

瀬藤 光利^{1,2,3}, Ron M.A. Heeren⁴, Markus Stoeckli⁵,
新聞 秀一¹, 松本 峰男²

(¹ 大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所,

² 三菱化学生命科学研究所・分子加齢医学研究グループ,

³ 東京工業大学大学院生命理工学研究科,

⁴ FOM Institute for Atomic and Molecular Physics

FOM-AMOLF,

⁵ DTC/Analytical and Imaging Sciences,

Novartis Institute for Biomedical Research)

Mass microscopy

Mitsutoshi Setou,^{1,2,3} Ron M.A. Heeren,⁴ Markus Stoeckli,⁵
Shuichi Simma,¹ and Mineo Matsumoto² (¹National Institutes
of Natural Sciences, National Institute for Physiological Science,
5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan;
²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Molecular Gerontology
Group, 11 Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194-8511, Japan;
³Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of
Biological Information, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-chou,
Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 226-8503, Japan; ⁴FOM Institute
for Atomic and Molecular Physics FOM-AMOLF, Kruislaan 407,
1098 SJ Amsterdam, The Netherlands; ⁵DTC/Analytical and Imaging
Sciences, Novartis Institute for Biomedical Research, WSJ-386.2.02,
CH-4002, Basel, Switzerland)

エキソサイトーシスの生化学的解析最新事情

はじめに

ニューロンの軸索末端には、神経伝達物質の貯蔵細胞内小器官であるシナプス小胞が多数存在する。活動電位が神経終末に到達すると、カルシウムの流入に伴い、シナプス小胞膜と細胞膜の膜融合が喚起され、神経伝達物質の放出が起こる。この過程は、エキソサイトーシスと呼ばれ、活動電位の到達から数ミリ秒以内のごく短時間に完了する。エキソサイトーシスに伴う膜融合は、内分泌細胞のホルモン分泌や細胞内物質輸送に伴う膜融合のプロトタイプとして、歴史的に盛んに研究されており、膜融合の分子装置の解明は、細胞生物学の大きな命題の一つとなっている。本稿では、近年、発展著しい人工膜再構成系を用いた膜融合研究の成果を俯瞰すると共に、エキソサイトーシスの中心

的な細胞内小器官であるシナプス小胞の分子構造にまつわる最新知見を概説する。

1. SNARE タンパク質は人工二重膜の膜融合を促進する

ボツリヌス毒素やテタヌス毒素は、神経終末に作用しエキソサイトーシスを阻害する。これらの毒素は、タンパク質分解酵素であり、エキソサイトーシスを支える SNARE タンパク質^(脚注)として知られるシナプス小胞膜上に存在する v(vesicular)-SNARE の synaptobrevin と、細胞膜上に存在する t(target)-SNARE の syntaxin 1 と SNAP-25 を特異的に切断することで、エキソサイトーシスを阻害する。これら神経終末に存在する SNARE タンパク質は、真核細胞の進化を通じて保存されており、哺乳類では 35 個以上の SNARE タンパク質が同定されている。SNARE タンパク質の各イソ型は、細胞内の異なる膜上に分布し、局所での膜融合反応を司っている。1980 年代に提唱された「膜融合の SNARE 仮説」を検証する試みは、近年、人工脂質二重膜へのタンパク質の再構成実験に突入した。まず、Rothman らのグループは、v-SNARE と t-SNARE を別々のリボソームに再構成させ、蛍光プローブを挿入することで、リボソーム間の膜融合を検出するアッセイ系を確立した¹⁾。すなわち、一方の v-SNARE リボソームには、蛍光標識させた脂質を用い(ドナー)、非標識の t-SNARE リボソーム(アクセプター)と混合した後、温度を 37℃ に上げると、ドナーとアクセプター間の膜融合が喚起され、蛍光標識された脂質の密度の低下に伴うシグナルの増大が観察された。この実験から、v-SNARE と t-SNARE の組合せによるタンパク質複合体(SNAREpin と命名)は、膜融合を触媒する最小ユニットであることが実証された。しかしながら、この実験結果は、シナプス小胞のエキソサイトーシスと比べると、異なる点が幾つかある。まず、第一にスピードの問題が挙げられる。シナプス小胞のエキソサイトーシスは、数ミリ秒で完了するのに対し、リボソーム間で観察される膜融合反応は、分オーダーと明らかに遅い。次に、膜融合の制御の問題である。実際のエキソサイトーシスは、カルシウム濃度に非常に感受性が高く、定常状態

(脚注) SNARE: soluble-N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor の略。全ての SNARE タンパク質は 70 アミノ酸程度からなる SNARE モチーフと呼ばれる領域を持つ。SNARE モチーフの中心に保存されたアミノ酸により、R-SNARE と Q-SNARE に分類され、一つの R-SNARE モチーフと三つの Q-SNARE モチーフの計四つの SNARE モチーフ部位が、SDS 抵抗性の強固なタンパク質複合体を形成する。

での膜融合は何らかの機構で阻害されているはずである。一方、リポソーム再構成系で見られる膜融合は、温度を上げただけで誘起され、カルシウム濃度に依存しない。これらの相違点は、リポソームへの SNARE 再構成実験に用いるタンパク質量・タンパク質/脂質モル比・脂質組成等の最適化が必要である可能性や、SNARE タンパク質以外の別の修飾分子の必要性を示唆している。次章より、近年、これらの問題点を解決するきっかけとなった最新の知見を紹介する。

2. Complexin/Synaptotagmin による膜融合の制御

エキソサイトシスのカルシウムセンサーとして、シナプス小胞膜上のカルシウム結合タンパク質である synaptotagmin が、その第1候補として研究されてきた^{2,3)}。ところが、synaptotagmin を synaptobrevin と共に二重膜に再構成すると、確かに膜融合は促進されるが、この促進効果はカルシウム非存在下でも起こることが示された⁴⁾。その後、膜貫通部位を欠いた組換え synaptotagmin タンパク質が、カルシウム依存的に SNARE 依存的膜融合を促進することが明らかになった⁵⁾。生体内で、synaptotagmin の断片が、可溶性型として存在するか否かは、未だ明確ではない。

一方、定常状態で SNARE 依存的膜融合反応を阻害する因子として、最近脚光を浴びたのが complexin である。complexin は、各々の SNARE タンパク質には親和性を持たないが、一旦 SNARE 複合体が形成されると、その SNARE 複合体と 1:1 で結合する能力を有する^{6,7)}。脂質二重膜の外層と内層の混合度合いを個別に感知できるように改良された膜融合再構成アッセイ系に complexin を加えると、内層の膜融合のみが特異的に阻害された。つまり、complexin は、既に形成された SNARE 複合体に結合することで、膜の外層の融合のみが可能な状態に保つ役割を果たしている (hemifusion 状態と呼ぶ。図1参照)。また、complexin によって hemifusion に保持された状態に synaptotagmin の可溶性部位を加えると、カルシウム依存的に急速な二重膜の完全融合が引き起こされることがわかった。これらの結果から、SNARE タンパク質による膜融合は、complexin/synaptotagmin の協調作用により、定常状態での膜融合進行阻害とカルシウム濃度上昇時の速い膜融合の喚起といった精密な制御を受けている可能性が提唱された^{8,11)}。

3. 再構成系での膜融合の加速因子

SNARE 依存的な膜融合のスピードは、どのように制御

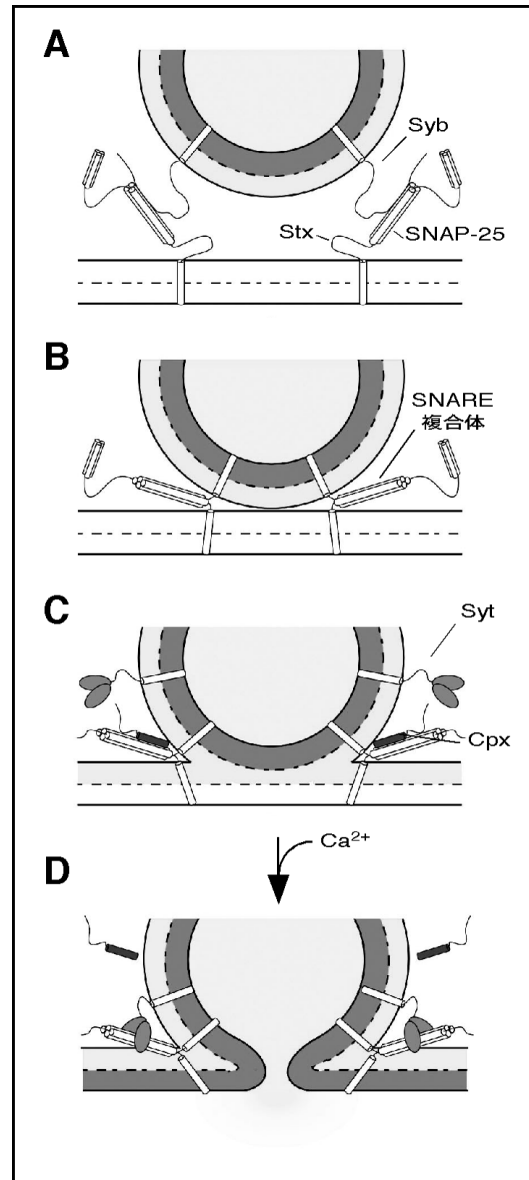


図1 開口放出の分子機構

(A→B) synaptobrevin (Syb)/syntaxin (Stx)/SNAP-25 が SNARE 複合体を形成することにより、小胞膜と形質膜の距離が縮まりドッキングと呼ばれる状態になる。(C) complexin (Cpx) が SNARE 複合体に結合すると膜融合の進行を阻害する。この状態は hemifusion と呼ばれ、二重膜の片側だけ脂質の混合が起こる。従来、プライミングと呼ばれていた状態であると考えられる。(D) 神経終末のカルシウム濃度が上昇すると、complexin に替わり synaptotagmin (Syt) が SNARE 複合体と形質膜のリン脂質に結合することで膜融合を急速に促し、伝達物質の放出を促す。

されているのであろうか？ v-SNARE と t-SNARE は、それぞれの N 末端側から SNARE 複合体形成を開始する (zippering-model)。in vitro では、t-SNARE である syntaxin と SNAP-25 は、それら 2 分子のみで 2:1 の複合体を形成することが知られており、完全な SNARE 複合体が形成されるためには、v-SNARE である synaptobrevin が、一つの syntaxin 分子と入れ替わる必要がある。興味深いことに、t-SNARE の 2:1 複合体のうち、syntaxin の 1 分子を synaptobrevin の C 末端側の短い断片と入れ替えた変異 SNARE 複合体を調製し、その状態 (synaptobrevin の N 末端の結合部位が占有されていない状態) で synaptobrevin の SNARE 複合体への導入効率を調べたところ、そのスピードが劇的に速くなることが示された¹⁰⁾。また、この組合せをリポソームに再構成した膜融合反応の速度亢進も確認された。この実験データは、SNARE 複合体の形成速度自体が膜融合再構成実験のスピードを決定する因子の一つであることを示唆すると同時に、シナプスにおいて、t-SNARE 2:1 複合体の N 末端側を空けておく (或いは開ける) 何らかの分子機構があることを想起させる。最近、syntaxin 結合タンパク質として同定されていた munc-18 が、SNARE 依存的膜融合再構成系において 20 倍もの膜融合効率の上昇を促すことが報告された¹²⁾。今後、munc-18

を始めとする SNARE タンパク質結合分子の膜融合における役割が、リポソーム再構成系を利用して明らかになることが期待される。

4. シナプス小胞膜構造モデルの構築

膜融合の再構成実験において、再構成に使用するタンパク質の量、タンパク質-脂質の分子比、リン脂質の組成が実験結果に大きな影響を与える。シナプス小胞を始めとした輸送小胞膜の構成分子組成とその分子比、特に小胞膜や形質膜における SNARE タンパク質や修飾タンパク質の「数」や「密度」に関する情報が乏しい中で、実験結果の比較や解釈は早計であろう。

筆者らは、ラット脳から精製したシナプス小胞画分を材料として、シナプス小胞膜に存在する構成分子の網羅的同定、主要なタンパク質や脂質の 1 小胞あたりのモル数の算出、小胞の物理学的特性等を多角的に解析し、平均的なシナプス小胞の分子構造モデルを作製した (図 2)¹³⁾。詳細なデータは原著に譲るが、この分子モデルから、膜融合や膜輸送に関連した重要な推測がなされた。[1] 一つのシナプス小胞は、約 300 個のタンパク質、約 7,000 個のリン脂質、約 5,000 個のコレステロールから構成される。[2] タンパク質:脂質の重量比は、約 2:1 であり、タンパク質が占有する割合が多く、小胞表面の大部分はタンパク質で覆われている。膜体積の約 20% はタンパク質の膜貫通領域によって占有され、リン脂質の多くは、タンパク質と接触することにより、動的束縛を受けている可能性が高い。[3] 膜融合や小胞輸送を担う SNARE タンパク質や Rab タンパク質群は、1 小胞あたり多数存在する。特に v-SNARE タンパク質である synaptobrevin は小胞タンパク質全体の 10% 近くを占め、数としては最も多い (約 70 個/小胞) (表 1 参照)。また、エキソサイトーシスに関わる SNARE タンパク質だけでなく、多彩な細胞内膜輸送 (エンドソームやリソソーム等) に関わる SNARE タンパク質が存在することから、シナプス小胞の一部は、周囲の内膜と絶え間なく融合している可能性がある。これらの情報は、今後の膜融合研究の新たな展開の礎となるものである。

終 わ り に

膜融合の分子基盤の根幹をなす「SNARE 仮説」が提唱されてから 20 年余りが経過し、ここで紹介した人工膜再構成系を用いた実験結果は、SNARE 仮説を支持するだけでなく、当初の疑問点であった膜融合のスピードや制御の

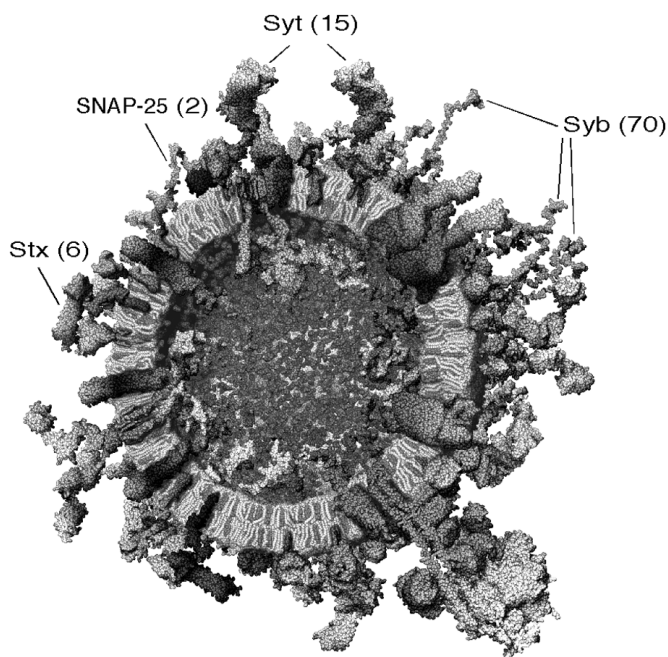


図 2 最新のシナプス小胞三次元構造模式図
文献 13 より改変。() 内は 1 小胞あたりの平均コピー数

表 1 平均的シナプス小胞の物理学的パラメーター

物理学的数値	
密度 (g/ml)	1.10
直径 (nm)	41.6
内腔容積 (l)	19.86×10^{-21}
神経伝達物質数 (150mM)	1,790
質量 (g)	29.6×10^{-18}
タンパク質：リン脂質 (w:w)	1.94
リン脂質：コレステロール (mol:mol)	1:0.8
主要タンパク質数	
Synaptophysin	31.5
Synaptobrevin	69.8
VGLUT1	9.0
Synapsin	8.3
Syntaxin	6.2
SNAP-25	1.8
Synaptotagmin	15.2
Rab3A	10.3
SV2	1.7
V-ATPase 複合体	0.7

文献 13 より抜粋

分子機構に対しても、幾つかの重要な解答を提供した。一方で、シナプス小胞の主要な構成成分のモル数が明らかになり、これまで行われてきた再構成実験で見られたデータのばらつきや整合性などの指標となることが期待される。近年、蛍光プローブを巧みに利用した細胞内でのタンパク質量の定量的解析にも道が拓かれ¹⁴⁾、complexin・munc-18等の可溶性タンパク質や形質膜に存在する t-SNARE タンパク質群のシナプス局所での量が推測可能になる日も近いだろう。

1) Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H., & Rothman, J.E. (1998) *Cell*, **92**, 759–772.
2) Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., & Jahn, R. (1992) *Science*, **256**, 1021–1025.
3) Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., & Südhof, T.C. (1994) *Cell*, **79**, 717–727.

4) Mahal, L.K., Sequeira, S.M., Gureasko, J.M., & Sollner, T.H. (2002) *J. Cell. Biol.*, **158**, 273–282.
5) Tucker, W.C., Weber, T., & Chapman, E.R. (2004) *Science*, **304**, 435–438.
6) McMahon, H.T., Missler, M., Li, C., & Südhof, T.C. (1995) *Cell*, **83**, 111–119.
7) Pabst, S., Margittai, M., Valnius, D., Jahn, R., & Fasshauer, D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7838–7848.
8) Schaub, J.R., Lu, X., Doneske, B., Shin, Y.-K., & McNew, J. A. (2006) *Nat. Struc. Mol. Biol.*, **13**, 748–750.
9) Giraudo, C.G., Eng, W.S., Melia, T.J., & Rothman, J.E. (2006) *Science*, **313**, 676–680.
10) Pobbati, A.V., Stein, A., & Fasshauer, D. (2006) *Science*, **313**, 673–676.
11) Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J., & Südhof, T.C. (2006) *Cell*, **126**, 1175–1187.
12) Shen, J., Tareste, D.C., Paumet, F., Rothman, J.E., & Melia, T. J. (2007) *Cell*, **128**, 183–195.
13) Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006) *Cell*, **127**, 831–846.
14) Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K., & Okabe, S. (2005) *Nat. Methods.*, **2**, 677–684.

高森 茂雄¹, Reinhard Jahn²

(¹ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
脳神経病態学分野,

21 世紀 COE プログラム「脳の機能統合とその失調」,
²Department of Neurobiology,
Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry)

Progress in molecular mechanisms of exocytosis
Shigeo Takamori¹ and Reinhard Jahn² (¹21st Century COE Program, Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8519, Japan; ²Department of Neurobiology, Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry, Fassberg 11, Göttingen D-37077, Germany)