

図3 ハイジャック説

外来性の微生物から生体を防御するためマクロファージなどの自然免疫担当細胞が動員される。この仕組みに便乗してがん細胞は転移するのではないか。遠隔地の犯人を探し出す犬の嗅覚のように高度な物質間相互作用が存在すると考えられる（文献15より引用）

なぜがん細胞が先に肺に移動すると感知できるのか。ニワトリと卵のようなものかもしれない。今後、ハイジャック説の詳細なメカニズムが解明されることを期待する。

- 1) Biggs, J., Hersperger, E., Steeg, P.S., Liotta, L.A., & Shearn, A. (1990) *Cell*, 63, 933-940.
- 2) D'Angelo, A., Garzia, L., Andre, A., Carotenuto, P., Aglio, V., Guardiola, O., Arrigoni, G., Cossu, A., Palmieri, G., Aravind, L., & Zollo, M. (2004) *Cancer Cell*, 5, 137-149.
- 3) Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., & Hynes, R.O. (2000) *Nature*, 406, 532-535.
- 4) Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., et al. (2001) *Nature*, 410, 50-56.
- 5) Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R.A. (2004) *Cell*, 117, 927-939.
- 6) Schmidt, D., Textor, B., Pein, O.T., Licht, A.H., Andrecht, S., Sator-Schmitt, M., Fusenig, N.E., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2007) *EMBO J.*, 26, 710-719.
- 7) Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D., Muller, W.J., & Massa-

- gue, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8430-8435.
- 8) Weis, S., Cui, J., Barnes, L., & Cheresch, D. (2004) *J. Cell Biol.*, 167, 223-229.
  - 9) Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 1369-1375.
  - 10) Ravasi, T., Hsu, K., Goyette, J., Schroder, K., Yang, Z., Rahimi, F., Miranda, L.P., Alewood, P.F., Hume, D.A., & Geczy, C. (2004) *Genomics*, 84, 10-22.
  - 11) Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A.C., & Shaw, G.S. (2006) *Biochem. J.*, 396, 201-214.
  - 12) Itou, H., Yao, M., Fujita, I., Watanabe, N., Suzuki, M., Nishihira, J., & Tanaka, I. (2002) *J. Mol. Biol.*, 316, 265-276.
  - 13) Pease, J.E. & Williams, T.J. (2006) *Br. J. Pharm.*, 147, S212-S221.
  - 14) Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J.L., Altorki, N., Port, E.R., Ruggero, D., Shmelkov, S.V., Jensen, K.K., Rafii, S., & Lyden, D. (2005) *Nature*, 438, 820-827.
  - 15) 丸 義朗 (2007年1月) 朝日選書「がんをくすりて治す」とは?, pp. 216-253, 朝日新聞社, 東京

丸 義朗

(東京女子医科大学医学部薬理学)

S100A8 and S100A9 regulate lung metastasis

Yoshiro Maru (Department of Pharmacology, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan)

## 質量分析顕微鏡の進歩

生体高分子を組織切片上で、その位置情報を保持したまま解析できる方法としてイメージング質量分析 (Imaging Mass Spectrometry: IMS) が注目を集めている。本稿では前半で本年1月にはじめて開催されたIMSに特化した国際会議 (アメリカ質量分析学会ASMS主催) で発表された内容を中心に、IMSの世界的な研究動向を述べる。また後半では特に我々が現在開発中の顕微鏡レベルでの解像度を伴ったIMS、質量分析顕微鏡とその研究進展について説明する。

### 1. IMS 誕生の必然性とその世界的動向

質量分析技術がポストゲノム時代のプロテオミクスという分野において非常に重要な役割を果たしてきた事実は、衆目の一致するところである。2002年に田中耕一 ((株) 島津製作所) と John B. Fenn (Virginia Commonwealth Uni-

versity, USA) が生体高分子イオン化手法の開発という業績に対し、ノーベル化学賞を受賞した事実はその重要性を良く物語っている。実際、その後の分析精度の向上とデータベースの発達も相まって、質量分析は生体物質の同定やタンパク質の翻訳後修飾をはじめ、実にさまざまな目的に用いられるようになった。一方、これまでの質量分析では、本来その解析対象となる生体試料を分離・精製しなければならず、必然的に目的物質の組織細胞内分布や局在という位置情報が失われてしまうという弱点が残されていた。故に質量分析の次なる課題として、目的物質の位置情報が得られる状態で解析を行えるようにする、いわば解析の次元をこれまでの一次元から二次元へと上昇させる必要が差し迫っていたと言える。

このような背景の元に現在研究が進められているのがイメージング質量分析 (imaging mass spectrometry: IMS) である。これはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)、あるいは二次イオンマスマスペクトロメトリー (SIMS) を用いることで、組織切片上の任意部位をイオン化し、次にこれを飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) で分析するという原理に基づいている。この手法は生体組織の切片上において、数千点に及ぶ質量分析を行う膨大な情報から任意の分子情報のみを選択的に解析し、分布強度を画像化するものであり、正に、上記二次元レベルでの質量分析を可能にしようというものである。この手法によりタンパク質、ペプチド、脂質を生体組織上で位置情報を保持したまま解析することが可能になり、病理組織への応用が報告されるようになってきた。その意味で IMS の出現は、質量分析法の向上に関して一つの分岐点であると言える。

振り返ると歴史的には IMS は二次電子イオンを用いた SIMS (secondary ion mass spectrometry) imaging としてオーストリアのウィーン大学の Herzog and Viehböck らによって 1949 年に理論的に発明されている。装置としての SIMS は Liebel and Herzog によって 1961 年に最初のものが NASA の支援を得て完成、金属の表面分析等に現在広く応用されている。しかし生体高分子は分解してしまうため観察の対象として注目されてこなかった。近年、田中らの MALDI の発見を機に、生体高分子のマッピング技術が各国で開花しつつあるとも言える。

IMS は現在、日本で筆者らのグループ、米国で Caprioli らのグループ、欧州で Heeren らのグループが主導して研究を進めている。本稿では本年 1 月にフロリダで我々が開催した第一回の IMS サニバル会議で報告された内容を中心に、現在の IMS の世界的動向を述べる。

## 1) アメリカでの動向

Vanderbilt University の Richard M. Caprioli 氏は、現代的な質量分析法を確立した MIT 名誉教授 Klaus Biemann の流れを汲み、米国質量分析学会の前会長を務め、今年勇退する斯界の大物である。当然質量分析法におけるさまざまな業績があるが、近年は特に IMS に注力している<sup>1)</sup>。このグループのいう IMS には、イメージングと言われる方法とプロファイリングと呼ばれる方法の二通りが存在する。このうちイメージングとは、組織切片上にマトリックスをスプレー状に噴射しコーティングを行った後、目的の解像度に従って配列化し、各データ点の質量分析を行って画像を再構成するというものである。一方プロファイリングの方は、任意部位にマトリックスを不連続にスポットした後、ランダムにスポット内をレーザー照射し質量分析を行う。従って、イメージングでは興味ある分子量を持った物質の組織細胞内分布や局在を知ることができるのに対し、プロファイリングでは正常・異常組織間での差異を知ることができるという特徴がある。

このグループからは新たにグリオーマの生検標本に対し、プロファイリングの方法を用いて効率よくデータマイニングがなされ、また実際に、その結果から予後を診断できたとする例が報告された<sup>2)</sup>。また腎腫瘍を材料として、データ正規化を経てバイオマーカーの発見に至る効率的な道筋が報告された。またこのグループは病理組織観察と IMS を有機的に統合することを一つの目標としており、病理観察に異常の観察された部位に絞ってマトリックスの塗布を行う戦略をとっている<sup>3)</sup>。このグループは病理医である Chaurand が引き継ぎ、将来は生検標本の保存状態を考えて、ホルマリン固定パラフィン包埋からも IMS を行い、またペプチドや 50kDa 以上のタンパク質、膜結合タンパク質を含めて、1000 以上のタンパク質の解析と同定が可能になることを目指すとしている。

## 2) スウェーデンでの動向

Uppsala 大学からは、前年度までの ASMS において、パーキンソン病のモデルマウスを用いて正常組織との差異を調べる IMS が報告されていた。ここでの手法は、プロテオミクス・ペプチドミクスの手法 (二次元ゲル電気泳動: 2D-PAGE) と、MALDI を用いた IMS を組み合わせた点に特徴がある。その流れは、1) 2D-PAGE 後、蛍光染色を行い線条体において差異のあるタンパク質を評価する、2) 神経ペプチドの成分を MS で同定する、3) IMS でペプチドやタンパク質の分布図を得る、というものである。2007 年においては、まず 90°C、1.4 秒の microwave 限定

照射によってタンパク質分解酵素を不活性化し、これら神経ペプチドをより良く保持した状態でIMSを行う手法が報告された。また上記流れをスムーズに運ぶ手段として、SwePepと呼ぶ新たな peptide base を確立した<sup>4)</sup>。さらにこうした努力の集積の結果、パーキンソン病のモデルマウスにおけるバイオマーカーとなる分子として、新たにFKBP-12とPEP-19<sup>5)</sup>を報告している。

またTOF-SIMSを用いたIMSがSP Swedish National Testing and Research InstituteおよびUniversity of Gotebergで行われている。それぞれ、単一細胞の膜脂質とラット腎臓におけるコレステロールのIMSである。これら両者の研究で共通しているのは、銀薄膜をマトリックスとして用いていることである。特に後者の研究グループでは、銀薄膜を用いていることで、次項に紹介するフランスの研究グループよりも二次イオン生成量が多い利点を前面に押し出している。またこの方法では、位置分解能も200nm以下であると主張している。一方で、このように位置分解能は確かに良いものの、SIMSでは大きな質量を持った分子はイオン化できないという難点があり、観察対象は限定されている。加えて、一般にSIMSではMS<sup>n</sup>のタンデム質量分析が困難という問題が残る。

### 3) フランスでの動向

フランスのICSN-CNRSの研究グループもTOF-SIMSを用いたIMSを試みている。この研究グループは以前、通常SIMSで用いられるGa<sup>2+</sup>やIn<sup>+</sup>という一次イオン源を0.05pAのAu<sup>3+</sup>クラスターイオンに変えることで、二次イオン生成量を増加させることに成功していた。さらに彼らはニトロセルロースをマトリックスとして用いることで二次イオン生成量が数倍程度増加し、またサンプルプレートとしてステンレスを用いることで二次イオン生成量は最大約100倍になることを示していた。本年度は一次イオン源としてさらにBi<sub>3</sub><sup>+</sup>およびC<sub>60</sub><sup>+</sup>の使用が効果的であることを報告した。Bi<sub>3</sub><sup>+</sup>とC<sub>60</sub><sup>+</sup>のイオン源としての能力比較も行っており、25keV (1.5×10<sup>10</sup> ions/step)のBi<sub>3</sub><sup>+</sup>をsurface analysis beamと呼ぶ一方、10keV (2.8×10<sup>13</sup> ions/step)のC<sub>60</sub><sup>+</sup>をsputter beamとして特徴付けている。Bi<sub>3</sub><sup>+</sup>を一次イオン源としたIMSからは、糖脂質リポドームとして知られるFabry病の腎生検標本組織上で、実際にglycosphingolipidsであるGb<sub>3</sub>やGa<sub>2</sub>の集積が観察されることを確認した。

## 2. 顕微質量分析装置の開発

以上述べたIMS動向の内容は全て、肉眼レベルの解像

度に関するものである。しかし例えば封入体や浸潤細胞に特異的な生体分子を検出していくためには、これら肉眼レベルの解像度によるイメージングでは不十分であり、医学領域においてIMSが将来より一層の有用性を増すためには、当然その解像度を顕微鏡レベルにまで高めていくことが必要となる。もう一つの大きな問題として、これまでのIMSにより得られる情報はあくまでイオンの分布に関する情報にとどまっており、肝心の物質同定には至っていないという点がある。我々が現在、鳥津製作所、癌研究会、理化学研究所、および大阪大学との産学連携で開発中の「顕微質量分析装置」(質量顕微鏡)は上記二つの問題を解決し得るものと期待できる。質量顕微鏡法を可能にするにあたってまず遭遇する問題点は、組織からのイオン化が不十分であることである。この問題を解決する方法には検出器側の高感度化もさることながら、サンプル処理法の向上が重要となる。以下に我々がここ数年取り組んでいる幾つかのサンプル処理法の向上の歩みを記す。

まず我々は切片の厚さの最適化を行い、特に高分子量タンパク質の計測においては、切片の厚さが10μm以下となった時に最も高い強度とS/N比を示す測定結果が得られることを明らかにした<sup>7)</sup>。次に生体組織上でタンパク質、ペプチドの拡散を最小限に抑えるタンパク変性法、酵素消化法を考案し、これをon-tissue digestion法と名付けた<sup>8)</sup>。これは組織内タンパク質を変性させた後にケミカルインクジェットプリンター(鳥津製作所)を用いてトリプシンを分注してタンパク質を消化し、次にマトリックスを塗布して既存の四重極イオントラップ飛行時間型質量分析計AXIMA-QIT(鳥津製作所)により評価を行うというものである。on-tissue digestion法により、分子量が大きくそのままではイオンとして検出されにくいタンパク質もトリプシン消化産物として質量分析により検出できるようになった。さらにこれらの消化産物を生体組織上で直接タンデム質量分析(mass spectrometry/mass spectrometry: MS/MS)により同定することも可能となった<sup>8)</sup>。このon-tissue digestion法を適用する対象として、PVDF(ポリビニリデンフロライド)膜上の組織切片を、変成・還元作用を持つ緩衝液を用いて新たなPVDF膜へ転写する手法も考案した<sup>9)</sup>。

続いて我々は特殊フィルムの使用に着手した<sup>10)</sup>。上のPVDF膜は確かに観察したその場所での物質同定を可能にしたものの(*in situ* proteome)、これのみでは光の透過性がない。観察を行いながら多段階タンデム質量分析を行い、また観察部位に含まれる物質の同定および構造解析を

可能にするような質量顕微鏡法を可能にするために、我々は透明導電性シートを使用し、そのシート上における試料前処理法を開発した<sup>10)</sup>。すなわち非常に薄いPET（ポリエチレンテレフタレート）基板の上に金属酸化物薄膜を形成した素材を新規試料支持材として採用した。この素材は75～125 $\mu\text{m}$ のPET基板に、酸化インジウムスズ（ITO）を5～15nm程度蒸着したものである（ITOフィルム）。この方法を用いた後、さらに組織上でMS/MSを行い、得られたスペクトルより、タンパク質同定に成功した<sup>10)</sup>。

一方、マトリックスの塗布方法も新たに工夫した。この方法はスプレードロップ法と呼ぶものであり、元来はスプレーコーティング法および滴下法というように別個に採用されていたマトリックス供給法を、二段階連続で行うというものである<sup>11)</sup>。すなわち、マトリックス溶液をスプレーコーティングした後、より高濃度の同種マトリックス溶液

の液滴をそこに滴下し、微細結晶で覆われたマトリックススポットを作製する。ラット脳切片に対する処理を例にとれば、この方法により、そこから検出され得るピークのシグナル強度は従来法に比べ約30倍となり、またS/N比も飛躍的に向上した<sup>11)</sup>。さらに我々はこのスプレーコーティング法によるマトリックス塗布を、培養細胞に対しても適用した。すなわち培養細胞の簡便なサンプル調整法として、上述のITOフィルム上に直接HEK293T細胞の培養を行うことが可能であり、また上記スプレードロップ法を用いることで、これを生体試料の直接質量分析用試料として調整できることを示した<sup>12)</sup>。HEK293T細胞に対して on-tissue digestion 法を行い、得られた細胞由来タンパク質のトリプシン消化産物の中で特に強いピークを示す二つのものに対してMS/MSを行ったところ、これらはそれぞれ histone H2A.2, nucleophosmin のトリプシン消化産物と同

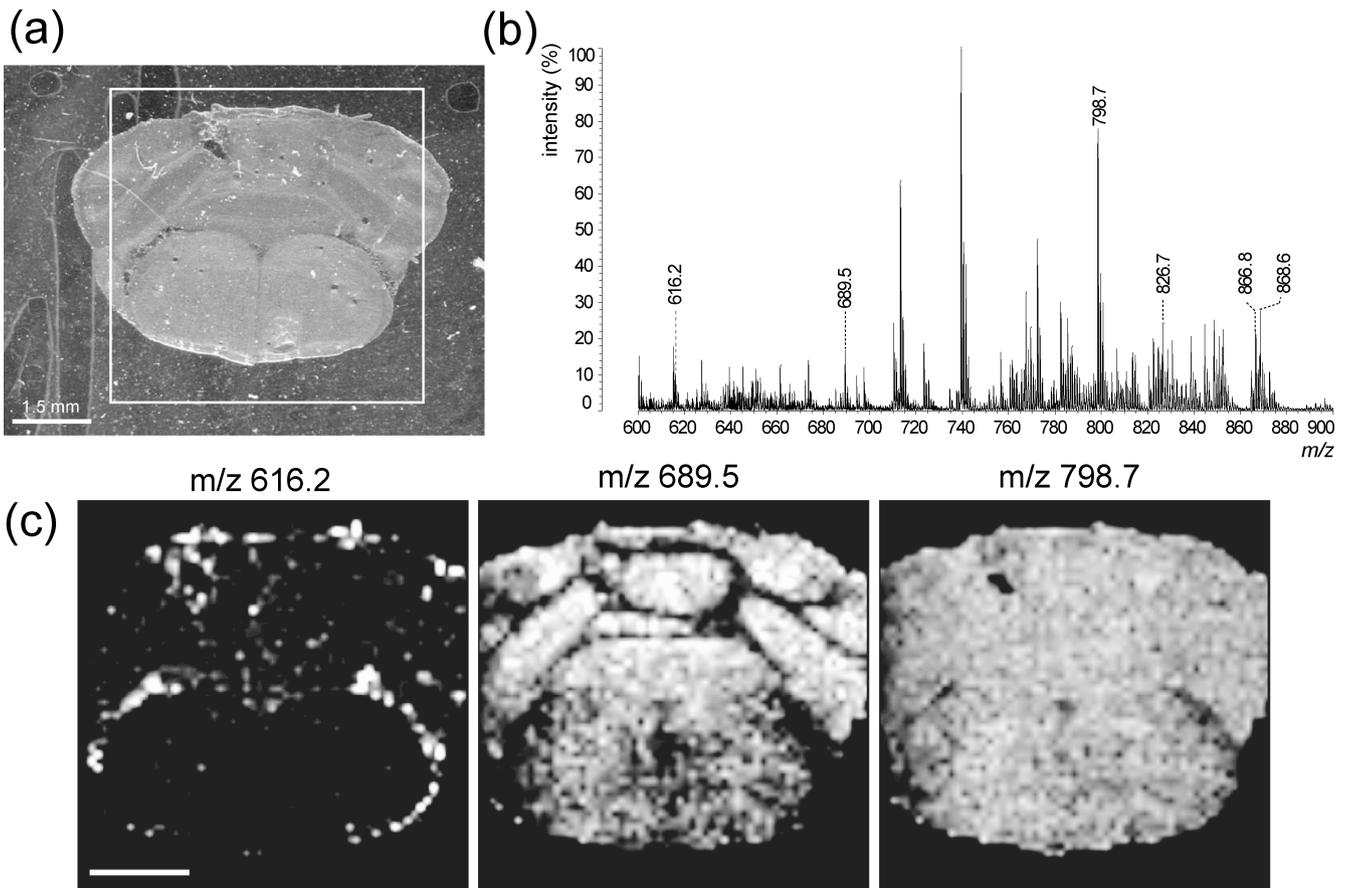


図1 質量分析顕微鏡で解析したマウス小脳切片の脂質分布

(a)解析に用いた小脳 coronal 切片。枠内の部位に対してイメージングを行った。グラフ(b)は測定領域内の全スペクトルを平均化したもの。5 $\mu\text{m}$ の厚みの切片の解析で小脳の複雑な構造が見え、脂質の種類ごとに特異的な分布を示すことが分かる(c)。(Nature, 2006, 443, nature jobs & events. 「広がる分子イメージングの世界」掲載図より改変, 瀬藤らのデータ)

定された<sup>12)</sup>。これにより、今回取り上げた培養細胞の測定系において、簡便かつ迅速な、しかもタンパク質分子種の同定を伴った解析が十分可能であることが示された。このようなアプローチは、遺伝子発現などの形質転換した培養細胞の発現タンパク質や、培養細胞の系を用いた細胞間シグナルにおいて新しい視点からの解析法を提供するものと期待できる。

上記のような過程で、我々は多段階質量分析装置 AXIMA-QIT (MALDI-QIT-TOFMS 型質量分析装置) を用いて、目的の生体分子を検出して画像化し、さらに多段階質量分析によってこれらを同定することに成功した (図 1)。現在、我々はこの顕微質量分析装置 (質量顕微鏡) のさらに次世代型を開発中である。我々の真の研究目的は、高い解像度を兼ね備えるだけでなく、MS<sup>n</sup> 解析により信頼度の高い生体分子同定が可能となるような大気圧下質量顕微鏡を製作することである。実際、我々は QIT-TOF システムを採用することにより、解像度 10 $\mu$ m 以下のレベルにて、この大気圧型質量顕微鏡のプロトタイプを製作することができた (原田および瀬藤, 2007 ASMS)。

なお、MALDI による IMS を光学顕微鏡レベルの解像度で行おうとする動きは、我々以外にオランダの AMOLF (Institute of Atomic and Molecular Physics) のグループにおいても stigmatic 法を用いて検討されている (2007 ASMS)。しかし、彼らの方法は多段階質量分析には不適であり、同定ができない点に限界があると我々は考えている。また、stigmatic mode のみを mass microscopy と呼ぶ姿勢には我々、Caprioli 氏、Markus 氏らから会議場で批判の声が上がった。実際、microscopy に probe mode と stigma mode があると考えるのが顕微鏡学の用語としては正しい。

こうした質量顕微鏡法の有用性として、我々は以下の二つを考えている。一つは翻訳後修飾を受けたタンパク質の細胞内分布を可視化することである。ユビキチン化やグルタミン酸付加<sup>13)</sup>などのタンパク質の翻訳後修飾の様相を解析するには、今のところ質量分析以外方法がない一方で、既存の質量分析にはその位置情報が全く伴っていない。我々の質量顕微鏡は、こうした翻訳後修飾を受けたタンパク質の細胞内分布の違いを検出するものと期待している。もう一つはパーキンソン病、アルツハイマー病などの幾つかの神経変性疾患で観察される正体不明なタンパク封入体 (レビー小体、老人斑) やさまざまな腫瘍組織における構成物質解明である。既に我々は、ヒトのがん転移組織に対して質量顕微鏡法を行うことで、そこに特異的に存在する物質を同定することに成功している<sup>14,15)</sup>。我々の装置が学術・

臨床医学・創薬の多方面で貢献できればと願っている。

## 謝辞

この研究は科学技術振興機構の先端計測プログラムの支援を得て行ったものです。澤田研究総括、島津製作所基盤研究所吉田所長をはじめとする共同研究者に感謝いたします。

- 1) Caprioli, R.M., Farmer, T.B., & Gile, J. (1997) *Anal. Chem.*, 69, 4751-4760.
- 2) Schwartz, S.A., Weil, R.J., Thompson, R.C., Shyr, Y., Moore, J.H., Toms, S.A., Johnson, M.D., & Caprioli, R.M. (2005) *Cancer Res.*, 65, 7674-7681.
- 3) Cornett, D.S., Mobley, J.A., Dias, E.C., Andersson, M., Arteaga, C.L., Sanders, M.E., & Caprioli, R.M. (2006) *Mol. Cell Proteomics*, 5, 1975-1983.
- 4) Falth, M., Skold, K., Norrman, M., Svensson, M., Fenyó, D., & Andren, P.E. (2006) *Mol. Cell Proteomics*, 5, 998-1005.
- 5) Skold, K., Svensson, M., Nilsson, A., Zhang, X., Nydahl, K., Caprioli, R.M., Svenningsson, P., & Andren, P.E. (2006) *J. Proteome Res.*, 5, 262-269.
- 6) Touboul, D., Kollmer, F., Niehuis, E., Brunelle, A., & Laprevote, O. (2005) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 1608-1618.
- 7) Sugiura, Y., Shimma, S., & Setou, M. (2006) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 54, 45-48.
- 8) Shimma, S., Furuta, M., Ichimura, K., Yoshida, Y., & Setou, M. (2006) *Surf. Interface Anal.*, 38, 1712-1714.
- 9) Simma, S., Furuta, M., Ichimura, K., Yoshida, Y., & Setou, M. (2006) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 54, 133-140.
- 10) Simma, S., Sugiura, Y., & Setou, M. (2006) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 54, 210-211.
- 11) Sugiura, Y., Shimma, S., & Setou, M. (2007) *Anal. Chem.*, 78, 8227-8235.
- 12) Sugiura, Y., Shimma, S., Moriyama, Y., & Setou, M. (2007) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 54, 25-31.
- 13) Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., Campbell, P.K., Yuasa, S., Janke, C., Macgregor, G.R., & Setou, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 27, 3213-3218.
- 14) Shimma, S. & Setou, M. (2007) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 55, 145-148.
- 15) Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., & Setou, M. (2007) *J. Chromatogr. B.*, 5-MAR

瀬藤 光利<sup>1,2,3</sup>, Ron M.A. Heeren<sup>4</sup>, Markus Stoeckli<sup>5</sup>,  
新聞 秀一<sup>1</sup>, 松本 峰男<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所,

<sup>2</sup> 三菱化学生命科学研究所・分子加齢医学研究グループ,

<sup>3</sup> 東京工業大学大学院生命理工学研究科,

<sup>4</sup> FOM Institute for Atomic and Molecular Physics

FOM-AMOLF,

<sup>5</sup> DTC/Analytical and Imaging Sciences,

Novartis Institute for Biomedical Research)

#### Mass microscopy

Mitsutoshi Setou,<sup>1,2,3</sup> Ron M.A. Heeren,<sup>4</sup> Markus Stoeckli,<sup>5</sup> Shuichi Simma,<sup>1</sup> and Mineo Matsumoto<sup>2</sup> (<sup>1</sup>National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Physiological Science, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan; <sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Molecular Gerontology Group, 11 Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194-8511, Japan; <sup>3</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Biological Information, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-chou, Midoriku, Yokohama-shi, Kanagawa 226-8503, Japan; <sup>4</sup>FOM Institute for Atomic and Molecular Physics FOM-AMOLF, Kruislaan 407, 1098 SJ Amsterdam, The Netherlands; <sup>5</sup>DTC/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<sup>[脚注]</sup>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<sup>1)</sup>。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°C 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。