生体膜の連続性と不連続性

小 林 俊 秀

東北大学理学部物理学教室 ☎ 980 仙台市青葉区荒巻字青葉

Continuity and Discontinuity of Plasma Membranes

Toshihide Kobayashi

Department of Physics, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980

Polarized cells such as epithelial cells and polarized neurons are characterized by their cell surface organization in which proteins are segregated and maintained in distinct plasma membrane domains. In order to examine the continuity of lipid bilayer between different plasma membrane domains, a method has been introduced to fuse liposomes selectively to one domain of the cell surface using influenza hemagglutinin protein.

When liposomes containing fluorescent lipids were fused to the apical domain of epithelial Madin Darby canine kidney (MDCK) cells, diffusion of lipids to the basolateral surface was observed only when fluorescent lipids were distributed in the inner leaflet of the liposomes. On the other hand, when liposomes were fused to the axon of cultured hippocampal neurons, diffusion of neither inner nor outer leaflet lipids to the somatodendritic domain was observed. These results suggest that the epithelial cells and the neurons have different membrane barriers. In MDCK cells, newly synthesized plasma membrane proteins are segregated in trans Golgi network to be transported to either apical or basolateral domains. Recent data suggest the occurrence of subdomains enriched with apical proteins and glycosphingolipids in the Golgi apparatus.

Key words : Epithelial cells, Hippocampal neurons, Membrane domains, Tight junction, Domain-specific fusion, Trans-Golgi network

1. はじめに

1972年にSingerとNicolsonによって提出された生体膜の流動モザイクモデル^{1, 2)}は、膜タンパク質がリン脂質二重層の様な海の中に浮かんでいるというものであった。このモデルは多くの現象を説明したが、同時に生体膜は流動モザイクモデルで示されたよりもはるかに複雑であることも認識されるようになってきた。その1つの例は細胞膜中での異なったドメインの存在である。上皮細胞やニューロンなどの極性を持った細胞の形質膜

では膜タンパク質は異なったドメインに局在しており互いに混ざり合うことはない。最近のデータはこれらの細胞には不連続な2つの脂質二重層が存在していることを示唆している。

2. 上皮細胞の膜構造

上皮細胞の形質膜は2つのドメインより構成されている。先端 (apical) ドメインは管腔側に面しており、側底ドメインは血管側に接している。2つのドメインはタ

Fig. 1 単純上皮および肝細胞の形態³⁾Table 1 肝細胞と MDCK 細胞での種々のマーカーの各ドメインへの分布³⁾

マーカー	細胞	側底ドメイン： 先端ドメインへの マーカーの分布比	側底ドメイン： 先端ドメインでの マーカーの表面密度比	文献と方法
アシアロ糖タンパク受容体	ラット肝細胞	85 : 1	14 : 1	4). フェリチン免疫電顕法
アシアロ糖タンパク受容体	ラット肝細胞	51 : 1	7.5 : 1	5). 金標識リガンド
5'ヌクレオチダーゼ	ラット肝細胞	1.3 : 1	1 : 4.5	6). フェリチン免疫電顕法
VSV G タンパク	MDCK	28 : 1	3.9 : 1	7). サーフェスラジオイムノアッセイ
インフルエンザ HA タンパク	MDCK	1 : 7	1 : 53	7). サーフェスラジオイムノアッセイ
メチオニンの取り込み	MDCK	>40 : 1	>5.5 : 1	8). タンパク質へのメチオニンの取り込み
トランスフェリン受容体	MDCK	>300 : 1	>41 : 1	9). トランスフェリンに依存した鉄の取り込みの比

イトジャンクションによって分離されている。Fig. 1 に腎臓や小腸などで見られる単純上皮細胞と肝細胞の構造を示した。たとえば小腸上皮では栄養は先端側から側底側に輸送されるが、このような方向性を持った輸送をおこなうためには、輸送タンパク質が2つの膜ドメインで異なった分布をしていることが必須である。Table 1 にいくつかのタンパク質の細胞表面での分布を肝細胞およびイヌ腎臓由来の培養上皮細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞について示した。ここに挙げた側底面のタンパク質は絶対量で 97% 以上が側底面に分布しているが、先端面のタンパク質は側底面への分布も見られる。しかし表面積あたりの密度を見ると、

たとえばインフルエンザウイルスのヘマグルチニンは 50 倍以上先端側に濃縮されている。先端ドメインと側底ドメインでは脂質の分布も異なっている。Table 2 に示すように、どちらの形質膜ドメインにもいずれの脂質も見られるが、先端ドメインでは糖脂質の割合が高く、リン脂質は少ない。側底ドメインのリン脂質の主なものはホスファチジルコリンである。タイトジャンクションは先端ドメインと側底ドメインの境目に存在し、隣接する細胞をつないでいる。電子顕微鏡で見ると、タイトジャンクションの部分には膜内粒子が帯状に連なった構造が見られる。カルシウム濃度を下げてタイトジャンクションを開くとタンパク質の一方の形質膜ドメインへの偏っ

Table 2 小腸上皮細胞での先端ドメインと側底ドメインへの脂質の分布¹⁰⁾

	先端ドメイン (mol %)	側底ドメイン (mol %)
スフィンゴ糖脂質	37.1±9.3	19.4±12.6
リン脂質	32.1±6.5	52.4±12.7
ホスファチジルコリン	8.7±3.7	31.6±2.0
コレステロール	30.8±3.1	28.2±3.0
コレステロール / リン脂質 (mol/mol)	0.98±0.13	0.61±0.21

Fig. 2 メンブレンフィルターに生育した MDCK 細胞の電子顕微鏡像¹²⁾

た分布が失われること、また培養上皮細胞では細胞同士が隣接してタイトジャンクションを形成することがタンパク質の各ドメインへの分布に必要であることから、タイトジャンクションが各々の形質膜ドメインの形成と維持に重要な役割を果たしていると考えられているが、タイトジャンクションの組成や構造は良くわかっていない。繊維芽細胞に E-カドヘリンを発現させると Na⁺, K⁺ATP アーゼはカドヘリンに依存した細胞間の結合部位に局在するようになる¹¹⁾。この分布は上皮細胞での Na⁺, K⁺ATP アーゼの分布と類似していることから、ある種のタンパク質の局在化はカドヘリンによって直接誘起されていると考えられる。

上皮細胞の形質膜ドメインの形成や維持の機構については MDCK 細胞を用いた多くの研究がある。MDCK 細胞をメンブレンフィルター上で生育させると、細胞密度の上昇に伴いタイトジャンクションが形成され、培地側に微絨毛を持った先端ドメイン、フィルター側に側底ドメインが配列する (Fig. 2)。MDCK 細胞に水泡性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus, VSV) を

感染させると、ウイルス粒子は側底面から出芽する。一方インフルエンザウイルスは先端面から出芽する¹³⁾。この発見以来、ウイルスタンパク質をマーカーとした MDCK 細胞の膜形成の研究が数多く行われるようになった。MDCK 細胞にインフルエンザウイルスと VSV を感染させると、どちらのウイルスの膜タンパク質も粗面小胞体、シス、メディアルゴルジ体を経て、トランスゴルジネットワークまでは同様に輸送される。このことから、MDCK 細胞では、トランスゴルジネットワークで先端面と側底面へのタンパク質の振り分けが行われていると考えられている。一方 MDCK 細胞をカルシウム濃度の低い培地で培養し、タンパク質を各々の形質膜ドメインに一樣に分布させたのち、高カルシウムの培地に移すと、タイトジャンクションが形成され、既存のタンパク質の各々のドメインへの再編成が観察される。この場合には細胞骨格系の再編成を伴う¹⁴⁾。

3. 上皮細胞膜の連続性と不連続性

上皮細胞膜の 2 つの形質膜ドメインの脂質二重層の連続性は、Dragsten ら¹⁵⁾により最初に調べられた。彼らは種々の蛍光標識した脂質類似体 (Fig. 3) を培養上皮細胞の一方のドメインに挿入したときに、それらがタイトジャンクションを越えて反対側のドメインに移行するかどうかを測定した。その結果、測定した脂質類似体はタイトジャンクションを越える脂質と越えない脂質の 2 つのグループに分けられた。同時に測定したこれらの脂質類似体の拡散定数は $3 \sim 13 \times 10^9 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ の範囲の値を示し、いずれの脂質類似体も加えたドメイン中で拡散していた。Fig. 3 で AFC16 と AFC12 との差は炭化水素鎖の鎖長の違いだけであり、親水性基と疎水性基との大きさの比率が、タイトジャンクションの通過に重要な役割を果たしていることが示唆される。これらの蛍光

Fig. 3 種々の蛍光標識脂質類似体のタイトジャンクションの通過能

Fig. 4 タイトジャンクションの2つのモデル

標識脂質は細胞膜ドメインの外層に挿入されるが、タイトジャンクションを通過できる脂質は、いずれも外層から内層へフリッパーフロップするのに対して、通過できない脂質にはフリッパーフロップ活性は見られなかった。これらの結果から、彼らはタイトジャンクションは2つの形質膜ドメインの脂質二重層の外層の脂質に対してはバリアーとなっているが、内層の脂質の動きは制限されていないと考えた。しかし彼らが用いた脂質類似体は膜間移行能を有しているため、一旦フリッパーフロップで形質膜の内層に移行したのち、側方拡散ではなく、細胞質を拡散してこれらの脂質類似体が別の形質膜ドメインへと移行した可能性は否定できない。

上皮細胞の形質膜ドメインの連続性についての異なったアプローチが van Meer と Simons によって報告された¹⁵⁾。彼らはインフルエンザウイルスを MDCK 細胞

に感染させると膜融合活性を有するウイルスのヘマグルチニンタンパクが先端ドメインに選択的に発現することを利用して、蛍光標識リン脂質を含むリポソームを先端ドメインに特異的に融合させ、蛍光リン脂質が側底ドメインへと移行するかどうかを測定した。蛍光脂質としてはフリッパーフロップ活性を示さない *N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-dioleoylphosphatidylethanolamine (N-Rh-PE) を用い、リポソームをヘマグルチニンタンパクに特異的に結合させるため、ヘマグルチニンタンパクのレセプター活性を有する糖脂質 GD1a (IV⁸Neu 5Ac α , II⁸Neu 5Ac α -Gg₄Cer) がリポソームに加えられた。

蛍光標識リン脂質を内層にも外層にも含むリポソームを先端面に融合させた場合には蛍光は側底面にも観察された。しかし蛍光脂質の85%を外層に含むリポソームを融合させた場合には蛍光は先端面に留まり、側底面への移行は見られなかった。一方、細胞をカルシウムを含まない培地に移してタイトジャンクションを開けると、先端面の蛍光脂質の側底面への移行が認められた。彼らの結果もまた上皮細胞の2つの形質膜ドメインの脂質二重層は外層では不連続であり、内層では連続していることを示している。

タイトジャンクションの構造については Fig. 4 に示したようなモデルが提出されている。その1つはタイト

Fig. 5 培養したラット海馬ニューロンの分化

Table 3 種々のタンパク質の MDCK 細胞とニューロンとの分布の比較¹²⁾

タンパク質	分 布	文 献
VSV G タンパク	側底ドメイン/樹状突起	21)~23)
SFV E タンパク	側底ドメイン/樹状突起	23), 24)
トランスフェリン受容体	側底ドメイン/樹状突起	9), 25), 26)
インフルエンザ HA タンパク	先端ドメイン/軸索	21), 22)
Thy-1 タンパク	先端ドメイン/軸索	27), 28)
Na-チャンネル	先端ドメイン/軸索	29), 30)
Na ⁺ K ⁺ ATP アーゼ	先端および側底ドメイン/ 軸索および樹状突起	31), 32)

ジャンクションの中心に脂質のシリンダー構造があると
するものである^{17,18)} (Fig. 4A). このモデルでは先端ド
メインと側底ドメインの脂質二重層の細胞質側は連続し
ているが、外層はタイトジャンクションによって分離さ
れている。一方隣接した細胞の二重層の外層同士は連続
している。もう1つのモデル¹⁹⁾ (Fig. 4B) では、タイ
トジャンクションは膜を貫通したタンパク質でできてお
り、それらのタンパク質によって細胞膜の外層および細
胞間の拡散が制限されている。上の実験で得られた結果
はどちらのモデルによっても説明できる。2つのモデル
の違いは、細胞間で形質膜が連続しているかどうかとい
う点である。この点について検討するため、van Meer
らは糖脂質組成の違う MDCK I と MDCK II の2つの
細胞を同一フィルター上に培養し、MDCK II だけが発
現しているフォスマン抗原(GalNAc α 1-3GalNAc β 1
-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) に対する抗体を用
いて細胞を染色した¹⁹⁾。抗体は一様には分布せず、ほぼ
50% の細胞が染色された。この結果は細胞間での脂質
の拡散が起っていないことを示している。彼らはまた

低濃度のインフルエンザウイルスに感染させた MDCK
細胞を用いて、一部の細胞にだけ蛍光標識脂質を含むリ
ポソームを融合させ、蛍光脂質の他の細胞への拡散を見
たが、蛍光は一部の細胞にだけ観察された。これらの結
果はタイトジャンクションが Fig. 4A のような構造で
はないことを示している。

4. ニューロン膜の連続性と不連続性

ニューロンもまた異なったタンパク質組成を有する形
質膜ドメインを形成している。ニューロンの膜構造は上
皮細胞に比べてはるかに複雑だが、ある種のニューロン
では形質膜は大きく2つのドメイン—軸索および樹状突
起/細胞体—toに分けられる。筆者らは培養ラット胎仔海
馬ニューロンを用いて、ニューロンの形質膜の連続性
について解析した。

ラット胎仔の海馬より調製したニューロンをグリア細
胞の存在下で培養すると、まずはじめに数本の短い突起
が現れ(ステージ2)、そのうちの1本が急速に成長し、

Fig. 6 *N*-NBD-PE, *N*-Rh-PE を各々 1% ずつ含む DOPC リポソームの TX-100 の有無での蛍光スペクトル. 励起波長は 470 nm.

軸索となる (ステージ 3). ついで他の突起が樹状突起を形成する (ステージ 4). さらに軸索は他のニューロンの樹状突起や細胞体とシナプスを形成する (ステージ 5)²⁰⁾ (Fig. 5). タンパク質の異なった膜ドメインへの局在化はニューロンでも観察されている. たとえばステージ 5 のニューロンに VSV を感染させると, VSV の G タンパク質は細胞体と樹状突起に観察されるが, 軸索には検出されない. 一方インフルエンザウイルスをニューロンに感染させると, インフルエンザのヘマグルチニンは軸索に発現する²¹⁾. 極性をもったタンパク質の分布はニューロンの分化に依存して起こり, ステージ 3 のニューロンではこれらのタンパク質は形質膜に一樣に分布する. Table 3 にいくつかのタンパク質の MDCK 細胞と, ニューロンでの形質膜での分布を比較した¹²⁾. この表からわかるように, 上皮細胞の先端ドメインとニューロンの軸索, また上皮細胞の側底ドメインとニューロンの樹状突起/細胞体との間には類似したタンパク質の分布が見られる. ニューロンにおける脂質の細胞内分布はわかっていない.

ニューロンにはタイトジャンクション様の構造は存在しない. それでは, ニューロンの各々のドメインのタンパク質はどのようなメカニズムで混ざり合いを避けているのであろうか?, 大きく分けて 2 つのメカニズムが考えられる. 1 つはタンパク質の動きが他のタンパク質との強い相互作用によって大きく制限を受けている場合である. 赤血球の膜タンパク質の細胞質側で強く相互作用している裏打ちタンパク質の存在が良く知られている. この場合, 2 つのドメインの間の脂質の移行は妨げられない. もうひとつの可能性は上皮細胞の場合と同様, 2

つのドメインの間で, 脂質二重層が不連続である場合である. 我々はインフルエンザウイルスに感染した培養ニューロン細胞が, ヘマグルチニンを軸索に選択的に発現するのを利用して, 上皮細胞表層の脂質二重層の連続性を測定したのと同様の方法で, 軸索ドメインと樹状突起/細胞体ドメイン間の脂質の移行能を検討した³³⁾.

この実験では, まずニューロンにインフルエンザ Fowl Plague Virus (FPV) を感染させた. 感染後 7~8 時間でヘマグルチニンが軸索膜に発現する. この段階で蛍光標識脂質を含むリポソームをヘマグルチニン依存的に軸索に結合させる. リポソームはジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) にヘマグルチニンレセプターである GD1a を含み, 蛍光脂質としては *N*-(7-nitro 2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoylphosphatidylethanolamine (*N*-NBD-PE) と *N*-Rh-PE を各々 1% ずつ添加した. このリポソームでは NBD (励起波長 470 nm, 蛍光波長 535 nm) から, ローダミン (励起波長 563 nm, 蛍光波長 585 nm) への共鳴エネルギー移動のため NBD の蛍光は観察されない. しかしリポソームがニューロンと融合して蛍光脂質の密度が下がると, 共鳴エネルギー移動は起こらなくなり, 蛍光が観察されるようになる³⁴⁾. Fig. 6 は用いたリポソームの蛍光を非イオン性界面活性剤である Triton X-100 (TX-100) の存在の有無で測定したものである. TX-100 が存在しない場合, NBD からローダミンへの共鳴エネルギー移動により 470 nm の励起では NBD の蛍光はほとんど観察されず, ローダミンの蛍光が観察されるが, TX-100 によって脂質が希釈されると NBD の蛍光が観察される.

リポソームを低温 (8°C) でニューロンに作用させると, リポソームは軸索に選択的に結合する. このときの位相差および蛍光顕微鏡像を Fig. 7, A~C に示した. 軸索に沿ったローダミンの蛍光が観察されるが, この段階では NBD の蛍光は非常に弱い. 8°C での処理ののち, 過剰のリポソームを洗い, 37°C, pH 5.0 の培地で 1 分間処理することによりリポソームは軸索に融合する. 融合後の位相差および蛍光顕微鏡像を Fig. 7, D~F に示す. 融合の結果, 強い NBD の蛍光が観察されるようになる. 興味深いことに, 融合ののちも蛍光は軸索に留まっており, 軸索と樹状突起/細胞体の間に脂質の側方拡散の障壁があることが示唆された. リポソームに蛍光脂質の代わりに水溶性の蛍光物質カルセインを封入すると, カルセインはニューロンの細胞全体を蛍光標識する (Fig. 7, G, H). このことはニューロンの細胞膜は不

Fig. 7 N-NBD-PE と N-Rh-PE を含むリポソムのインフルエンザウイルスに感染したニューロンへの結合 (A~C) と融合 (D~F).

位相差顕微鏡像 (A, D), ローダミンチャンネルで見た蛍光顕微鏡像 (B, E) および NBD チャンネルで見た蛍光顕微鏡像 (C, F) を示す. G, H はカルセインと N-Rh-PE を含むリポソムをニューロンに融合させたときのカルセイン (G) とローダミン (H) の蛍光を示す.

連続だが、細胞質の拡散の障壁はないことを示している。つぎに軸索に融合した蛍光標識脂質の軸索膜上での側方拡散を蛍光退色回復法を用いて測定した (Fig. 8)。実験は共焦点レーザー顕微鏡上で軸索に $5\ \mu\text{m}$ 幅の $488\ \text{nm}$ のレーザーを $300\ \text{msec}$ 照射したのち、室温での蛍光の回復をビデオカメラに撮り、コンピュータ解析した。写真はレーザー照射前 (A)、照射 1 秒後 (B) および 5 秒後 (C) の蛍光顕微鏡像を示す。蛍光退色は 1 つの実験では 5 秒間で 40% 回復し (Example B)、別の実験では 12

Fig. 8 NBD チャンネルでの軸索の蛍光退色回復。個々の図の説明は本文参照。

秒間に 70% 回復した (Example A)。このことから蛍光脂質の軸索上での動きは制限されていないことがわかる。

ここまでの結果は、ニューロンの細胞表面の脂質二重層は連続的なものではなく、異なった 2 つのドメインの間で不連続なものであることを示唆している。上皮細胞の場合にはタイトジャンクションは、膜の外層のみの脂質の動きを制限していた。ニューロンの実験で使用したリポソムでは、蛍光脂質は膜の外層と内層に対称に分布している。しかし樹状突起/細胞体の大きな表面積を考慮すると、ニューロンの細胞表面の脂質二重層に対する膜障壁が膜の外層の脂質に対してだけ働いていても、内層の蛍光は樹状突起/細胞体の広い表面積のために希釈されてしまい、蛍光顕微鏡下で観察されないという可能性も否定できない。なお、細胞質側に露出していない、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーされているタンパク質である Thy-1 が軸索に局在していることを考えると、膜障壁が脂質二重層の内層の脂質にだけ働いているという可能性は低いように思われる。

膜障壁が脂質二重層の外層にだけ働いているという可

Fig. 9 ジチオナイトによるNBDの蛍光の消去。
(A) ジチオナイト ($S_2O_4^{2-}$) によりNBDは7-amino-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl (ABD) に還元され蛍光を失う。
(B) *N*-NBD-PE が脂質二重層の内層と外層に対称的に分布しているリポソームにジチオナイトを加えると外層のNBDだけが消去される。TX-100でリポソームを壊すとすべてのNBDの蛍光が退色する。

能性について検討するため、蛍光脂質が脂質二重層の内層にだけ分布しているリポソームを作製した。このために、最近発表されたジチオナイトによるNBDの蛍光消去法が用いられた³⁵⁾。NBDはジチオナイトによって蛍光が消去される (Fig. 9) が、ジチオナイトは水溶性のため *N*-NBD-PE を含むリポソームに作用させると、リポソームの外層の蛍光だけが消去される。このようなリポソームを軸索に融合させた。Fig. 10 に位相差および蛍光顕微鏡像を示すが、この場合にも蛍光は軸索に留まっており、ニューロンの膜障壁は脂質二重層の外層と内層の両方に対して働いていることが示唆された。また蛍光脂質を膜の外層にも内層にも含むリポソームを軸索に融合させたのち、細胞をジチオナイト処理して細胞外層の蛍光を消去しても、蛍光は軸索のみに観察された (Fig. 11)。これらの結果は上皮細胞とニューロンでは異なった種類の膜障壁が存在することを示唆している。

Fig. 10 脂質二重層外層の蛍光を消去したリポソームの軸索への融合。
Aに位相差顕微鏡像、Bに蛍光顕微鏡像を示す。

Fig. 11 NBDを脂質二重層の内層と外層に対称的に含むリポソームを軸索に融合させたのち、細胞をジチオナイト処理した。
Aは位相差顕微鏡像、Bは蛍光顕微鏡像を示す。C、Dはニューロンでのジチオナイトによる蛍光消光の効率を見たものである。ニューロンに *N*-NBD-PE のエタノール溶液を加えると蛍光は細胞膜の外層全体に分布する (C) が、ジチオナイトを加えると蛍光は観察されなくなる (D)。

ニューロンでの形質膜の不連続性を維持する機構がどういふものであるのかはわかっていない。ニューロンのナトリウムポンプは細胞体と軸索の根元付近に局在するが、軸索の根元付近に局在するタンパクの膜上での動きは、極めて遅いことが報告されている²⁹⁾。このようなタンパクのクラスターは膜障壁の1つの候補かも知れない。

5. 極性細胞の膜形成

上皮細胞やニューロンなどの極性をもった細胞膜の形成は、繊維芽細胞などの膜形成に比べ複雑である。MDCK細胞ではトランスゴルジネットワークから異なった小胞を介して先端タンパク質と側底タンパク質が各々のドメインに輸送されると考えられている。ニューロンでのタンパク質の振り分け機構は分かっていない。形質膜タンパク質は膜結合リポソームで合成されたのち、小胞

Fig. 12 トランスゴルジネットワークにおける水素結合を介したスフィンゴ脂質ドメインの形成.

(A) スフィンゴ脂質とグリセロ脂質の水素結合のドナーとアクセプターの違い⁴⁰⁾.

(B) トランスゴルジネットワークにおける先端プレカーサーマイクロドメインの形成^{10, 39)}. スフィンゴ脂質は脂質二重層の管腔側でクラスターを形成する. 仮想上のソーティングタンパク質は膜を貫通して細胞質側でコートタンパク質と相互作用している. 先端タンパク質は先端タンパク質同士, あるいはソーティングタンパク質と管腔側で相互作用していると仮定される.

体, ゴルジ体を経て小胞輸送で形質膜に運ばれるが, 脂質の輸送経路ははっきりしていない. 分裂細胞等を用いた実験からは, グリセロリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンや, ホスファチジルコリンは小胞に依存しない経路が主経路であり, スフィンゴ脂質は小胞輸送によって形質膜に運ばれると考えられる³⁶⁻³⁸⁾. MDCK 細胞の先端ドメインがスフィンゴ脂質に富むこと, またスフィンゴ脂質は容易に水素結合を形成することから Simons らは先端ドメインのタンパク質とスフィンゴ脂質が, トランスゴルジネットワークでサブドメインを形成し, それが先端ドメインへの輸送小胞となって先端ドメインへと輸送されるという仮説を提出してい

る^{10, 39)} (Fig. 12). このモデルに対する実験的な証拠はなかったが, 最近になって, 先端タンパク質とスフィンゴ脂質とのドメインの存在を示唆する結果が報告された⁴¹⁾. GPI アンカーを持つタンパク質は, MDCK 細胞では先端ドメインに輸送される. Brown と Rose は GPI アンカーされたタンパク質であるヒト胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP) で形質転換した MDCK 細胞で, PLAP は生合成部位から先端ドメインへの輸送に伴って TX-100 に不溶性になることを見いだした. PLAP は小胞体でアスパラギンの NH₂ 基にオリゴ糖を結合するが, 小胞体で結合したオリゴ糖は試験管内でエンドグリコシダーゼ H (endoH) によって切断される. しかし小胞輸送でタンパク質がメディアルゴルジまで輸送されると, N-アセチルガラクトサミントランスフェラーゼ I とマンノシダーゼ II の作用によって endoH 耐性になる. endoH 感受性の PLAP は TX-100 に可溶性だが, endoH 耐性の PLAP は TX-100 不溶性画分に回収された. このことは生合成された PLAP は, メディアルゴルジを通過すると TX-100 に不溶性になることを示唆している. 電子顕微鏡像から TX-100 不溶性画分は, 膜コンプレックスであることが示された. この画分の脂質組成を調べたところスフィンゴミエリンや糖脂質が濃縮されており, リン脂質はほとんど回収されなかった. この実験からは PLAP とスフィンゴ脂質が別々に TX-100 不溶性の aggregate を作っている可能性を否定しきれないが, スフィンゴ脂質と先端タンパク質とのマイクロドメインの形成を示唆する最初の報告として興味深い.

6. おわりに

単一細胞での膜障壁の存在は精子⁴²⁻⁴⁴⁾ やミドリムシ⁴⁵⁻⁴⁷⁾ のような他の細胞でも示唆されている. 脂質二重層の動きがどのようなメカニズムで制限されているのかは今後検討していかなければならない. またこのような形質膜上のドメインを形成するためにゴルジ体でサブドメインが形成されるとすれば, それはどのような構造でどのようなメカニズムによって形成されるのだろうか? またゴルジ体にサブドメインが存在することをどのようにすれば証明できるだろうか. 今後の進展が待たれる.

本稿で紹介した筆者らのニューロンに関するデータは

筆者がヨーロッパ分子生物学研究所（ドイツ）滞在中 Kai Simons 博士, Carlos G. Dotti 博士らとの共同研究で得られたものである。

最後に、本稿執筆の機会を与えて頂いた東北大学理学部大木和夫教授に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) *Nature* **175**, 720
- 2) 大木和夫 (1988) 膜 **13**, 62
- 3) Simons, K. and Fuller, S. D. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 243
- 4) Matsuura, S., Nakada, H., Sawamura, T. and Tashiro, Y. (1982) *J. Cell Biol.* **95**, 864
- 5) Hubbard, A.L., Wall, D.A. and Ma, A. (1983) *J. Cell Biol.* **96**, 217
- 6) Matsuura, S., Eto, S., Kato, K. and Tashiro, Y. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 2131
- 7) Pfeiffer, S., Fuller, S. D. and Simons, K. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 470
- 8) Balcarova-Stander, J., Pfeiffer, S., Fuller, S. D. and Simons, K. (1984) *EMBO J.* **3**, 2687
- 9) Fuller, S. D. and Simons, K. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1767
- 10) Simons, K. and van Meer, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 6197
- 11) McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R. and Nelson, W. J. (1990) *Cell* **62**, 309
- 12) Simons, K., Dupree, P., Fiedler, K., Huber, L., Kobayashi, T., Kurzchalia, T., Olkkonen, V., Pimplikar, S., Parton, R. and Dotti, C. G. (1992) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. in press
- 13) Rodriguez-Boulant, E. J. and Sabatini, D. D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5071
- 14) Rodriguez-Boulant, E. and Nelson, W. J. (1989) *Science* **245**, 718
- 15) Dragsten, P. R., Blumenthal, R. and Handler, J. S. (1981) *Nature* **294**, 718
- 16) van Meer, G. and Simons, K. (1986) *EMBO J.* **5**, 1455
- 17) Kachar, B. and Reese, T.S. (1982) *Nature* **296**, 464
- 18) Pinto de Silva, P. and Kachar, B. (1982) *Cell* **28**, 441
- 19) van Meer, G., Gumbiner, B. and Simons, K. (1986) *Nature* **322**, 639
- 20) Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988) *J. Neurosci.* **8**, 1454
- 21) Dotti, C.G. and Simons, K. (1990) *Cell*, **62**, 63
- 22) Rodriguez-Boulant, E. and Pendergast, M. (1980) *Cell* **20**, 45
- 23) Dotti, C. G., Kartenbeck, J. and Simons, K. submitted.
- 24) Roman, L. M. and Garoff, H. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 2607
- 25) Parton, R. G., Simons, K. and Dotti, C. G. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 123
- 26) Cameron, P. L., Sudhof, T. C., Jahn, R. and de Camilli, P. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 151
- 27) Wilson, J. M., Fasel, N. and Kraehenbuhl, J.-P. (1990) *J. Cell Sci.* **96**, 143
- 28) Dotti, C. G., Parton, R. G. and Simons, K. (1991) *Nature* **349**, 158
- 29) Angelides, K.J., Elmer, L.W., Loftus, D. and Elson, E. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1911
- 30) Angelides, K. J. and Wible, B. (1992) *Neuron*, in press
- 31) Hammerton, R. W. and Krzeminski, K. A. (1991) *Science* **254**, 847
- 32) Pietrini, G., Matteoli, M. and Caplan, M. J. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 67a
- 33) Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K. and Dotti, C. G. (1992) *Nature* **359**, 647
- 34) Kobayashi, T. and Pagano, R. E. (1988) *Cell* **55**, 797
- 35) McIntire, J. C. and Sleight, R. G. (1991) *Biochemistry* **30**, 11819
- 36) Kobayashi, T. and Pagano, R. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5966
- 37) Kobayashi, T., Pimplikar, S. W., Parton, R. G., Bhakdi, S. and Simons, K. (1992) *FEBS Lett.* **300**, 227
- 38) 小林俊秀 (1991) 蛋白質核酸酵素 **36**, 533
- 39) Simons, K. and Wandinger-Ness, A. (1990) *Cell* **62**, 207
- 40) Pascher, I (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 433
- 41) Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533
- 42) Wolf, D. E. and Voglmayr, J. K. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 1678
- 43) Wolf, D. E., Hagopian, S. S., Lewis, R. G., Voglmayr, J. K. and Fairbanks, G. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 1826
- 44) Cowan, A. E., Myles, D. G. and Koppel, D. E. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 917
- 45) Friend, D. S. and Fawcett, D. W. (1974) *J. Cell Biol.* **63**, 641
- 46) Weiss, R. L., Goodenough, D. A. and Goodenough, U. W. (1977) *J. Cell Biol.* **72**, 133
- 47) Hunnicutt, G. R., Kosfisz, M. G. and Snell, W. J. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 1605

(受付 1992年9月11日)