

## 神経シナプスにおける エンドサイトーシス機能タンパク質-膜リン脂質 相互作用機序の人工脂質膜を用いた解析法

— 岡山大学医学賞（新見賞）を受賞して —

絹 田 正 裕

岡山大学大学院医歯学総合研究科 脳神経制御学

キーワード； endocytosis, synaptic vesicle, liposome, dynamic light scattering, phospholipids

### はじめに

神経細胞は、1つの細胞体に放射状にのびた樹状突起と軸索からなる特徴的な構造を有している。神経細胞では、樹状突起で受け取った刺激は電気刺激として軸索中を伝導する。神経細胞から神経細胞へ、あるいは筋細胞などの効果器への刺激伝達は軸索末端にあるシナプスを介して次のような機構で行なわれる。前シナプスには神経伝達物質を含んだ多数のシナプス小胞があり、電気刺激が前シナプスに到達すると電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルが開口して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、シナプス小胞が細胞膜と融合（エキソサイトーシス）して小胞中の神経伝達物質がシナプス間隙に放出される。細胞膜に融合したシナプス小胞の膜は、主に

クラスリン依存性エンドサイトーシスによって回収されて新しい小胞になり、その小胞中に神経伝達物質が充填されて再びシナプス小胞となる。シナプス機能を維持するためには、このエンドサイトーシスによるシナプス小胞膜回収機構が正常にはたらくことが重要であると考えられる。

クラスリン依存性エンドサイトーシスは、図1に示すように4つの過程により行われている。被覆ピットの形成には被覆構成タンパク質（clathrin, AP-2, AP180などの coat components）とクラスリン被覆周辺に存在するタンパク質群（dynamin, amphiphysin, synaptojanin, epsin, endophilin, cargoなどの accessory factors）が関与し、それらはタンパク質-タンパク質間、あるいはタンパク質-細胞膜間で複雑に相互作用<sup>1)</sup>している。

この複雑なエンドサイトーシスの分子作用機序を解明するためには、単純化した無細胞実験系や培養細胞実験系が有用であると考えられる。タンパク質-タン

論文請求先：〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7125 FAX：086-235-7126  
E-mail：mkinuta@md.okayama-u.ac.jp

### ● プロフィール ●



1980年岡山大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士。同年岡山大学医学部助手。当時は酵素化学全盛期で、物質代謝・代謝異常症の研究を行っていた水原舜爾教授（生化学講座、現名誉教授）の許で物質構造決定法や酵素について学び、アミノ酸代謝研究に従事。1984年から、University of California, San Diego校医学部病理学講座Harvey A. Itano教授（ノーベル賞受賞<sup>※</sup>Pauling教授と共同研究、鎌状赤血球貧血症研究）の許で組織標本やヘモグロビンについて学び、溶血性貧血の研究に従事。帰国後、ヒスチジン血症（当時は新生児マススクリーニング対象）に端を発して、ヒスチジン代謝産物であるウロカニン酸（ヒト皮膚に多量含まれるが生理学的意義が解明されていなかった）に興味を持ち、数種の新規代謝産物とその一連の代謝経路を明らかにした。また、皮膚ウロカニン酸が紫外線生体防御機構に関わることを示した（結城賞）。2000年からは、着任した竹居孝二教授（脳神経制御学）とともに、神経シナプス小胞リサイクル機構、特にエンドサイトーシス機能タンパク質-膜リン脂質分子相互作用機序に関する研究に従事している（岡山大学医学賞（新見賞））。現在、岡山大学大学院医歯学総合研究科講師。

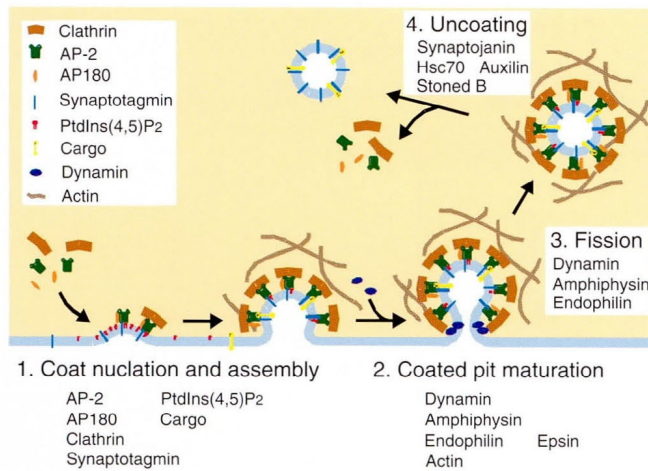


図1 神経シナプスにおけるクラスリン依存性エンドサイトーシス

エンドサイトーシスは、1) 被覆構成タンパク質の細胞膜へのリクルート、2) 被覆ピット形成、3) 被覆ピット切断による小胞形成、4) 被覆の脱離の4つの過程で行なわれている。(文献1より改変)

タンパク質相互作用に関しては、近年しだいに明らかにされつつあるが、エンドサイトーシス機能タンパク質-細胞膜脂質の分子相互作用機序に関しては不明な点が多い。本稿では、我々が最近確立した人工脂質膜(リポソーム)を用いたエンドサイトーシス再構築実験系<sup>2)</sup>およびこの実験系を応用して得られたごく最近の研究成果をいくつか紹介する。

### リポソームからの小胞形成

神経シナプスにおけるエンドサイトーシスの分子機構を *in vitro* で解析しようとの発想から、我々は脳細胞質タンパク質とリポソームとを反応させて小胞形成を行ない、生成した小胞の大きさ(定性)と量(定量)を測定することを試みた(図2)。小胞の定性・定量には、従来の電子顕微鏡による測定の外に光散乱測定法を新たに導入した。まず、その測定原理<sup>3)</sup>について解説する。

#### 1. 静的光散乱(SLS)法と動的光散乱(DLS)法

脂質膜からの *in vitro* 小胞形成解析法として、電子顕微鏡と小胞コートタンパク質の生化学的測定を併用する方法、あるいは静的光散乱(static light scattering, SLS)法を用いる方法<sup>4,5)</sup>が知られている。SLS法の測定原理は、粒子の大きさによって散乱光強度が異なることに基づいている。SLS法は、散乱光強度変化を

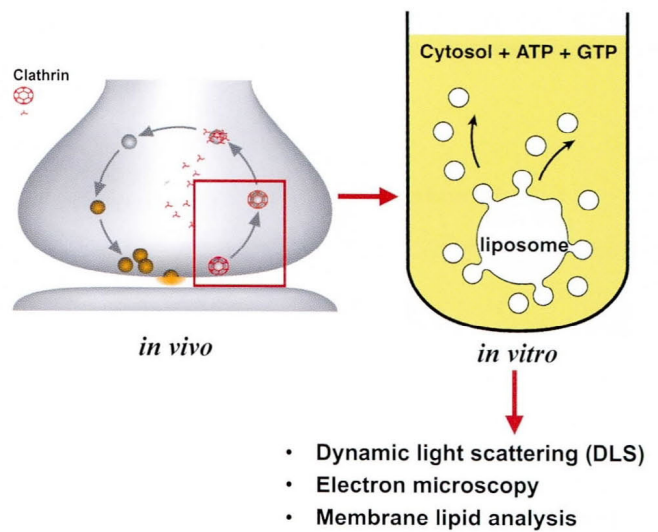


図2 リポソームを用いたエンドサイトーシス再構築モデル  
人工脂質膜(liposome)と脳細胞質タンパク質(cytosol)とを、スクレオチド存在下で反応させて(右)、シナプス小胞リサイクルの膜回収過程(左)を再構築する。

瞬時に測定することができるので、小胞形成の経時的変化を観察するためには有用な手段である。しかし、大小様々な粒子が混在する試料中の各粒子の大きさや量を測定することは困難である。

一方、様々な粒子が混在している溶液中では、粒子はその大きさに依存してブラウン運動をしている。そのため、入射光(レーザー光)に対するドブラー効果が異なり、混在粒子状態の違いが反射光(散乱光)の「ゆらぎ」の違いとして観察される。動的光散乱(dynamic light scattering, DLS)法は、この原理に基づいて「ゆらぎ」散乱光を測定し、溶液中に混在している様々な粒子の大きさ(直径)と各径の粒子が占める数および重量の度数分布を求めることができる方法である。図3にSLS法とDLS法の原理の違いを示した。

我々は、このDLS法を *in vitro* 実験系(図2)に適用して、反応液中に混在する残存大型リポソームと生成した小胞の直径(定性)、各粒子における数および重量の度数分布(定量)を測定した。小胞形成の反応条件と結果について次に述べる。

#### 2. 脳細胞質タンパク質によるリポソームからの小胞形成

まず、脳抽出脂質(Folch fraction type I) / cholesterol (80 : 20%, w/w) の組成で大型単層リポソーム (large unilamellar liposome, 直径 $1,545 \pm 175 \text{ nm}$ )<sup>6)</sup> を作製し

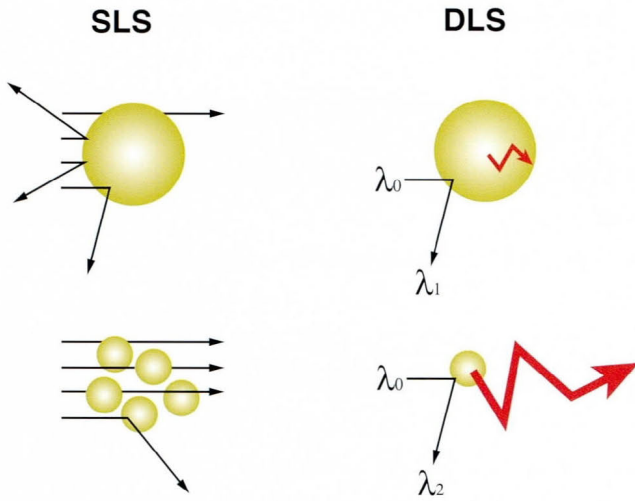


図3 静的光散乱法と動的光散乱法の測定原理図

静的光散乱 (SLS) 法 (左) : 大きい粒子に比べて小さい粒子は散乱光強度が弱くなる。粒子径の経時的変化を測定するのに適している。動的光散乱 (DLS) 法 (右) : 溶液中の粒子は大きさに応じたブラウン運動 (ギザギザ線) をしている。したがって、運動している粒子に光 (入射光波長  $\lambda_0$ ) を当てると、ドプラー効果によって反射光波長 ( $\lambda_1, \lambda_2$ ) が異なり、散乱光に ‘ゆらぎ (fluctuation)’ が生じる。DLS法は、大小粒子混在溶液中の粒子径および量を測定するのに適している。(文献3より改変)

た。本実験系では、リポソームの出来如何が大きく結果を左右する。次に、このリポソームと牛脳から部分精製した細胞質タンパク質とを細胞質緩衝液中、ATP および GTP 存在下で  $37^{\circ}\text{C}$  15 分間反応させた。反応液を DLS 法で測定した結果 (図 4 A), 大型単層リポソーム (直径  $1,545 \pm 175\text{nm}$ ) から小胞 (直径  $57 \pm 14\text{nm}$ ) が形成され、残存リポソーム (直径  $1,082 \pm 203\text{nm}$ ) は小さくなっていることが明らかになった。小胞の占める積算重量度数が 40% であったことから、元のリポソーム重量の 40% が小胞形成に使われたと定量された。また、反応液を Sephadex G-50 ドライカラムで処理して細胞質タンパク質 (顕微鏡観察の妨害) を除去し、電子顕微鏡で観察した結果 (図 4 B), 小胞が確認された。さらに、脂質膜の蛍光ラベル試薬 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene を用いて、この小胞が脂質膜小胞<sup>2)</sup> であることも確かめられた。

### 3. リポソームからの小胞形成はダイナミン依存性である

シナプス小胞膜回収のクラスリン依存性エンドサイトーシスでは、amphiphysin と dynamin 1 (神経シナプスに存在するアイソフォーム) との相互作用によっ

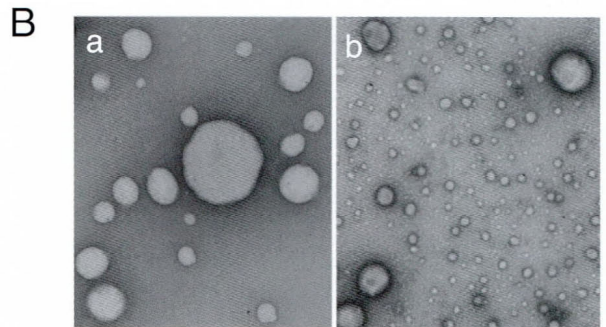
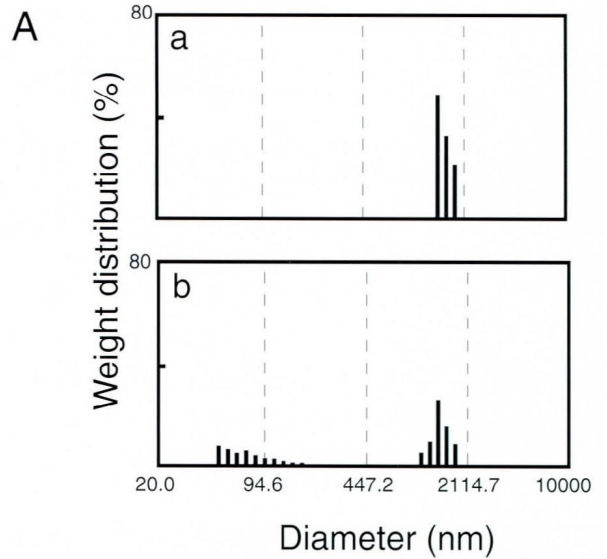


図4 脳細胞質タンパク質によるリポソームからの小胞形成  
A: DLS 測定. B: 酢酸ウランでネガティブ染色した電子顕微鏡像. 大型単層リポソーム (a) と脳細胞質タンパク質とを, ATP, GTP 存在下で反応させると小胞形成 (b) が起こる。(文献2より改変)

て、クラスリン被覆ピットの切断 (fission 過程) が起こると考えられている。

図5に示すように、dynamin 1は分子量100 kDa のタンパク質で、N末端側に GTPase 活性 domain を有し、被覆ピット頸部に重合してピット切断を引き起こす<sup>5, 7, 8)</sup> と考えられている。その作用機序については未だ明らかではないが、GTPase 作用によって dynamin のコンフォメーション変化がおこる mechanoenzyme 説<sup>4, 7, 9)</sup> と、GTP 結合 dynamin が未知の downstream effector を活性化するという説<sup>10, 11)</sup> がある。Dynamin は GTPase 活性 domain の他にも、細胞膜の phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] と結合する pleckstrin homology (PH) domain や GTPase 活性

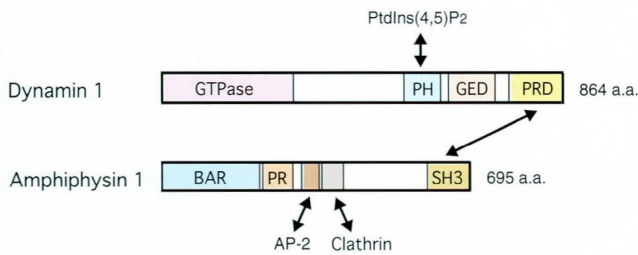


図5 Dynamin 1 および amphiphysin 1 の domain 構造

調節 domain (GRD), C 末端側には amphiphysin の Src homology 3 (SH3) domain と結合する proline rich domain (PRD) の存在が知られている。

一方, amphiphysin はクラスリン依存性エンドサイトーシスにおいてリンカータンパク質<sup>12)</sup>として機能している。脳シナプスでは amphiphysin 1 及び 2 のホモあるいはヘテロ二量体で存在している。Amphiphysin の N 末端側には BAR (BIN/amphiphysin/Rvs) domain があり, 二量体形成に関与している。最近, BAR domain の結晶構造解析がなされ, この domain がクラスリン被覆ピット頸部脂質膜二重層の“curvature sensor”として機能することが報告<sup>13)</sup>された。中央部には proline-rich (PR) region や AP-2/clathrin と結合する domain が存在し, C 末端側には dynamin 1 や synaptojanin 1 の PRD と結合する SH3 domain がある。また, SH3 domain と PR region の amphiphysin 分子内結合が作用発現の調節をしているとの報告<sup>14)</sup>もある。

Dynamin 1 と amphiphysin を *in vitro* で反応させると, 両者は共重合してリング状構造物を形成する。この構造物は, 被覆ピット頸部に形成される重合構造物と類似<sup>5)</sup>している。また, amphiphysin 1 の SH3 domain をシナプスにマイクロインジェクションして, dynamin 1 と amphiphysin 1 の結合が起こらないようにすると, シナプス小胞形成が阻害<sup>15)</sup>されることから, fission 過程における dynamin-amphiphysin 相互作用の重要性が示されている。

大型単層リポソームからの小胞形成反応に dynamin 1 が必要かどうかを調べるために, 免疫沈降法で dynamin 1 を除いた脳細胞質タンパク質と未処理の細胞質タンパク質とを用いて小胞形成能を比較した。その結果, 除去した細胞質タンパク質では, 小胞形成が著しく減少しコントロールの 20% となった。

さらに, GTP が小胞形成反応に必要なかどうかを調べるために, ヌクレオチドを加えないで反応を行なった結果, 小胞形成はほとんど起こらなかった。これらのことから, 本実験系による小胞形成反応は GTP (および ATP) を要求するダイナミン依存性<sup>2)</sup>のものであると考えられる。

#### 4. 小胞形成は PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> で増加する

細胞膜は流動性のあるリン脂質二重層で構成されており, 細胞外側と細胞質側ではリン脂質組成が異なっている。クラスリン依存性エンドサイトーシスによるシナプス小胞膜回収の初期過程では, 図 2 に示したように, clathrin, AP-2, AP180 といった被覆構成タンパク質が, 直接あるいは高度の制御を受けながらアクティブゾーンを取り巻く“endocytic hot spot”へ集まること<sup>8,16)</sup>が知られている。この初期過程が時間的, 空間的にどのようにして制御されているかは未だ不明な点が多い。

初期過程において, エンドサイトーシス機能タンパク質と細胞質側リン脂質, 特に負電荷を持つ PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> との相互作用が重要と考えられている (図 1 参照)。例えば, 被覆構成タンパク質である AP-2 の構成サブユニット  $\alpha$  や  $\mu 2$ , 周辺タンパク質である epsin の epsin N-terminal homology domain, dynamin の PH domain などが PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> と直接結合すること<sup>1,17)</sup>が知られている。すなわち, エンドサイトーシス機能タンパク質に対する細胞質側脂質膜の足場として PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が機能していると考えられる。

人工脂質膜であるリポソームは, 比較的自由にその脂質組成, 脂質濃度を選択して作製することができる。脳抽出脂質として得られる Folch fraction type I には phosphatidylserine (PS) が重量比で約 40~50% 含まれている。細胞質側の膜リン脂質組成を模して cholesterol/PS/phosphatidylethanolamine (20:40:34~40%, w/w) にイノシトールリン脂質である PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を 0~6% 加えて大型単層リポソームを作製し, 上述の実験系で反応させて DLS 法で小胞形成を測定した結果 (図 6), PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の添加量に相応して小胞形成量の増加が観察された。しかしながら, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の代謝産物である PtdIns(4)P や PtdIns を添加しても小胞生成量は変化しなかった。

これらのことから, 本実験系はエンドサイトーシスにおける脂質の作用を知る手段にも適していると考え

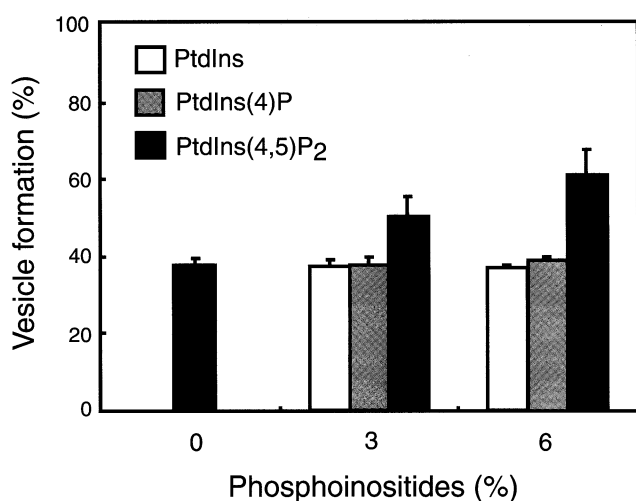


図6 イノシトールリン脂質による小胞形成量変化  
phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] を添加したリポソームを用いると小胞形成量は増加するが, phosphatidylinositol 4-phosphate [PtdIns(4)P] や phosphatidylinositol (PtdIns) の添加では形成量変化はみられない。(文献2より改変)

られる。

#### リポソームを用いたイノシトールリン脂質代謝研究

クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて, 細胞質側膜リン脂質として数%存在する PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> は機能タンパク質集積の足場として重要であるが, その役割を終えた後の被覆離脱段階ではむしろ分解される必要があると考えられる。したがって, シナプス小胞膜の exo-endocytotic cycling では, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の合成と分解が綿密に制御されている可能性がある。PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の分解は, シナプスに存在する synaptojanin 1 によって行なわれる。実際, synaptojanin 1 遺伝子のノックアウトマウスでは PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> レベルの増加がみられ, シナプスにおけるクラスリン被覆小胞の蓄積を起こすことが報告<sup>18)</sup> されている。

リポソームを用いる実験系のもう一つの利点は, 脂質の抽出・分析が容易なことであり, エンドサイトーシスにおけるリン脂質代謝の研究にも適していると考えられる。リポソームを用いて我々が行なった PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 代謝の研究結果を次に紹介する。

#### 1. リン脂質の抽出・分析法

細胞膜やリポソームからの脂質抽出は chloroform/methanol 混合液で容易に行える。リン脂質の分析は,

様々な展開溶媒を用いて high performance thin-layer chromatography (HPTLC) によって分析する方法<sup>19)</sup> が確立されている。また, 展開後の TLC 板に Ryu-MacCoss 試薬<sup>20)</sup> を噴霧するとリン脂質のみが青色スポットとして観察されることから, 他の脂質が混ざっている抽出試料でも, リン脂質のみを可視化することが可能である。

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> やその代謝産物などのイノシトールリン脂質の分析では, 1% potassium oxalate/methanol で前処理したシリカゲル TLC 板を用いて, chloroform/methanol/4M ammonium 混合液 (45:35:10, v/v) で展開し, Ryu-MacCoss 試薬で可視化することが可能<sup>2)</sup> である。この実験系にアイソトープラベルした脂質, 例えば [<sup>3</sup>H]-や [<sup>32</sup>P]-PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> などを用いることによって, 測定感度を大幅に改善することもできる。

High-performance liquid chromatography (HPLC) もリン脂質の分析に用いられている。しかしながら, イノシトールリン脂質の分析に関して言えば, 前処理として, アシル基 (脂肪酸側鎖) を加水分解によって切断 (deacylation) してから HPLC を行なうのが一般的である。最近, 我々は前処理することなく, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> やその代謝産物である PtdIns(4)P, PtdIns を同時に HPLC で測定する方法<sup>2)</sup> を確立した。

エンドサイトーシスにおける PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 代謝の意義を知る目的で, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の分解と小胞形成の関係を調べた結果を次に述べる。

#### 2. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 分解は小胞形成の初期段階でも起こる

脳細胞質タンパク質と 6% PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 含有大型単層リポソームとを, GTP および ATP 存在下で 37°C 15分間反応させた後, chloroform/methanol で脂質を抽出し, HPTLC および HPLC で脂質分析した。その結果 (図7), PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> は分解されて PtdIns(4)P および PtdIns が生成していた。

さらに, 小胞形成と脂質代謝との関係を明らかにする目的で, [<sup>3</sup>H]-PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> を含む大型単層リポソームと脳細胞質タンパク質とを反応させて, 小胞形成量と PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 分解の経時的変化を調べた。その結果 (図8), 驚いたことに, 小胞形成の初期段階で PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の分解がすでに進行していることが明らかとなった。

以上のことから, DLS 法と脂質分析法を併用するこ

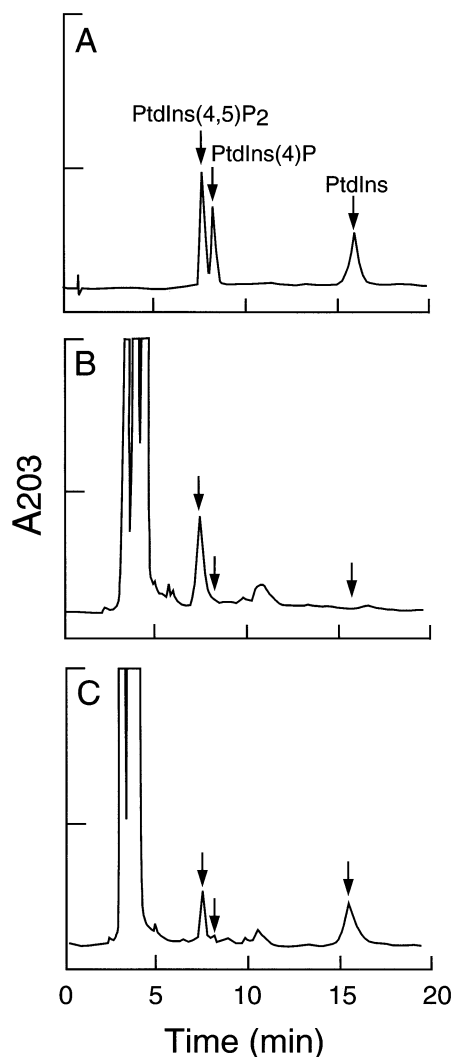


図7 HPLCによるPtdIns(4,5)P<sub>2</sub>分解の測定  
A: イノシトールリン脂質標準品。B: 反応前のリポソーム。C: 反応後の脂質抽出試料。脳細胞質タンパク質と6%PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>含有リポソームを、ATPおよびGTP存在下で反応させた後に脂質抽出し、HPLCを行なった。分析条件: カラム, Tosoh TSKgel Silica-60 (4.6×250mm); 溶出液, hexane/2-propanol/85% phosphate (850:145:5, v/v/v); 流速, 1ml/min. (文献2より改変)

とによって、小胞形成と膜脂質代謝の関連を知るツールとしても本実験系は有用であると考えられる。

### 本実験系の応用

最後に、エンドサイトーシス機能タンパク質—細胞膜リン脂質相互作用解析の一貫として本実験系を応用したごく最近の研究成果を紹介する。詳細については各論文を参照されたい。

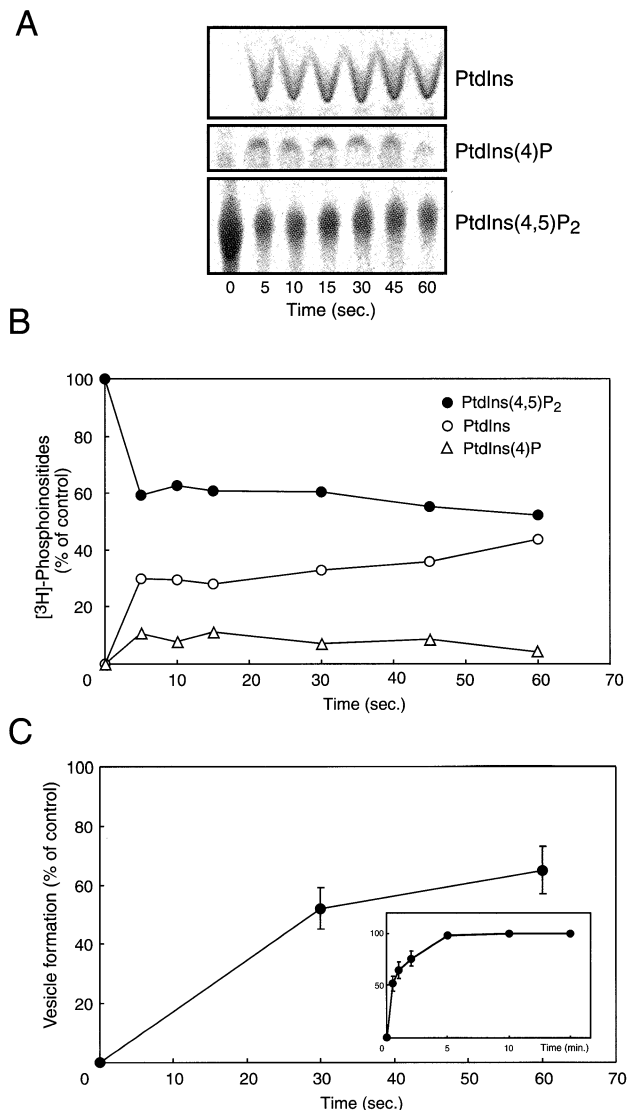


図8 小胞形成とPtdIns(4,5)P<sub>2</sub>分解の経時的比較  
脳細胞質タンパク質と[<sup>3</sup>H]PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>含有リポソームとを各時間反応させた後に脂質抽出試料を作製し、HPTLCで定性(A)し、BAS2000で定量(B)した。C: 各反応時間における小胞形成量をDLS法で測定した。PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>分解が小胞形成の初期段階でも起こっている。(文献2より改変)

### 1. 精製タンパク質による小胞形成能の解析

神経シナプス刺激によって、dynamin 1およびamphiphysinは脱リン酸化<sup>21,22</sup>されることから、これらのタンパク質はリン酸化—脱リン酸化によって機能制御されていると考えられている。最近、シナプスに高発現しているcyclin-dependent kinase 5/p35によってdynamin 1およびamphiphysin 1はリン酸化<sup>23</sup>され、calcineurin依存的に脱リン酸化されることで、細胞膜

へのリクルートメントが制御されること<sup>23)</sup>を明らかにした。この研究に本実験系を適用して、脱リン酸化型タンパク質はリポソームからの小胞形成能を有するが、リン酸化型タンパク質では著しく小胞形成能が低下すること<sup>23)</sup>をDLS法および電子顕微鏡観察で明らかにした。

本実験系をamphiphysin 1ノックアウトマウスから部分精製した脳細胞質タンパク質にも適用し、ノックアウトマウスから得た脳細胞質タンパク質では大型単層リポソームからの小胞形成は起きないが、amphiphysin 1を反応液に添加すると小胞形成が回復する<sup>24)</sup>ことを明らかにした。また、大型単層リポソームと精製dynamaminとをGTP存在下で反応させると、リポソーム膜のフラグメンテーションが起こり、そこに精製amphiphysin 1を共存させると、dynamamin GTPase活性の上昇にともなって小胞形成が促進される<sup>24)</sup>ことを明らかにした。さらに、リポソームの大きさによってdynamamin GTPase活性に対するamphiphysin 1の効果が異なる<sup>24)</sup>ことを示した。

これらの実験では、少量のタンパク質で小胞形成を行ない、DLS法を用いて重量ではなく数度分布で定量するように改善した。しかし、十分量の精製タンパク質が得られる時には積算重量度分布で定量することを薦める。

## 2. リポソームを用いた PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> の合成解析

神経シナプス小胞のリサイクルシステムに PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> の代謝が重要であることはすでに述べた。PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> の生合成は PtdIns から PtdIns(4)P を経て行なわれ、PtdIns 4-kinase および PtdIns(4)P 5-kinase が作用する。脳神経シナプスには、PtdIns(4)P 5-kinase type I  $\gamma$  が局在していることが報告<sup>25)</sup>されている。

我々は、ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) が PtdIns(4)P 5-kinase I  $\gamma$  に直接作用して酵素活性を高め、PtdIns (4,5) P<sub>2</sub> 合成が促進<sup>26)</sup>されることを明らかにした。この研究では、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 存在下で、PtdIns(4)P 含有リポソームと脳細胞質タンパク質、および Arf6 (野生型, 活性型, 非活性型) とを反応させて脂質抽出・分析を行なった。

## 結 語

リポソームを用いた無細胞実験系は、エンドサイトーシス機能タンパク質-膜リン脂質分子相互作用機構

を研究するために有用である。

## 謝 辞

本研究は、岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座、細胞生理学講座、米国エール大学 Pietro De Camilli 教授並びにゲッチンゲン大学 Volker Haucke 教授らのグループとの共同研究でおこなったものであり深謝します。本研究は、主に文部科学省科学研究費補助金によって行なわれた。

## 文 献

- 1) Takei K, Haucke V: Clathrin-mediated endocytosis: Membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* (2001) 11, 385-391.
- 2) Kinuta M, Yamada H, Abe T, Watanabe M, Li S-A, Kamitani A, Matsukawa T, Yasuda 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.
- 3) Kinuta M, Takei K: Utilization of liposomes in vesicular transport studies. *Cell Struct Funct* (2002) 27, 63-69.
- 4) Sweitzer SM, Hinshaw JE: Dynamamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* (1998) 93, 1021-1029.
- 5) Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P: Functional partnership between amphiphysin and dynamamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nature Cell Biol* (1999) 1, 33-39.
- 6) Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P: *Methods Enzymol* (2001) 329, 478-486.
- 7) Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P: Tubular membrane invaginations coated by dynamamin rings are induced by GTP  $\gamma$  S in nerve terminals. *Nature* (1995) 374, 186-190.
- 8) Slepnev VI, De Camilli P: Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* (2000) 1, 161-172.
- 9) Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT: GTPase activity of dynamamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* (2001) 410, 231-235.
- 10) Newmyer SL, Christensen A, Sever S: Auxilin-dynamamin interactions link the uncoating ATPase chaperone machinery with vesicle formation. *Dev Cell* (2003) 4, 929-940.
- 11) Song BD, Schmid SL: A molecular motor or a regulator? Dynamamin's in a class of its own. *Biochemistry* (2003) 42,

- 1369-1376.
- 12) David C, McPherson PS, Mundigl O, De Camilli P: A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 331-335.
  - 13) Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT: BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* (2004) **303**, 495-499.
  - 14) Farsad K, Slepnev V, Ochoa G, Daniel L, Hauke V, De Camilli P: A putative role for intermolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacol* (2003) **45**, 787-796.
  - 15) Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L: Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* (1997) **276**, 259-263.
  - 16) Brodin L, Low P, Shupliakov O: Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* (2000) **10**, 312-320.
  - 17) 絹田正裕, 竹居孝二: イノシトールリン脂質によるエンドサイトーシスの制御機構. *生化学* (2003) **75**, 1449-1452.
  - 18) Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, De Camilli P: Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* (1999) **99**, 179-188.
  - 19) Kupke IR, Zeugner S: Quantitative high-performance thin-layer chromatography of lipids in plasma and liver homogenates after direct application of 0.5-microliter samples to the silica-gel layer. *J Chromatogr* (1978) **146**, 261-271.
  - 20) Ryu EK, MacCoss M: Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives on thin-layer chromatography. *J Lipid Res* (1979) **20**, 561-563.
  - 21) Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P: Amphiphysin 1 is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* (1997) **272**, 30984-30992.
  - 22) Cousin MA, Robinson P: The dephosphins: Dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci* (2001) **24**, 659-665.
  - 23) Tomizawa K, Sunada S, Lu Y-F, Oda Y, Kinuta M, Ohshima T, Saito T, Wei F-Y, Matsushita M, Li S-T, Tsutsui K, Hisanaga S, Mikoshiba K, Takei K, Matsui H: Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol* (2003) **163**, 813-824.
  - 24) 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) in submission.
  - 25) Wenk MR, Pellegrini L, Klenchin VA, Di Paolo G, Chang S, Daniell L, Arioka M, Martin TF, De Camilli P: PIP kinase I  $\gamma$  is the major PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesizing enzyme at the synapse. *Neuron* (2001) **32**, 79-88.
  - 26) Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Hauke V: ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type I  $\gamma$ . *J Cell Biol* (2003) **162**, 113-124.