

シナプス小胞エンドサイトーシスの制御機構に関する研究

吉田 祐美

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経制御学

キーワード：エンドサイトーシス，ダイナミン，アンフィファイジン

はじめに

神経細胞は、情報の伝達や処理のために脳全体でネットワークを張り巡らせている。個々の神経細胞間における情報伝達は、シナプスという細胞どうしの近接した場所で行われており、神経細胞がシナプス終末から化学伝達物質を放出することで情報を伝達している。まず、神経細胞が外部からの刺激により電気的に興奮すると、その刺激は軸索を通過してシナプス終末に伝わる。次いでシナプス終末で細胞膜上の電位依存性カルシウムチャンネルが開口し、終末部での細胞内カルシウム濃度が上昇する。これにより、シナプス小胞が前シナプスの細胞膜に融合し、前シナプスから化学伝達物質のエキソサイトーシスがおこる。放出された化学伝達物質は、後シナプス細胞膜上の受容体に作用し刺激を伝えている。

化学伝達物質を放出し終えたシナプス小胞膜は、主にクラスリン依存性エンドサイトーシスという機構によって細胞内に回収され、小胞が再生される。そして引き続き内部に化学伝達物質を再充填され、シナプス小胞として再利用されている。従ってシナプスにおいては刺激伝達の都度、活発にエキソ・エンドサイトー

シスが行われている。このため、シナプス機能を維持するためには、エキソサイトーシスによる化学伝達物質の放出と同様、エンドサイトーシスによるシナプス小胞の再生機構が必須である。我々はエンドサイトーシスにおいて主要な役割を果たすダイナミンに着目し、その機能制御機構について研究を行った。

ダイナミンの働き

クラスリン依存性エンドサイトーシスは、1. クラスリン被覆蛋白の細胞膜への結合、2. 被覆ピットの細胞内への陥入、3. ピット頸部の切断、4. 被覆蛋白の解離、という連続した4つのステップからなる。これらの過程はそれぞれ特徴的な蛋白質・膜脂質分子群が、複雑に相互作用することにより行われている¹⁾。これらの機能分子のなかでダイナミン GTPase は最も主要な役割を果たす機能蛋白質の一つであり、ピット頸部の切断に重要である。例えば、ダイナミンホモログに対する温度感受性変異を導入したショウジョウバエは、制限温度において麻痺状態となる。これは、前シナプスでのエンドサイトーシスが阻害されることでシナプス小胞形成不全を引き起こし、その結果として神経伝達が滞るためである²⁾。同様の状態は哺乳動物より調製した試料を用いた *in vitro* の実験でも以下のように観察される。細胞分画により調製したシナプスの細胞膜を脳細胞質、ATP、GTP とインキュベーションすると、クラスリン依存性エンドサイトーシス小

平成17年9月受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7125 FAX：086-235-7126
E-mail：dns15328@cc.okayama-u.ac.jp

◆ プロフィール ◆



2003年岡山大学大学院自然科学研究科修士課程修了、現在同研究科博士課程所属。修士課程では、シナプス小胞内にグルタミン酸を輸送する小胞型グルタミン酸輸送体の生化学的特徴付けをテーマに、自然科学研究科森山芳則教授に御指導をいただきました。2003年より医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座にて、竹居孝二教授をはじめとする諸先生方に御指導をいただきながら、本稿テーマであるダイナミンの機能制御について研究を進めています。両テーマとも神経伝達の仕組みを理解する上での基本的かつ重要な事柄ではありますが、特に現在取り組んでいるエンドサイトーシスの制御機構は、脳の高次機能にもつながることであり、興味深く取り組んでいるところです。

胞の形成を再構成することができる。この時 GTP の代わりに GTP γ S (非加水分解型 GTP アナログ) を用いると、エンドサイトーシスの途中段階であるクラスリン被覆ピットが多数観察される。ピットの頸部は切断前の状態とどまっておき、チューブ状に伸展した頸部にダイナミンが螺旋状に重合している³⁾。これは GTP の加水分解が起こらないことでダイナミン GTPase の働きが阻害されたため、エンドサイトーシスが途中で止まってしまっている状態と考えられる。このように、ダイナミンの機能はエンドサイトーシスにおいてクラスリン被覆ピット頸部の切断に深く関連している。

ダイナミンがどのようにして被覆ピット頸部を切断するのかについては未だ議論があるが、一つには被覆ピット頸部に重合したダイナミンが構造変化を起こすことで機械的に切断していると考えられている。これはダイナミンの生化学的な性質と、電子顕微鏡下での詳細な観察による。ダイナミンの GTPase としての機能がピット頸部の切断に関連しそうであることは既に述べた。この GTPase 活性は特徴的な性質を持っており、ダイナミン自身が重合することにより活性が上昇する。In vitro でダイナミンの活性を測定する際、脂質二重膜の共存で活性が大きく上昇することが以前から知られているが⁵⁾、これは脂質二重膜上にダイナミンが重合するためである。ダイナミンはピット頸部切断の際には脂質二重膜上に重合しているため、この時も同様に GTPase 活性が上昇していることが予想される。一方、脂質二重膜上へのダイナミンの重合は、単離精製したダイナミンを人工脂質二重膜とインキュベーションすることで観察できる。大型単層のリポソームをダイナミンとインキュベーションすると、ダイナミンがリポソームをチューブ状に伸展させる。このチューブは周囲をダイナミンで螺旋状に囲われており、GTP γ S や GDP の共存でダイナミンの構造変化に伴い螺旋のピッチや直径が変わる⁴⁾。これらの観察結果から、ダイナミンがエンドサイトーシスの際、ピット頸部に重合することで活性が上昇し、頸部を締め付けるように構造変化することでピット頸部を機械的に切断しているメカノエンザイム (mechanoenzyme) として働くというモデルが提唱されている。

一方ダイナミンが分子スイッチとして機能し、下流のエフェクター分子がピットを切断するというモデルも提唱されているが、現在のところ GTP 結合型のダ

イナミンによってエンドサイトーシスを引き起こすエフェクター分子は同定されていない⁶⁾。

いずれのモデルにおいても、ダイナミンはエンドサイトーシスにおいてクラスリン被覆ピット頸部の切断に関わっており、ダイナミンの機能はクラスリン依存性エンドサイトーシスに関わる他の蛋白質分子との相互作用によって制御されていると予想される。そこで、生理的な条件下でダイナミンの主要な結合蛋白質であるアンフィファイジンが⁷⁾、ダイナミンの機能にどのように影響しているか検討した。

in vitro 小胞形成に対するアンフィファイジンの役割

アンフィファイジンはダイナミン同様、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて被覆ピット頸部の切断過程に機能するとされる分子である。アンフィファイジンはまた、分子内にダイナミンとの結合配列を持ち、ダイナミンの生理的な結合パートナーであるとされている⁸⁾。ダイナミンとアンフィファイジンの結合の生理的意義は実験的に示されており、細胞内におけるこれらの結合を競合ペプチドや抗体により阻害することで、エンドサイトーシスが阻害される。我々は、これまでにダイナミンによるエンドサイトーシス小胞の形成を in vitro で再現する系を構築しており⁹⁾、この系を用いてダイナミンの小胞形成能に対するアンフィファイジンの調節機構を分子レベルで解析した。

エンドサイトーシスによる小胞形成の過程は in vitro で再現することができる。脳抽出脂質を用いて作製した大型単層のリポソームと、脳細胞質、ATP、GTP を 37°C でインキュベーションすることでリポソームから小胞が形成される⁹⁾。小胞化されたりポソームは電子顕微鏡下で観察できるほか、動的光散乱法によって小胞形成量を定量的に解析することが可能である¹⁰⁾。この反応はダイナミン依存性であるため⁹⁾、まず脳細胞質により起こされるリポソームの小胞化に対してアンフィファイジンがどのように影響を及ぼすか調べた (図 1)。

アンフィファイジンノックアウトマウスから調製した脳細胞質を用いて⁸⁾、大型単層リポソームからの小胞形成量を野生型のマウスと比較したところ、37°C、15 分間のインキュベーションによる小胞の形成量は、ノックアウトマウスより調製した脳細胞質において大きく低下していた。野生型のマウスより調製した脳細胞質ではほとんどのリポソームが小胞化されていたが、ノックアウトマウスの脳細胞質では全体の一割ほどし

か小胞化が起きていなかった。アンフィファイジン自体による小胞化が起こるかどうか調べたところ、精製したアンフィファイジン単独では小胞は形成されなかった。しかし小胞形成能を欠いたアンフィファイジンノックアウトマウスの脳細胞質にアンフィファイジンを加えて用いることで、脳細胞質による小胞の形成が野生型と同程度までに回復した。従って、アンフィファイジンは脳細胞質による *in vitro* の小胞形成を再構成するために必要であることが確認された(図 1 A)。

引き続き、アンフィファイジンの小胞形成に対する影響がダイナミンに対する直接的な働きによることを確認した。精製したダイナミンを用いて小胞形成を再構成し、これに対するアンフィファイジンの影響を調べたところ、アンフィファイジンの存在により小胞の形成が促進された(図 1 B)。これらの結果から、アンフィファイジン脳細胞質による *in vitro* 小胞形成にダイナミンを通じて機能していることが示された。

アンフィファイジンによるダイナミンの GTPase 活性の制御

前述のように、ダイナミンによるエンドサイトーシス小胞の形成は GTP の加水分解と共役しているというモデルが提唱されている。従って、アンフィファイジンがダイナミンの小胞形成を促進するとき、同時にダイナミンの GTPase 活性も上昇しているということが予想される。そこで、小胞形成と同条件でダイナミンの GTPase 活性を測定し、アンフィファイジンによる影響を調べた(図 2)。

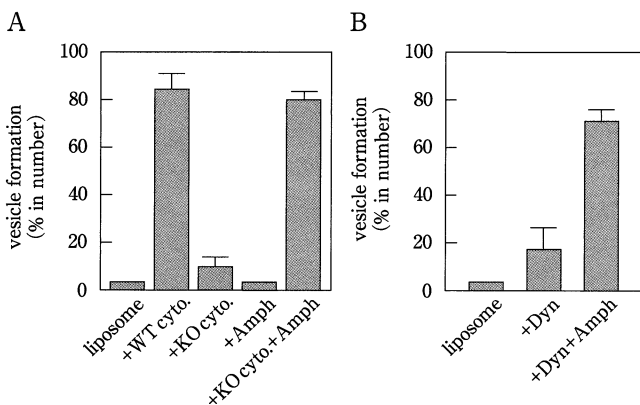


図 1 リポソームからの *in vitro* 小胞形成
A：アンフィファイジンのノックアウトマウス (KO) を用いて脳細胞質蛋白質による小胞の形成量を比較した。ノックアウトマウスでは小胞の形成量が著しく低下している。B：精製蛋白質によるリポソームからの小胞形成。(文献14より改変)

ダイナミンは脂質二重膜の存在により、GTPase 活性が上昇する。これはダイナミンが脂質二重膜上に自己会合した時に、内在性の GTPase effector domain (GED) が GTPase domain と近接する形となるためといわれている。ダイナミンの GTPase 活性の調節は現在のところ GED によるものしか報告されておらず、他の分子による活性制御も実際にはこの部分を介しての働きと考えられている。

アンフィファイジンは、脂質二重膜の非存在下ではダイナミンの GTPase 活性にほとんど影響を及ぼさなかったが、ダイナミンによる小胞形成が行われる条件、すなわち脂質二重膜の存在下ではダイナミンの GTPase 活性を上昇させた。これはダイナミンの脂質二重膜上への自己会合促進によるものであると考え、脂質二重膜上に結合したダイナミンの量を調べたところ、ダイナミンの脂質二重膜への集積はアンフィファイジンによって増加していた。このことから、アンフィファイジンはダイナミンを脂質二重膜へ集積させることでダイナミンの自己会合を促進し、内在性の GED の働きを通じて GTPase 活性を上昇していると考えられる。

活性について次のような興味深い現象が見られた。大型単層リポソームの代わりに予め超音波処理によ

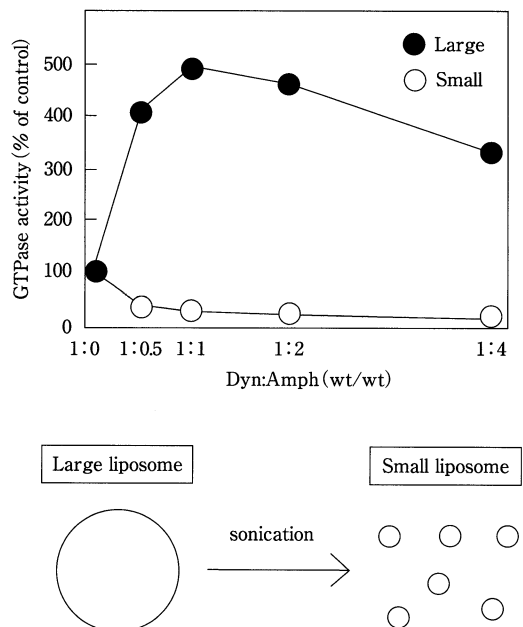


図 2 ダイナミンの GTPase 活性測定
アンフィファイジンの存在によるダイナミンの GTPase 活性の変化。大型単層リポソーム (平均直径 1 μm) の存在下ではアンフィファイジンはダイナミンの GTPase 活性を上昇させるが、サイズの小さいリポソーム (平均直径100 nm 以下) を用いると逆の結果となる。(文献14より改変)

て小胞化したりポソーム（図2，下図）を実験に用いた場合，アンフィファイジンはダイナミンのGTPase活性を著しく阻害した。超音波処理後のリポソームによるダイナミンのGTPase活性上昇は見られたため，阻害効果はアンフィファイジンと共役したものであると考えられる。近年アンフィファイジンの脂質結合領域が結晶構造解析され，直径22nmの弧を描いているということが報告された。構造を解析したグループは，アンフィファイジンがこのカーブによって脂質二重膜の曲率を探り当てているとディスカッションしており¹¹⁾，この機能によりダイナミンに対する影響を変えているのかもしれない。

アンフィファイジンの機能モデル

アンフィファイジンがどのようにしてダイナミンを脂質二重膜上に結合させるか検討した。図3にアンフィファイジンのドメイン構造を示す。アンフィファイジンはダイナミンとの結合領域であるSH3ドメインと，脂質二重膜に結合する領域であるBARドメインを持つ。従ってアンフィファイジンの機能の一つには，ダイナミンと脂質二重膜をリンクするということが考えられる。そこで，BARドメインとSH3ドメインの中間部分を全て欠失したアンフィファイジンを作製し，ダイナミンに対する影響を調べた。この欠失体は，全長のアンフィファイジンと同じくダイナミンの脂質二

重膜への結合を増加し，GTPase活性を上昇することで小胞の形成を促進した。しかも，その効果は全長のアンフィファイジンに比べて大きかった。このことから，アンフィファイジンは脂質二重膜とダイナミンのリンクに機能しており，また欠失した領域にはアンフィファイジンの機能自体を自律的に制御する領域が存在することが示唆された。

アンフィファイジンのSH3ドメインは，ダイナミンのプロリンに富んだ配列（PRD：proline-arginine rich domain）に結合することが知られている。一方，アンフィファイジンは分子内に類似の配列（PRS：proline rich stretch）を持ち，SH3ドメインと分子内結合を作ることが示唆されている¹²⁾。従って，アンフィファイジンのSH3ドメインに対する結合について，ダイナミンのPRDとアンフィファイジンのPRSが競合していることが予想される。そこで，競合が起こらないようにPRSを欠失したアンフィファイジンを作製し，ダイナミンに対する影響を全長のアンフィファイジンと比較した（図4）。その結果PRSのみを欠失させた欠失体についても，全長のアンフィファイジンより効果的に機能することが示された。すなわちアンフィファイジンは分子内にダイナミンとの類似配列を持つことで分子内に結合をつくり，自律的に機能制御をしているということが示唆された。アンフィファイジンはPRSの直後にクラスリン，アダプター蛋白

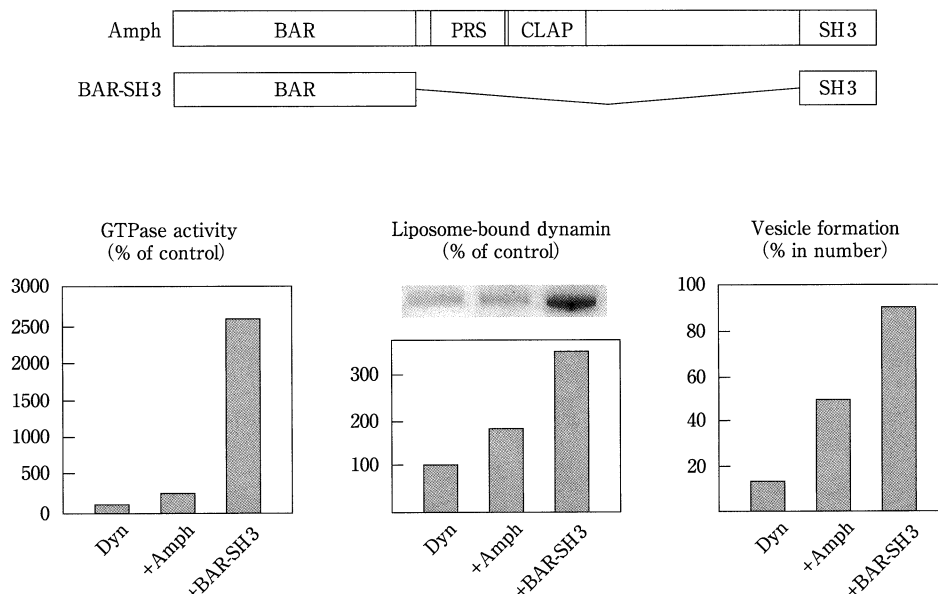


図3 アンフィファイジンのドメイン構造と機能に必須のドメイン
アンフィファイジンの持つドメインのうち，脂質結合ドメインとダイナミン結合ドメインを残した欠失体を作製し，ダイナミンに対する影響を調べた。少なくともこの二つのドメインがあればアンフィファイジンと同様の機能をする事がわかる。（文献14より改変）

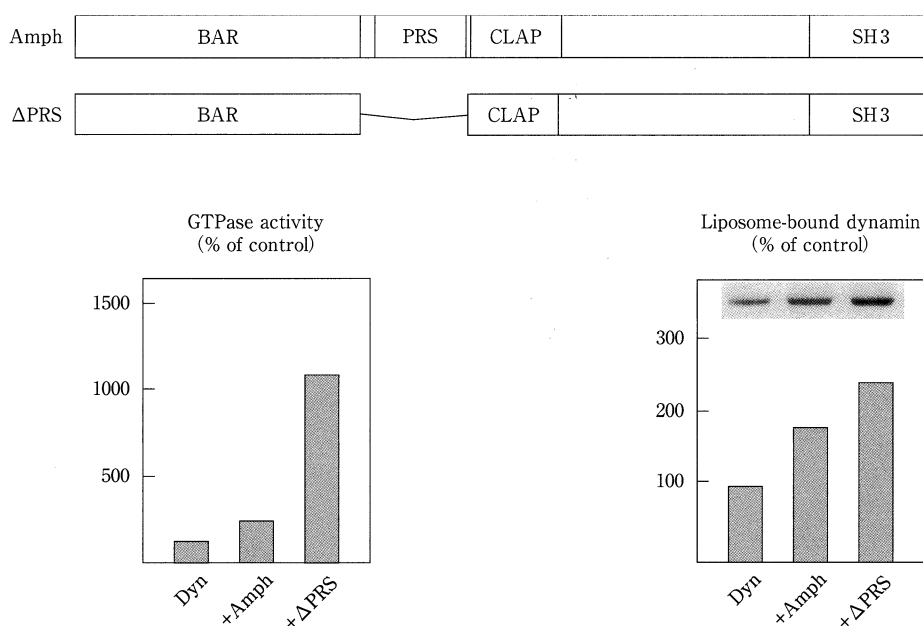


図4 アンフィファイジンの PRS 欠失体

アンフィファイジンのドメインのうちダイナミンと類似の配列を持つ領域を欠失させ、ダイナミンに対する影響を調べた。ダイナミンとの類似配列の欠失によりアンフィファイジンの機能は促進された。(文献14より改変)

と結合する領域を持つことが知られており¹³⁾、これらとの結合がアンフィファイジンの自律制御に関連していることが考えられる。

結 論

エンドサイトーシスの制御機構の研究にあたり、ダイナミン GTPase の機能制御という観点から研究を行った。ダイナミンの生理的結合相手であるアンフィファイジンに着目し、分子レベルでダイナミンに対する機能を検討したところ、アンフィファイジンはダイナミンを脂質二重膜上にリクルートメントすることでダイナミン分子の重合を起こさせ、ダイナミンを活性化して小胞の形成を促進していることが *in vitro* の実験系により示唆された。アンフィファイジンはダイナミンの機能を制御することでエンドサイトーシスの制御に関わっていることが示唆された。

謝 辞

本研究は米国ユール大学 Pietro De Camilli 教授らのグループ、細胞生理学講座、細胞化学講座と共同研究で行ったものであり、ここに深謝いたします。

文 献

1) Slepnev VI, De Camilli P : Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neu-*

roschi (2000) **1**, 161-172.

- 2) Koenig JH, Ikeda K : Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* (1989) **11**, 3844-3860.
- 3) Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P : Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP γ S in nerve terminals. *Nature* (1995) **374**, 186-190.
- 4) Zhang P, Hinshaw E : Three-dimensional reconstitution of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol* (2001) **3**, 922-926.
- 5) Warnock DE, Hinshaw JE, Schmid SL : Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* (1996) **271**, 22310-22314.
- 6) Song BD, Schmid SL : A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* (2003) **42**, 1369-1376.
- 7) Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P : Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* (1999) **1**, 33-39.
- 8) Di Paolo G, Sankaranarayanan S, Wenk MR, Daniell L, Perucco E, Caldarone BJ, Flavell R, Picciotto MR, Ryan TA, Cremona O, De Camilli P : Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* (2002) **33**, 789-804.
- 9) Kinuta M, Yamada H, Abe T, Watanabe M, Li SA,

- Kamitani A, Yasuda T, Matsukawa T, Kumon H, Takei K : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stimulates vesicle formation from liposomes by brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) **99**, 2842-2847.
- 10) Kinuta M, Takei K : Utilization of liposomes in vesicular transport studies. *Cell Struct Funct* (2002) **2**, 63-69.
- 11) Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT : BAR domains as sensors of rane curvature : the amphiphysin BAR structure. *Science* (2003) **303**, 495-499.
- 12) Farsad K, Slepnev V, Ochoa G, Daniell L, Haucke V : A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in adoptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology* (2003) **45**, 787-796.
- 13) Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, De Camilli P : Tandem arrangement of the clathrin and AP- 2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* (2000) **275**, 17583-17589.
- 14) Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K, Cremona O, Di Paolo G, Moriyama Y, Yasuda T, De Camilli P, Takei K : The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J* (2004) **23**, 3483-3491.