

## 神経伝達物質放出における $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル複合体形成の生理的意義

### 1. はじめに

神経伝達は神経情報伝播における最も重要な素過程の一つである。前シナプス終末から放出された神経伝達物質が標的細胞（後シナプス）終末で受容されることで神経伝達が起こるが、活動電位に正確に応答して神経伝達が起こるためには、神経伝達物質の放出が厳密な制御を受ける必要がある。神経伝達物質の放出においては、活動電位に応じた前シナプス終末の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が必須であり、その分子メカニズムを解き明かすことは、神経生物学の大きな命題の一つに掲げられている。本小論では  $\text{Ca}^{2+}$  流入を担う電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル（以下  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと省略する）を中心に、神経伝達物質放出に関する最近の知見を概説する。

### 2. シナプス小胞と $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの距離の重要性

シナプス小胞が前シナプス終末と融合することで神経伝達物質の放出（開口放出）が起こる。その融合は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に起こることが知られており、 $\text{Ca}^{2+}$  の空間分布と開口放出については、詳細な検討がなされてきた。重要な研究としては、活動電位に応答した開口放出が起こるためには  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞が近接することが必須であると提唱された以下の研究が挙げられる<sup>1)</sup>。それは同程度の結合定数を持った  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤である EGTA (*O, O'*-bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid) と BAPTA (*O, O'*-bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid) を用いて証明された。イカの巨大シナプスにおいて、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する結合が早い BAPTA を前シナプス終末に加えると開口放出が劇的に弱められるが、BAPTA に比べて  $\text{Ca}^{2+}$  に対する結合速度が小さい EGTA を加えた場合には開口放出には影響がなかった。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを経由して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が素早く開口放出関連タンパク質に作用することを意味し、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞が近接していることが示唆された。その後も、 $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤およびケージド  $\text{Ca}^{2+}$  を使った実験結果と、その結果を基にしたシュミレーション結果から、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞との距離が 30 nm 以内において高効率な放出が起こると考えられている。また、神経伝達

物質の放出においては、活動電位と同期した放出 (synchronous release) と、活動電位に同期せずに時間的に遅れた放出 (asynchronous release) が知られるが、それらも開口放出メカニズムの違いではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞の距離で説明されている<sup>2)</sup>。

### 3. 神経伝達物質放出場としてのアクティブゾーン

神経伝達物質の放出は、前シナプスのアクティブゾーンと呼ばれる特殊な構造体で起こる。アクティブゾーンはタンパク質密度が非常に高く、電子顕微鏡で観察可能である。その形態はシナプスの種類によって異なるが、シナプス小胞、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的に開口放出を制御する分子装置である SNARE タンパク質 (syntaxin, SNAP-25, synaptobrevin) 等が、「足場」タンパク質 (RIM1, CAST, Munc13, Bassoon, Piccolo) を介して集積している (図 1)。高効率な神経伝達物質の放出やシナプス可塑性は、これらのタンパク質が機能的に共役することで実現すると考えられている。アクティブゾーン形成に関する代表的な研究成果としては、ショウジョウバエの神経筋接合部のアクティブゾーン形成に不可欠な Bruchpilot と呼ばれる分子の同定が挙げられる。Bruchpilot は哺乳類の CAST 類縁体であるが、その遺伝子が欠損するとアクティブゾーン形成、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの集積が損なわれ、それに伴い活動電位依存的な神経伝達物質放出も損なわれた<sup>3)</sup>。この成果は、アクティブゾーン足場タンパク質が  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、SNARE タンパク質、シナプス小胞の集積場形成を担っていることを強く示唆する。アクティブゾーンの構造および開口放出の詳細な分子メカニズムについては、大塚ら<sup>4)</sup>、高森ら<sup>5)</sup>の本誌への記述を参考にさせていただきたい。

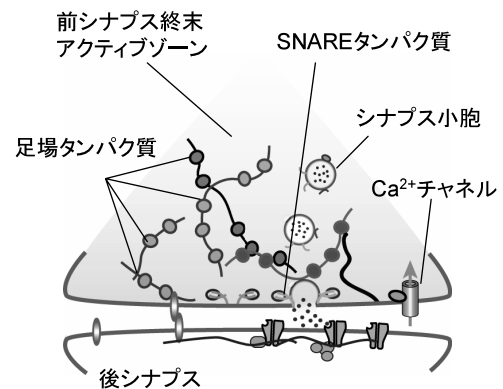


図1 アクティブゾーン構造の模式図

シナプス小胞、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、開口放出を制御する SNARE タンパク質が足場タンパク質を介して集積している。

#### 4. アクティブゾーンタンパク質と $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルとの相互作用

アクティブゾーンにおいて活動電位に正確に応答して  $\text{Ca}^{2+}$  流入を担う分子が電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルである。  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは、主サブユニット ( $\alpha_1$ ) と副サブユニット ( $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\gamma$ ) とで形成されるヘテロなタンパク質複合体である (図2)。  $\alpha_1$  サブユニットは、膜電位の変化を感知する電位センサー部位および  $\text{Ca}^{2+}$  選択的なイオンポアを有している。このように、  $\alpha_1$  サブユニットは  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとしての主な機能を有しているため、アクティブゾーンタンパク質との相互作用についても、  $\alpha_1$  サブユニットが主に着目されて研究が進められてきた。SNARE タンパクの一つである syntaxin は、N型 ( $\alpha_{1B}$ ) あるいはP/Q型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル ( $\alpha_{1A}$ ) の細胞内ループ (II-IIIリンカー) に結合して<sup>6)</sup>、チャンネルの不活性化状態を安定化させることでチャンネル活性を抑制することが知られる<sup>7)</sup>。SNAP-25も同様にII-IIIリンカーに結合して  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性を阻害する<sup>8)</sup>。このように神経型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのII-IIIリンカーには数種類のアクティブゾーンタンパク質が結合することから、この領域は synprint (synaptic protein interaction) 領域と呼ばれている。また、  $\alpha_1$  サブユニットのC末端も前シナプスアダプタータンパク質として知られる Mint1, CASK と相互作用することが報告されている。このようなタンパク質間相互作用によって、  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルはアクティブゾーンに保持されると考えられる。しかしながら、  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞の距離を制御する足場タンパク質

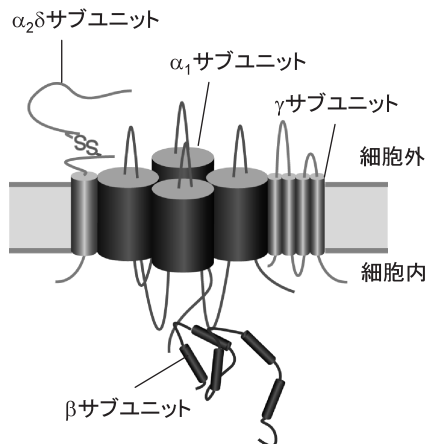


図2 電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのサブユニット構成  $\text{Ca}^{2+}$  の通り道 (ポア) を形成する  $\alpha_1$  サブユニットに細胞内から  $\beta$  サブユニットが結合している。

は知られていなかった。

また、前シナプスの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流は、細胞株で人工的に構築した  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル複合体 ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\gamma$ ) のものと比較すると、不活性化しにくく  $\text{Ca}^{2+}$  流入が持続するという性質を有する。すなわち、前シナプスでは  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを持続させる制御因子が存在すると考えられる。しかし、上記の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル相互作用タンパク質 (syntaxin, SNAP-25) はチャンネルの不活性化を促進することから、その候補としては考えにくい。チャンネル活性の持続を担う未同定の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル制御タンパク質が存在すると推測されていた。

#### 5. アクティブゾーンタンパク質 RIM1 と $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル $\beta$ サブユニットとの結合

$\text{Ca}^{2+}$  チャンネル  $\beta$  サブユニットは、  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性に不可欠なサブユニットである<sup>9)</sup>。  $\beta$  サブユニットは  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを小胞体から形質膜に輸送する役割を担っており、  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル特性も大きく変化させる<sup>10)</sup>。また、  $\beta$  サブユニットはポストシナプスの足場タンパク質 PSD-95 と同じ MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) ファミリーに属するので、アクティブゾーンでは、  $\beta$  サブユニットが  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの集積あるいは制御タンパク質に対する足場的な役割を果たす可能性がある。我々は、  $\beta$  サブユニット相互作用タンパク質を探索するために酵母 2-ハイブリッドスクリーニングを行い、  $\beta$  サブユニットに相互作用するタンパク質として RIM1 (Rab3-interacting molecule 1) を同定した<sup>11)</sup>。RIM1 はアクティブゾーン足場タンパク質であり、シナプス小胞タンパク質 Rab3 に結合するタンパク質として知られる。我々の生化学的な実験結果から、RIM1 のC末端領域と  $\beta$  サブユニットが解離定数 ( $K_d$ ) = 35.1 nM の親和性で結合することがわかった。また、Vendelらは synaptotagmin I が  $\beta_{4a}$  サブユニットのN末端に結合することを報告した<sup>12)</sup>。このように、  $\beta$  サブユニットが  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル相互作用タンパク質の足場として重要な役割を果たしていることが示されつつある。

#### 6. RIM1 は $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの近傍に小胞を繋ぎとめ、チャンネル活性を持続させる

RIM1 と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル  $\beta$  サブユニットとの結合が開口放出に及ぼす影響について、我々は小胞の集積と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性の2点に着目して評価した。

小胞の集積に関しては、全反射顕微鏡を用いて形質膜近傍における小胞の動態を評価した。その際には、PC12細

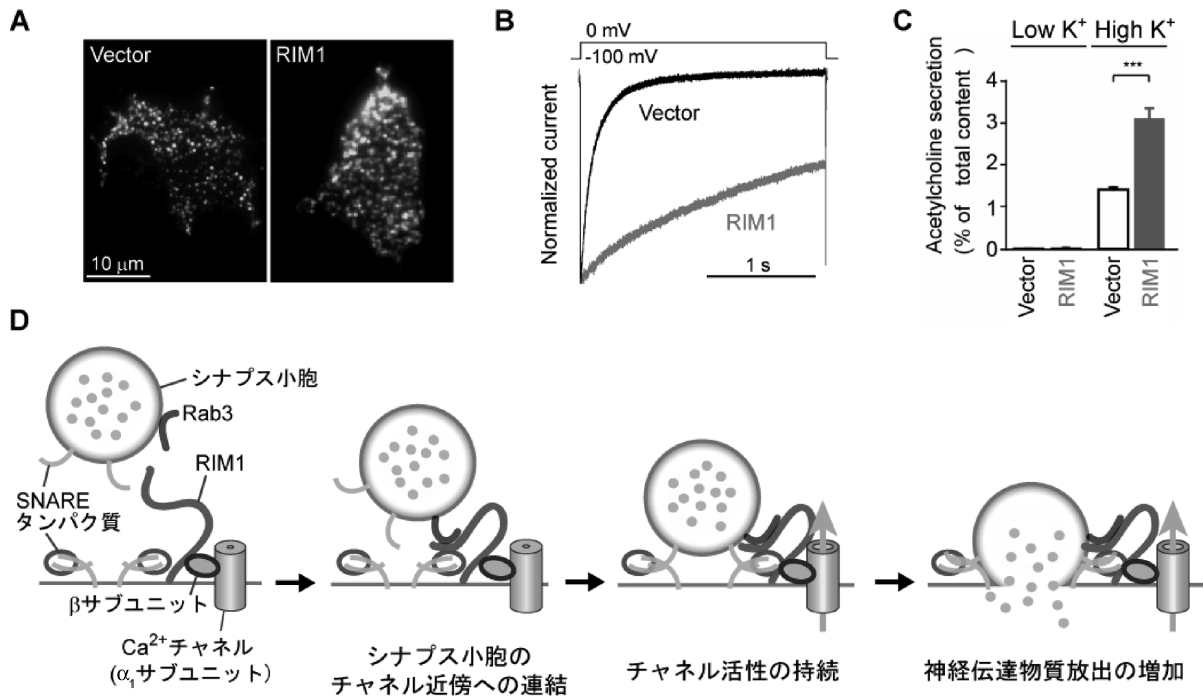


図3 RIM1とCa<sup>2+</sup>チャネル $\beta$ サブユニットの相互作用がもたらす生理的意義

A) 蛍光タンパク質でPC12細胞の神経伝達物質小胞を可視化した際の全反射顕微鏡画像。RIM1を過剰発現させることで、形質膜付近の小胞の数が増加する。B) BHK細胞に発現させたP/Q型電位依存性カルシウムチャネル電流。RIM1を発現させることで、Ca<sup>2+</sup>チャネル電流が顕著に持続する。C) PC12細胞のhigh K<sup>+</sup>刺激に応答するアセチルコリン放出量。RIM1を過剰発現させることで、アセチルコリン放出量が劇的に増加する。D) アクティブゾーンにおけるCa<sup>2+</sup>チャネルとRIM1との機能的相互作用の概念図。

胞を用いて神経伝達物質含有小胞を蛍光タンパク質で可視化した。RIM1を過剰発現させると、細胞膜と接した(ドックした)小胞の数が増加し、逆にRIM1と $\beta$ サブユニットの結合を阻害するとドックした小胞の数が増加した。この結果は、RIM1と $\beta$ サブユニットの結合が形質膜上のCa<sup>2+</sup>チャネル近傍に小胞を近接させることを意味する(図3A)。

Ca<sup>2+</sup>チャネル活性については、BHK細胞へのCa<sup>2+</sup>チャネルの組換え発現系および内在的にCa<sup>2+</sup>チャネルとRIM1とRIM2(RIM1のアイソフォーム)を発現するPC12細胞を用いて評価した。組換え発現系においては、RIM1が存在することで不活性化が抑制され、Ca<sup>2+</sup>流入が劇的に持続した(図3B)。PC12細胞においては、RIM1と $\beta$ サブユニットとの結合の阻害や、siRNAによるRIM1とRIM2のノックダウンによって、Ca<sup>2+</sup>チャネル不活性化が促進された。また、RIM1が存在するときのCa<sup>2+</sup>チャネル不活性化特性は、プレシナプスで観測されるものと類似していた。

これらの結果から、RIM1と $\beta$ サブユニットの結合は、

シナプス小胞をCa<sup>2+</sup>チャネル近傍に連結し、その状態で前シナプスCa<sup>2+</sup>チャネル活性を持続させるという、神経伝達物質放出における必須な機能を担っていると我々は考えている(図3C, D)。我々の報告とほぼ同様の時期に、Schochらは、RIM1とRIM2の両者を遺伝子欠損させたマウスの中樞神経系の解析結果を報告した<sup>13)</sup>。興味深いことに、上述したBruchpilotの場合とは異なり、RIM1とRIM2の欠損はアクティブゾーンの構造や自発的な神経活動に影響を与えず、Ca<sup>2+</sup>流入により惹起される神経伝達物質放出を大幅に減弱させた。また、RIM1を遺伝子欠損した線虫の神経筋接合部においては、細胞膜と接したシナプス小胞の集積が損なわれることも報告されている<sup>14)</sup>。これらの結果は、我々の実験結果と一致しており、Ca<sup>2+</sup>チャネルとシナプス小胞を繋ぎとめる分子実体がRIM1と $\beta$ サブユニットの結合であることを強く示唆する。

## 7. RIM1を原因遺伝子とする家族性遺伝病

RIM1に関しては、家族性の遺伝病が知られている。錐

体-桿体ジストロフィーの一種CORD7の原因として、RIM1の884番目のアルギニン残基からリジン残基への変異が報告された<sup>15)</sup>。この患者は視神経に存在するCa<sup>2+</sup>チャンネル( $\alpha_{1F}$ )の変異と類似した症状を示す。また、興味深いことに、このCORD7患者は健常人に比べて認知能力が高いことが報告された<sup>16)</sup>。そこで、我々はこのRIM1変異がCa<sup>2+</sup>チャンネル活性に及ぼす影響について評価した。すると、変異を導入したRIM1は野生型のRIM1と比較して、視神経型Ca<sup>2+</sup>チャンネル( $\alpha_{1F}$ )に対してはCa<sup>2+</sup>チャンネル活性を抑制し、中枢型Ca<sup>2+</sup>チャンネル( $\alpha_{1A}$ )に対してはCa<sup>2+</sup>流入をより持続させた<sup>17)</sup>。Ca<sup>2+</sup>チャンネル活性だけが病状と連結しているとは断言できないが、症状とチャンネル活性が一致するため、その関連については非常に興味深い。

## 8. おわりに

Ca<sup>2+</sup>チャンネルとシナプス小胞の距離の重要性は以前から指摘され続けていたが、その分子メカニズムは未解明な状態であった。我々が発見したRIM1とCa<sup>2+</sup>チャンネル $\beta$ サブユニットの相互作用は、この距離を規定する分子メカニズムであると考えられる。今後は、実際のプレシナプスでRIM1- $\beta$ サブユニット相互作用及びその効果を実証すること、その他のCa<sup>2+</sup>チャンネル相互作用タンパク質も含めたCa<sup>2+</sup>チャンネルに対する動的な制御機構を解明することが望まれる。また、Ca<sup>2+</sup>チャンネルを中心とするタンパク質複合体の機能解明が進む中で、足場タンパク質としての $\beta$ サブユニットの重要性も今後さらに明らかにされると期待される。

- 1) Adler, E.M., Augustine, G.J., Duffy, S.N., & Charlton, M.P. (1991) *J. Neurosci.*, **11**, 1496-1507.
- 2) Wadel, K., Neher, E., & Sakaba, T. (2007) *Neuron*, **53**, 563-575.
- 3) Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D.A., Pawlu, C., Kellner, R.R., Willig, K.I., Hell, S.W., Buchner, E., Heckmann, M., & Sigrist, S.J. (2006) *Science*, **312**, 1051-1054.
- 4) 大塚稔久 (2006) 生化学, **78**, 979-986.
- 5) 高森茂雄, Reinhard Jahn (2007) 生化学, **79**, 879-882.
- 6) Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Kuwahara, R., Ito, T., & Takahashi, M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24925-24928.
- 7) Bezprozvanny, I., Scheller, R.H., & Tsien, R.W. (1995) *Nature*, **378**, 623-626.
- 8) Sheng, Z.H., Rettig, J., Cook, T., & Catterall, W.A. (1996) *Nature*, **379**, 451-454.
- 9) Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T., & Numa, S. (1991) *Nature*, **350**, 398-402.

- 10) Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., & De Waard, M. (2000) *Neuron*, **25**, 177-190.
- 11) Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K.P., & Mori, Y. (2007) *Nature Neurosci.*, **10**, 691-701.
- 12) Vendel, A.C., Terry, M.D., Striegel, A.R., Iverson, N.M., Leu-ranguer, V., Rithner, C.D., Lyons, B.A., Pickard, G.E., Tobet, S.A., & Home, W.A. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 2635-2644.
- 13) Schoch, S., Mittelstaedt, T., Kaeser, P.S., Padgett, D., Feldmann, N., Chevaleyre, V., Castillo, P.E., Hammer, R.E., Han, W., Schmitz, F., Lin, W., & Südhof, T.C. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5852-5863.
- 14) Weimer, R.M., Gracheva, E.O., Meyrignac, O., Miller, K.G., Richmond, J.E., & Bessereau, J.L. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 8040-8047.
- 15) Johnson, S., Halford, S., Morris, A.G., Patel, R.J., Wilkie, S.E., Hardcastle, A.J., Moore, A.T., Zhang, K., & Hunt, D.M. (2003) *Genomics*, **81**, 304-314.
- 16) Sisodiya, S., Thompson, P., Need, A., Harris, S., Weale, M., Wilkie, S., Michaelides, M., Free, S., Walley, N., Gumb, C., Gerrelli, D., Ruddle, P., Whalley, L., Starr, J., Hunt, D., David, G., Deary, I., & Moore, A. (2007) *J. Med. Genet.*, **44**, 373-380.
- 17) Miki, T., Kiyonaka, S., Uriu, Y., De Waard, M., Wakamori, M., Campbell, K.P., & Mori, Y. (2007) *Channels*, **1**, 144-147.

清中 茂樹, 瓜生 幸嗣, 三木 崇史, 森 泰生  
(京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻)

Physiological roles of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channel complexes on neurotransmitter release  
Shigeki Kiyonaka, Yoshitsugu Uriu, Takafumi Miki, and Yasuo Mori (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura campus, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

## 染色体複製の制御：細胞周期に一度だけ複製されるしくみ

### はじめに

染色体は、細胞周期に一度だけ複製される。どうして、何度も複製されることはないのか？ 1970年 Raoらの細胞融合の実験により、S期の細胞と融合したG<sub>1</sub>期の細胞は素早く複製を開始するが、G<sub>2</sub>期の細胞は複製を行わず、一度複製された染色体が新たに複製されるためには、M期を経なければならないことが示された。1988年に