ジッパーを閉じるような要領でシナプス小胞膜とシナプス前膜を近づけ, シナプス小胞をシナプス前膜に融合させる。

キシン-1, SNAP-25, VAMP2 を組み込んだリボソームが膜融合を引き起こすことが明らかにされている⁸⁾。SNARE モチーフを持つタンパク質はシンタキシン-1, SNAP-25, VAMP2 以外にも細胞内に数多く存在し, それらはそれぞれ, 小胞体-ゴルジ体間輸送, ゴルジ体-細胞膜間輸送等の様々な細胞内小胞輸送において, 輸送小胞とターゲット膜との融合を行っている。このように SNARE 系タンパク質は普遍的膜融合装置として機能している。しかし一方, シンタキシン-1, SNAP-25, VAMP2 を組み込んだリボソームの膜融合は, 実際のシナプス小胞とは違って Ca^{2+} 非依存的に融合が起こり, 融合速度もシナプス小胞よりも極め

て遅い (シナプス小胞はサブミリ秒単位, リボソームは分単位で融合する)。これらのことは, シナプス小胞のシナプス前膜への融合は, 神経に特異的な SNARE 調節機構が存在していることを示している。

3. トモシンの C 末端 VAMP 様領域による SNARE 制御機構

トモシンの C 末端 VAMP 様領域はシンタキシン-1, SNAP-25 と結合し, SNARE 複合体に似たヘリックス状構造の複合体 (トモシン複合体) を形成する (図 3A)。トモシンは, トモシン複合体を形成することにより SNARE 複

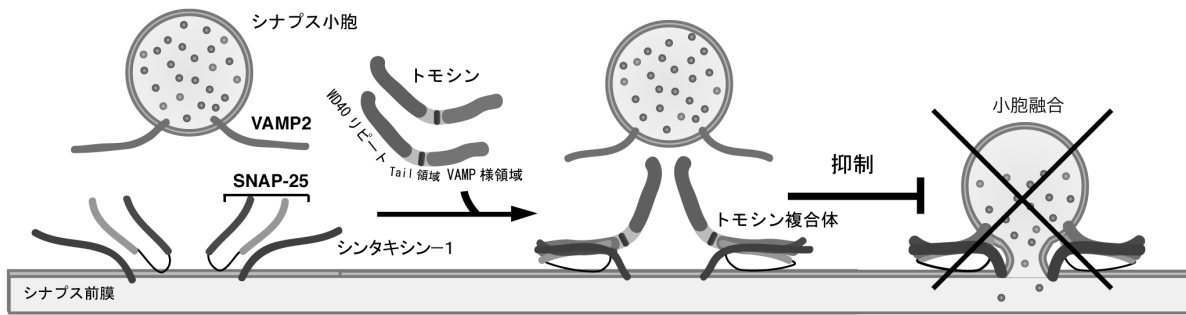
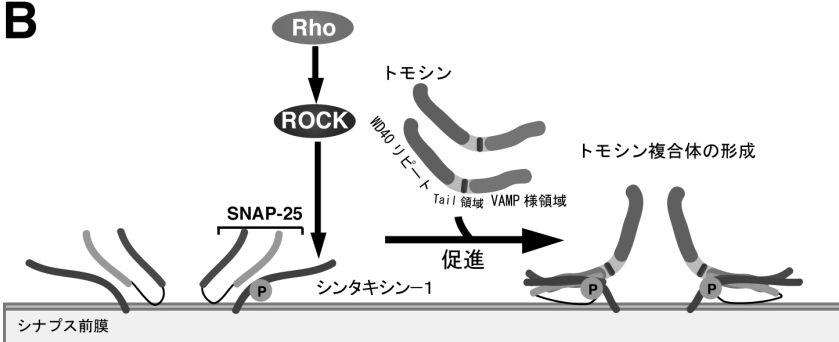
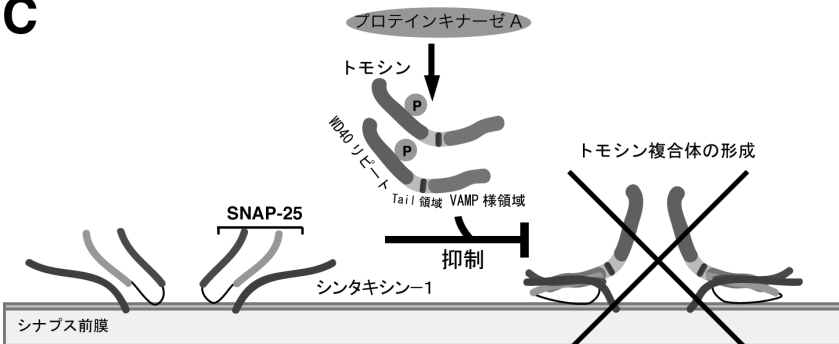
A**B****C**

図3 トモシンのC末端 VAMP 様領域によるトモシン複合体の形成

(A) トモシンはC末端 VAMP 様領域を介して、シンタキシン-1, SNAP-25 と結合し、前シナプス膜上でトモシン複合体を形成する。トモシン複合体の形成は、SNARE 複合体の形成を阻害し、シナプス小胞の融合を抑制する。

(B) Rho-ROCK 系が活性化されると、ROCK がシンタキシン-1 をリン酸化する。リン酸化されたシンタキシン-1 はトモシンへの結合親和性が強くなり、トモシン複合体の形成を促進する。

(C) PKA はトモシンの第2-βプロペラー構造内のセリンをリン酸化する。リン酸化されたトモシンはシンタキシン-1 への結合親和性が低下し、トモシン複合体の形成が抑制される。

合体の形成を阻害し、シナプス小胞のシナプス前膜への融合を抑制することを私共は明らかにしている¹⁾。また、トモシン複合体の形成がシグナル分子である Rho 低分子量 G タンパク質-ROCK (Rho-kinase) 系とプロテインキナーゼ A (PKA) により調節されていることも私共は明らかにしている。Rho-ROCK 系が活性化されると、シンタキシン-1 がリン酸化される。リン酸化されたシンタキシン-1

はトモシンへの結合親和性が強くなり、トモシン複合体の形成が促進される (図 3B)⁹⁾。Rho-ROCK 系は、トモシンの作用を強める on switch として働く。詳細は後述するが、伸長中の軸索において、トモシンは Rho-ROCK 系による活性調節を受けることにより、膜成分供給小胞の軸索先端での融合を促進し、軸索を伸長させる (図 7)。また他のグループは、副腎髄質クロム親和性細胞において、この

Rho-ROCK 系によるトモシンの活性調節機構が大型有芯小胞の分泌を調節していることを報告している¹⁰⁾。一方、PKA はトモシンの第 2- β プロペラー構造内のセリンをリン酸化する (図 1A)¹¹⁾。リン酸化されたトモシンは C 末端 VAMP 様領域とシンタキシン-1 との親和性が低下し、その結果、トモシン複合体の形成が抑制される (図 3C)。PKA は、トモシンの作用を弱める off switch として働く。培養ラット上頸交感神経細胞において、トモシンは PKA による活性調節を受けることにより、SNARE 系を介してアセチルコリンの放出を制御する。トモシンは、C 末端 VAMP 様領域を介して、SNARE 複合体の形成を抑制することにより、神経伝達物質の放出に抑制的に働くと考えられた。また VAMP 様領域の活性は、シグナル伝達により調節されることが明らかになった。

4. トモシンの N 末側領域の WD40 リピートによる SNARE 制御機構

トモシンの生理機能を調べるために、私共はトモシンのノックアウトマウスを作成した。トモシンノックアウトマウスの海馬苔状繊維シナプスの神経伝達を電気生理的に調べたところ、神経伝達が亢進し、神経伝達物質の放出確立が増大していた¹²⁾。また、線虫のトモシン変異体では神経伝達が亢進することが報告されている^{13,14)}。これらの結果は、トモシンがシナプス小胞の融合に抑制的に働いていることを示しており、これまでの知見と一致する。上述のごとく、トモシンは C 末の VAMP 様領域を介してトモシン複合体を形成することにより、SNARE 複合体の形成を抑

制する。そのため、トモシンノックアウトマウスでは、トモシンの欠如により細胞内の SNARE 複合体量が増加し、神経伝達が亢進したと推察された。これを確かめるために、トモシンノックアウトマウスの脳内の SNARE 複合体量を調べたところ、予想に反して、トモシンノックアウトマウスでは SNARE 複合体量が著しく減少していた¹²⁾。また、SNARE 複合体の推定分子量は約 50 kDa であるのに対し、検出された SNARE 複合体は 110 kDa 以上であった。そこで、SNARE 複合体形成におけるトモシンの役割を、精製タンパク質を用いて試験管内で調べた。シンタキシン-1、SNAP-25、VAMP2 を様々な濃度のトモシンと試験管内で反応させたところ、推定分子量に合致する分子量約 50 kDa の SNARE 複合体が形成した。一方で、トモシンの添加量依存的に、マウス脳で見られたような 110 kDa 以上の SNARE 複合体が形成された。50 kDa と 110 kDa 以上の SNARE 複合体の形態をそれぞれ電子顕微鏡で観察したところ、50 kDa の SNARE 複合体は棒状であるのに対し、110 kDa 以上の SNARE 複合体は、棒 (50 kDa SNARE 複合体) が複数集合した形状をしていた。以上の結果より、トモシンは SNARE 複合体を集合させ、多量体の形成を促進する活性があることが明らかとなった (図 4)。SNAP-25 を二つの SNARE モチーフの間の領域 (ヒンジ領域) で切断すると、単量体の SNARE 複合体は形成するが、多量体は形成されない。このことから、SNARE 複合体は SNAP-25 のヒンジ領域を介して多量体化していると考えられる。様々なトモシンのフラグメントを作成して SNARE 複合体の多量体形成を検討したところ、トモシンの N 末側の

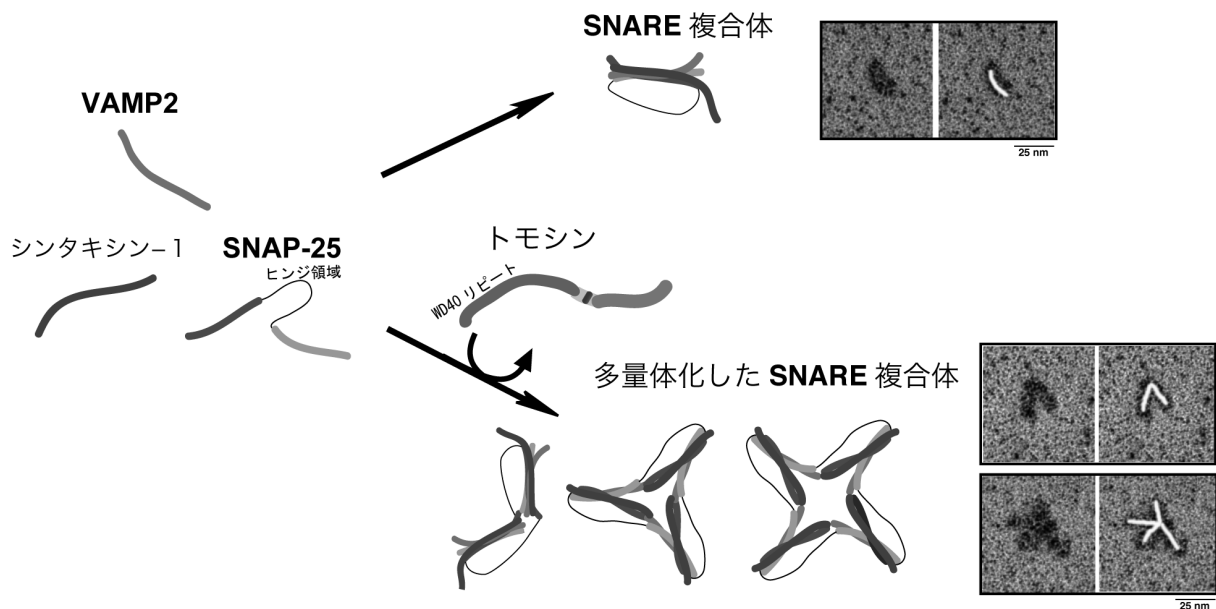


図 4 トモシンの N 末側 WD40 リピートによる SNARE 複合体の多量体形成

トモシンの N 末側 WD40 リピートは、SNARE 複合体の多量体形成を促進する。SNARE 複合体は SNAP-25 のヒンジ領域を介して多量体化していると考えられる。写真はシャドウイング法により観察した SNARE 複合体の電子顕微鏡像。

WD40 リピートが SNARE 複合体の多量体形成を促進していた。また、トモシンの N 末側の WD40 リピートを含むフラグメントをマイクロインジェクションした培養ラット上頸交感神経細胞では、アセチルコリンの分泌が顕著に抑制された¹²⁾。これらの結果から、トモシンは N 末側 WD40 リピートにより SNARE 複合体を多量体化し、シナプス小胞の融合を抑制していることが明らかとなった。

5. tail 領域によるトモシンの活性調節機構

C 末端の VAMP 様領域による SNARE 複合体形成の抑制作用と N 末側の WD40 リピートによる SNARE 複合体の多量体形成促進作用の二つの作用により、トモシンが強力にシナプス小胞の融合を抑制することを述べた。最近、私共はこの相反する二つの活性が、二つの領域をつなぐ tail 領域により調節されることを明らかにした (図 5)¹⁵⁾。トモシンの tail 領域は C 末端の VAMP 様領域と WD40 リピートの両方にそれぞれ結合する。tail 領域が C 末端の VAMP 様領域に結合すると、VAMP 様領域の SNARE 複合体形成に対する抑制作用が阻害された。tail 領域の WD40 リピートに対する結合は、tail 領域の VAMP 様領域に対する結合よりも親和性が高かった。全長のトモシンでは、tail 領域が WD40 リピートに結合し、VAMP 様領域を露出させ、SNARE 複合体形成を抑制する。また同時に、

tail 領域が WD40 リピートに結合することにより、WD40 リピートによる多量体形成作用を低下させる。この tail 領域の分子内結合の調節因子として、PKA によるリン酸化が一つの候補として考えられる。PKA によるリン酸化は、トモシンの WD40 リピートによる SNARE 複合体の多量体形成活性を促進し、C 末 VAMP 様領域によるトモシン複合体形成を低下させる。従って、トモシンはリン酸化により構造を変化させている可能性が考えられる。tail 領域を介した分子内結合による活性制御とリン酸化による活性制御との機能-構造関係は、これからの重要な課題である。

一方、酵母 Lgl ファミリー分子の Sro7 の結晶構造の解析が行われ、tail 領域が N 末側 WD40 リピートの β プロペラー表面に結合していることが明らかにされている¹⁶⁾。さらに、Sro7 の WD40 リピートが Sec9 (酵母の SNAP-25 ホモログ) の SNARE モチーフと直接結合し、tail 領域がその結合を阻害することが示された。これらより、tail ドメインと WD40 リピートの分子内結合に伴う構造変化により、Sro7 は SNARE 複合体の形成を調節しているというモデルが提案されている。この Sro7 のモデルは、tail ドメインと WD40 リピートの分子内結合に伴う構造変化により、VAMP 様領域を露出させ、SNARE 複合体の形成を抑制するという私共のモデルとは違っている。構造解析された Sro7 は tail 領域までのフラグメントであり、VAMP 様領域を含んだ全長の結晶構造解析ではない。そのため、このような相違点が出たものと考えられる。今後は、このようなトモシンのダイナミックな構造変化と活性制御の関係を構造生物学の立場から明らかにしていきたいと考えている。

6. トモシンによるシナプス小胞のドッキング過程の調節

アクティブゾーンには非常に多数のシナプス小胞が常時存在している一方、シナプス前膜にドッキングしてプライミング状態にあるのは極少数のシナプス小胞のみである。この極少数のシナプス小胞だけが、活動電位による Ca^{2+} 流入に反応することができ、シナプス前膜に融合する。また、1 回の刺激に対して 1 個のみ小胞は融合する。このように、アクティブゾーンに存在するシナプス小胞の総数から見れば、シナプス小胞の融合の効率は非常に悪い。しかし、この融合効率の悪さにより絶えずシナプス小胞がプールされ、神経活動に依存した神経伝達物質の連続した放出が可能になっている。これまで、ドッキングはプライミングへ移行するために必須の過程で、シナプス小胞の融合に促進的な役割を果たしていると考えられていた。しかし、SNARE 複合体の多量体形成がシナプス小胞の融合を抑制するという事実は、強いドッキングがシナプス小胞の融合にむしろ抑制的に働く過程である可能性を示唆している。トモシンは SNARE 複合体を多量体化することでドッキン

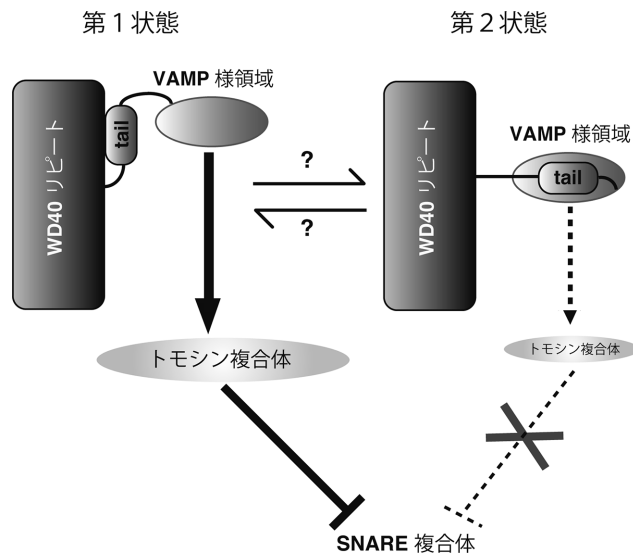


図5 tail 領域によるトモシンの活性調節機構

第1状態では、tail 領域が N 末側 WD40 リピートに結合することにより、C 末端 VAMP 様領域が露出している。C 末端 VAMP 様領域がシンタキシン-1、SNAP-25 と結合し、トモシン複合体を形成する。トモシン複合体の形成は、SNARE 複合体の形成を阻害する。

第2状態では、tail 領域が C 末端 VAMP 様領域に結合することにより、C 末端 VAMP 様領域を隠している。トモシン複合体の形成が抑制される。その結果、SNARE 複合体の形成が促進される。

グを強め、プライミングへの移行を抑制することで融合する小胞の数を適切に調節し、神経活動に依存した神経伝達物質の連続した放出に寄与している可能性がある。実際、トモシンノックアウトマウスの海馬で2発刺激増強 (paired-pulse facilitation) を調べたところ、野生型に比べて顕著な減少が観察された¹²⁾。このことは、トモシンの欠損によりドッキングによるプライミング抑制がなくなり、1回目の刺激で過剰な数のシナプス小胞が融合してしまったため、2回目の刺激応答に必要なシナプス小胞数が減少したと解釈できる。

これまでに得られた知見をもとに私共は、トモシンは図6のような分子機構でシナプス小胞のドッキング過程を調節し、シナプス小胞の融合効率を調節していると考えている。トモシンのC末端のVAMP様領域は、シナプス前膜上でシンタキシン-1、SNAP-25とトモシン複合体を形成する。トモシン複合体はドッキングを阻害しながら、シンタキシン-1、SNAP-25を小胞融合の場所に濃縮していく。次に、何らかの機序で、tailドメインがWD40リピートから外れ、VAMP様領域と結合する。それにより、VAMP様領域がシンタキシン-1—SNAP-25複合体から外れる。露出したトモシンのN末側のWD40リピートは、シナプス前膜上で触媒のように働いてVAMP2とシンタキシン-1—SNAP-25複合体との結合を促進し、SNARE複合体を形成する。さらにSNARE複合体の多量体化を促進し、シナプス小胞を強くドッキングする。強いドッキングはプライミングへの移行を抑制する。その後、何らかの機序で、ドッキングが弱められてプライミング状態になり、 Ca^{2+} の流入によりシナプス小胞が融合する。トモシンによるドッキング状態の強弱により、神経伝達物質の放出確率が決定されることが考えられる。トモシンとunc13のバランスによりプライミングが調節されているという線虫における

報告^{13,14)}を考えると、Munc13 (unc13のほ乳類ホモログ)はSNARE複合体の脱多量体化に関係している可能性がある。また、強いドッキングの解除には、 α -SNAP、NSFによるSNARE複合体の解離が関係しているのかもしれない。N末側のWD40リピートがSNARE複合体を多量体化する活性と、C末端のVAMP様領域がSNARE複合体形成を阻害する活性が相互に競合的であるということ、私共は生化学的解析により明らかにしている¹²⁾。したがって、この二つの阻害活性はシナプス前膜上で何らかの方法で適切に調節されていると考えられる。実際私共は、PKAによるトモシンのリン酸化が、C末端VAMP様領域の活性を低下させる一方、N末側WD40リピートによるSNARE複合体の多量体化活性を促進することを明らかにしている^{11,12)}。シナプス可塑性を検討した結果、トモシンノックアウトマウスでは長期増強に変化がない一方、短期増強の低下が観察された¹²⁾。したがって、このような調節されたトモシンによるシナプス小胞のドッキング制御は、短期可塑性において重要な役割をしていると考えられる。

7. 小胞輸送による軸索伸長のメカニズム

また私共は、トモシンによる小胞融合抑制が、神経細胞の軸索形成にも重要な役割をしていることを明らかにしている⁹⁾。軸索が急速に伸長する一つのメカニズムとして、小胞輸送により膜成分が軸索の先端端へ選択的に多く運ばれて、そこで膜が融合し、さらにそこでのアクチン細胞骨格などの再編成により、軸索の伸長が起こる考えられている。膜タンパク質やリン脂質を含んだ小胞が、微細管を介して運ばれ、小胞が融合して細胞膜が進展し、さらに軸索が伸長する (図7A)。この小胞融合も膜融合装置であるSNARE系タンパク質により制御されている。小胞には、VAMP2が存在し、形質膜にはSNAP-25とシンタキシン-1

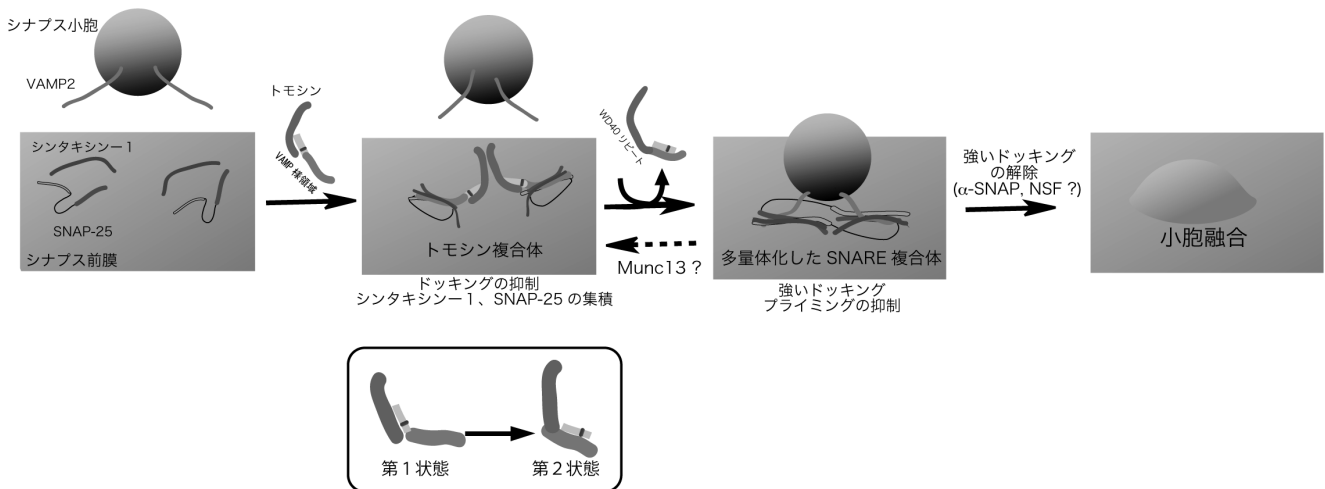


図6 トモシンによるシナプス小胞のドッキング制御のモデル
詳しくは本文参照。

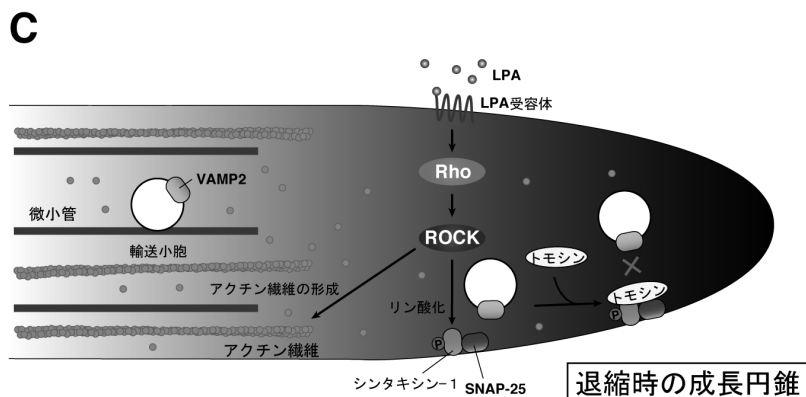
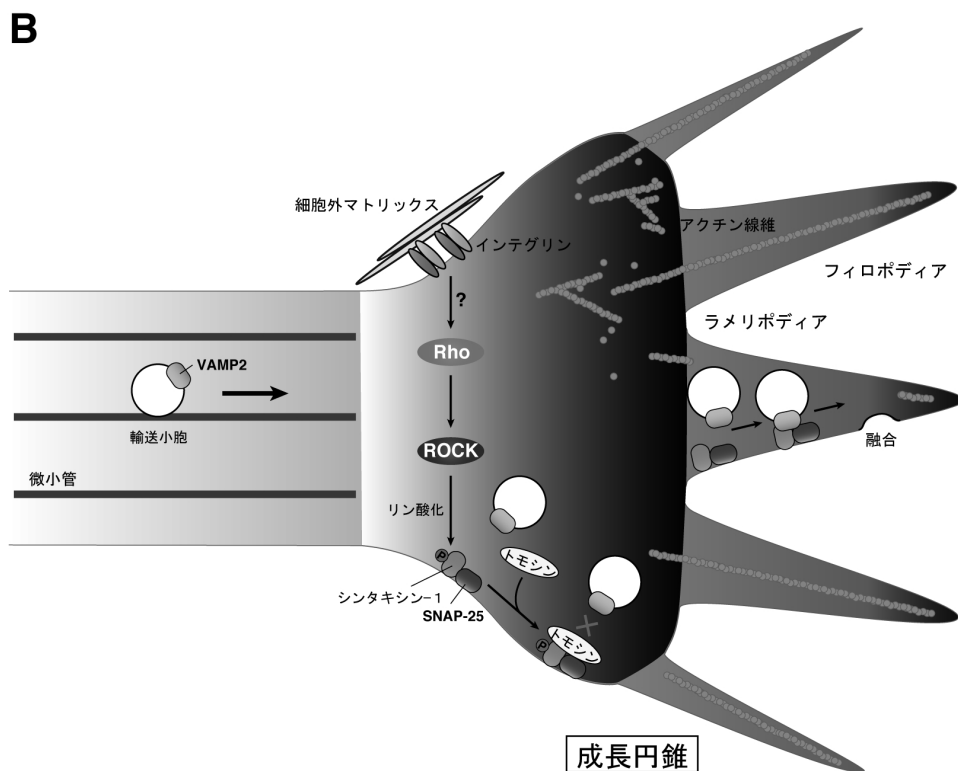
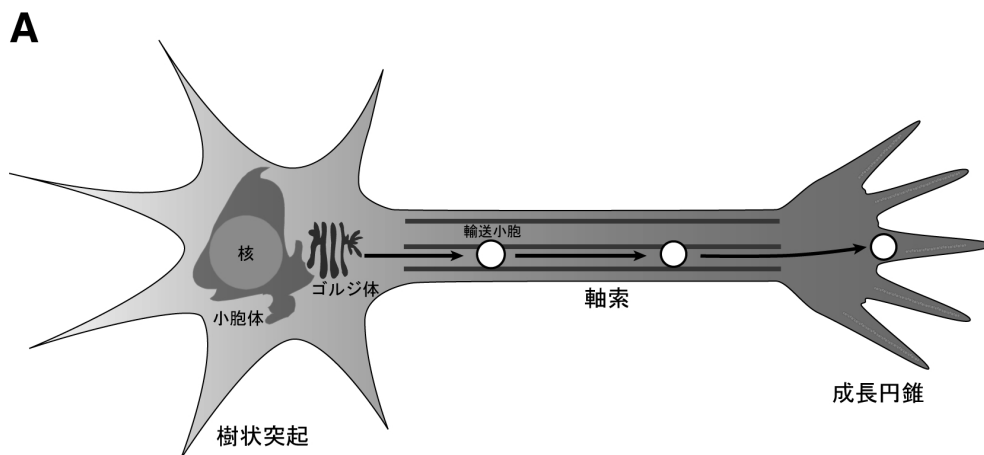


図7 軸索伸長・退縮時におけるトモシンの作用

(A) 軸索伸長時の小胞輸送
膜タンパク質やリン脂質を含んだ小胞が、ゴルジ体から微小管を介して運ばれ、成長円錐で小胞が融合して細胞膜が進展し、さらに軸索が伸長する。

(B) 軸索伸長時のトモシンの作用
成長円錐においてトモシンが手のひらの部分に局在することで、そこでの小胞融合を抑制する。これにより、先端端での小胞融合を促進し、軸索の伸長を起こす。

(C) 軸索退縮時のトモシンの作用
トモシンが退縮した神経突起の形質膜全体にわたって存在する。形質膜への小胞融合の抑制とアクチンミオシン依存性の張力増強の二つが協調して軸索を退縮させる。詳しくは本文参照。

が存在する。VAMP2, SNAP-25, シンタキシン-1 が SNARE 複合体を成長円錐の先端端で形成して小胞が形質膜にドッキングし、さらに融合し、細胞膜が進展する (図 7B)。シンタキシン-1 を特異的に分解する毒素を作用させると、成長円錐を退縮させて神経突起の進展が停止する¹⁷⁾。退縮した成長円錐には膜小胞が融合した巨大空胞が蓄積する。このように SNARE 系タンパク質による細胞膜表面積の拡大が成長円錐の形態変化や運動と密接に関係している。しかし、SNARE 系タンパク質は細胞膜全体にわたってひろく分布しており¹⁸⁾、どこにでも小胞融合が起こる可能性がある。私共は、軸索伸長では、ある特定の場所で活発に小胞融合が起こることが必要であるので、小胞融合ができない場所 (exclusive cue) を作ることで、小胞融合する場所を決め、軸索伸長を制御するのではないかと考えた。

軸索伸長をしている海馬初代培養神経細胞では、シンタキシン-1 が細胞膜全体にわたって存在し、VAMP2 が細胞質内全体に小胞様に存在していたのに対し、トモシンは軸索の先端端より少し後方に局在し、成長円錐の手に例えると手のひらにあたる部分に局在していた⁹⁾。私共は、トモシンが成長円錐の手のひらの部分に局在することで、そこでの小胞融合を抑制し、神経突起の伸長と退縮に関与しているのではないかと考えた。トモシンを海馬初代培養神経細胞に過剰発現させると、軸索の伸長を抑制した。トモシンを RNAi でノックダウンしたところ、軸索の伸長が抑制され、また細胞体から多数の神経突起が出て、枝分れが多く見られた。次に、このトモシンの成長円錐での局在の分子メカニズムについて検討したところ、Rho-ROCK 系によって制御されていた。伸長している軸索の成長円錐の手のひらの部分において、細胞外基質との接着により Rho-ROCK 系が活性化されると、シンタキシンがリン酸化され、トモシンへの結合親和性が強くなり、トモシン複合体を形成した (図 7B)。これにより、成長円錐の手のひらの部分での SNARE 複合体の形成を抑制し、そこでの小胞融合を抑制した。その結果、より先端端での小胞融合を促進し、神経突起がより伸長した。このようなエキソサイトーシスの調節機構は全く新しい概念で、トモシンが exclusive cue として小胞融合できない場所を作ることにより小胞融合する場所を決め、軸索伸長を促進していると考えられる。

一方、リゾホスファチジン酸 (LPA) 刺激による軸索退縮時には、ROCK がトモシン-SNARE 系とアクトミオシン系を活性化した。形質膜にあるシンタキシンをリン酸化し、トモシン複合体を退縮した神経突起の形質膜全体にわたって形成した (図 7C)。形質膜への小胞融合の抑制とアクトミオシン依存性の張力増強の二つが協調して軸索を退縮させた。このように、Rho-ROCK 系がトモシンを介して SNARE 系を制御し、小胞融合を調節することにより、

細胞骨格系と小胞輸送のクロストーク機構も制御していると考えられる。

8. おわりに

本稿では、私共のトモシンのこれまでの研究成果を述べた。トモシンはシナプス小胞のドッキングを制御する極めて重要な分子であると考えられる。シナプス小胞の定常的な細胞膜ドッキングは刺激の存在下のみ膜融合が起きる調節性分泌経路でのみ認められ、間断なく膜融合が起きる他の細胞内輸送経路では認められないことが知られている。トモシンが SNARE 複合体を多量体化することにより、シナプス小胞を細胞膜に強固にドッキングさせる。この SNARE 複合体の多量体化が、ドッキングしているシナプス小胞の自発的分泌を防ぐ膜融合抑制過程であると考えられる。これまでドッキングは分泌を促進すると考えられていたが、トモシンの研究により、“ドッキングは分泌を抑制する過程”という全く新しい概念を物質的に提示することができたと考えている。しかし、まだまだ未解決の多くの問題が残っている。tail 領域を介した分子内結合による活性制御の機能-構造関係は、これからの重要な課題である。トモシンにはスプライシングバリエントが 3 種類 (big, medium, small) ある¹⁹⁾。二つ目の β プロペラー構造を持つと考えられる 7 個の WD40 リピードの中の 3 番目と 4 番目にある挿入配列の長さの違いにより、3 種類に分けられている。この挿入配列の長さによる tail 領域を介した分子内結合の調節も考えられる。実際に、medium と small は神経に多く発現しており、big は脳以外の多くの他の臓器に広く発現している。また、脳での medium と small の発現パターンの違いによる神経回路調節も考えられる。今後は、トモシンのダイナミックな構造変化と活性制御の関係を構造生物学の立場から明らかにしていきたいと考えている。

最後に、本稿で述べた研究成果は、高井義美先生をはじめ、これまでご指導頂いた先生方ならびに一緒に研究を行った数多くの大学院生のご協力の賜物であり、心から感謝したい。また、本稿で述べた研究の一部は他のグループとの共同研究によって行われたものであり、共同研究者に心から感謝したい。

文 献

- 1) Fujita, Y., Shirataki, H., Sakisaka, T., Asakura, T., Ohya, T., Kotani, H., Yokoyama, S., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Scheller, R.H., & Takai, Y. (1998) *Neuron*, 20, 905-915.
- 2) Yamanaka, T. & Ohno, S. (2008) *Front. Biosci.*, 13, 6693-6707.

- 3) Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E., & Brennwald, P. (1999) *J. Cell Biol.*, **146**, 125–140.
 - 4) Müsch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W.J., Rodriguez-Boulan, E., & Brennwald, P.J. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 158–168.
 - 5) Kloepper, T.H., Kienle, C.N., & Fasshauer, D. (2008) *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2055–2068.
 - 6) Groffen, A.J., Jacobsen, L., Schut, D., & Verhage, M. (2005) *J. Neurochem.*, **92**, 554–568.
 - 7) Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 631–643.
 - 8) Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., & Rothman, J.E. (1998) *Cell*, **92**, 759–772.
 - 9) Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Izumi, G., Yasumi, M., & Takai, Y. (2004) *J. Cell Biol.*, **166**, 17–25.
 - 10) Gladysheva, S.E., Lam, A.D., Liu, J., D'Andrea-Merrins, M., Yizhar, O., Lentz, S.I., Ashery, U., Ernst, S.A., & Stuenkel, E. L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 22887–22899.
 - 11) Baba, T., Sakisaka, T., Mochida, S., & Takai, Y. (2005) *J. Cell Biol.*, **170**, 1113–1125.
 - 12) Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., Nakamura, M., Nishikawa, K., Ishizaki, H., Okamoto-Tanaka, M., Miyoshi, J., Fujiyoshi, Y., Manabe, T., & Takai, Y. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 323–337.
 - 13) McEwen, J.M., Madison, J.M., Dybbs, M., & Kaplan, J.M. (2006) *Neuron*, **51**, 303–315.
 - 14) Gracheva, E.O., Burdina, A.O., Holgado, A.M., Berthelot-Grosjean, M., Ackley, B.D., Hadwiger, G., Nonet, M.L., Weimer, R.M., & Richmond, J.E. (2006) *PLoS Biol.*, **4**, e261.
 - 15) Yamamoto, Y., Mochida, S., Kurooka, T., & Sakisaka, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 12480–12490.
 - 16) Hattendorf, D.A., Andreeva, A., Gangar, A., Brennwald, P.J., & Weis, W.I. (2007) *Nature*, **446**, 567–571.
 - 17) Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., & Komiyama, Y. (1996) *J. Cell Biol.*, **134**, 205–215.
 - 18) Garcia, E.P., McPherson, P.S., Chilcote, T.J., Takei, K., & De Camilli, P. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 105–120.
 - 19) Yokoyama, S., Shirataki, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 218–222.
-