総説

小胞体における輸送小胞形成とタンパク質選別機構

佐藤 健 東京大学大学院総合文化研究科

Newly synthesized secretory proteins are transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex in vesicles coated with COPII coat proteins. The incorporation of certain cargo molecules into the COPII vesicles is mediated by direct interaction between the cytoplasmic domain of the cargo protein and COPII coat components. The assembly and disassembly of COPII coat components on the membrane are regulated by the small GTPase Sar1p. Our recent data suggest that the Sar1p GTPase cycle plays a key role in the regulation of COPII coat dynamics and cargo sorting during vesicle formation.

endoplasmic reticulum / COPII / small GTPase / proteoliposome / FRET / vesicular transport

1. はじめに

核をもつ生物の細胞の中には、核、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、葉緑体、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームなどの細胞小器官（オルガネラ）とよばれる膜構造が見られる。これらのオルガネラは細胞内でそれぞれ独自の機能を担っており、細胞が正常に機能するためには、細胞内で合成される数万種にもおよぶタンパク質が、目的地であるオルガネラへと正確に運ばなくてはならない。オルガネラのうち、小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、核へと輸送されるタンパク質は、サイトゾルで合成されたのち、シグナル配列によって指定された行き先に直接標的化されるのに対して、ゴルジ体、液胞、エンドソーム、細胞膜などのオルガネラで機能するタンパク質や、細胞外に分泌されるタンパク質は、すべてまず小胞体に標的化され、小胞体内腔、あるいは小胞体膜上で高次構造や膜内構造を形成したのち、小胞輸送とよばれるメカニズムによって各オルガネラへと運ばれる。

小胞輸送とは、送り手側のオルガネラから輸送されるタンパク質である「積み荷」を選択的に取り込んだ直径 50-100 nm の膜小胞（輸送小胞）が出芽し、それが受け手側のオルガネラまで移動し、膜融合によって輸送小胞上の膜成分と中身とを受け渡すこと

によって営まれる。輸送小胞はコートタンパク質とよばれるタンパク質複合体によって被覆されており、コートタンパク質の輸送小胞上へのアセンブリーは低分子量 GTPase によって制御されている。最近の研究から、この低分子量 GTPase はコートタンパク質の膜上へのアセンブリーだけでなく、輸送小胞への選択的な積み荷の取り込みにもかかわっていることがわかってきた。本稿では、小胞体からの輸送小胞形成と積み荷タンパク質選別機構に焦点をあて、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた研究を中心に紹介する。

2. 小胞体からの輸送小胞形成

細胞内の各オルガネラを結ぶそれぞれの小胞輸送経路では、異なるタイプのコートタンパク質と低分子量 GTPase が使い分けられており、輸送小胞は被覆されるコートタンパク質の名前を冠したよび方をされている (Fig. 1)。小胞体から形成される輸送小胞は coat protein complex II (COPII) とよばれる Sec23/24p 複合体および Sec13/31p 複合体からなるコートタンパク質によって覆われており、COPII 小胞とよばれる¹⁾。COPII 小胞の形成は、低分子量 GTPase である Sar1p が小胞体膜上のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Sec12p によって GDP 型 (不活性型)

Selective Protein Export from the Endoplasmic Reticulum

Ken SATO

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

Fig. 1

Intracellular transport pathways.

から GTP 型（活性型）に変換されることによって開始される。GTP 型となった Sar1p は構造変化を起こし、N 末端の両親媒性ヘリックスを分子の外に露出し、この領域を介して小胞体膜へと結合する²⁾。

膜に結合した GTP 型 Sar1p はサイトゾル中の Sec23/24p 複合体と Sec23p サブユニットを介して結合し、また、Sec24p サブユニットは小胞体膜上の積み荷タンパク質と結合することによって pre-budding complex とよばれる Sar1p-Sec23/24p- 積み荷タンパク質からなる複合体を小胞体膜上に形成する³⁾。この pre-budding complex どうしを Sec13/31p 複合体がお互いに架橋することにより COPII コートと積み荷タンパク質が膜上に集合する。集合した COPII コートは、膜の曲率を物理的に変化させ、直径 50-60 nm の COPII 小胞を形成する (Fig. 2)。

Sec23/24p 複合体の結晶構造を見てみると、Sec23/24p 複合体は全体的に湾曲しており、その曲率はちょうど直径 50-60 nm の球面の曲率と一致する²⁾。また、膜系が存在しなくても精製された COPII コートのみが集合して COPII 小胞と同程度の大きさの中空のかご様構造体を形成することから、形成される COPII 小胞の大きさは COPII コートによって決まると考えられている⁴⁾。出芽した COPII 小胞は、最終的に小胞体膜から脱離するが、Sar1p の N 末端の両親媒性ヘリックスに変異を導入すると、COPII 小胞の出芽はおこるものの、脱離しないという現象が報告されている⁵⁾。このことから、COPII 小胞の小胞体膜からの脱離には Sar1p の N 末端の両親媒性ヘリックスが重要な役割を果たしている可能性が高い。

3. COPII コートを介した積み荷タンパク質の取り込み

小胞輸送で運ばれる積み荷タンパク質は、サイトゾ

Fig. 2

Model for coordinated assembly of the COPII coat and cargo selection.

ルで合成されるとともにシグナルペプチドの働きにより小胞体膜を透過して内腔、あるいは小胞体膜に標的化される。小胞体に標的化された積み荷タンパク質のうち膜タンパク質は、サイトゾル側に輸送シグナルとよばれるアミノ酸配列を露出している⁶⁾。この輸送シグナルを介して Sec24p サブユニットが結合し、pre-budding complex が形成される。これまでに同定されている輸送シグナルは多様性に富んでおり、DxE（アスパラギン酸-X-グルタミン酸）モチーフ、LxxLE モチーフ、2つのフェニルアラニン残基からなる FF モチーフなどのように共通した特徴は見いだされていない。また、これらの配列は COPII コートと必ずしも結合しない例もあり、その特異性はこれまでのところ明確ではない。

これに対して、小胞体内腔の可溶性の積み荷タンパク質は、サイトゾル側の COPII コートと直接相互作用することができないため、膜貫通型積み荷レセプターを介して COPII コートと pre-budding complex を形成する。酵母の積み荷レセプター Erv29p は、 α ファクター前駆体やカルボキシペプチダーゼ Y といった膜貫通領域をもたない可溶性の積み荷タンパク質と複合体を形成し、この Erv29p がサイトゾル側にもつ輸送シグナルに Sec23/24p 複合体が結合して pre-budding complex が形成される⁷⁾。また、動物細胞の ERGIC-53 とその酵母ホモログ Emp46/47p は、小胞体内腔のレクチンドメインを介して糖タンパク質に対する積み荷レセプターとして機能しているという証拠が得られてきている^{8),9)}。このように、膜貫通型積み荷レセプターは、1つのレセプターが複数の可溶性積み荷タンパク質を認識しているようである。

一方、膜タンパク質の中にも直接 COPII コートと結合するのではなく、アダプター分子を必要とするも

のが知られている。サイトゾル側に露出した領域をまったくもたない GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型タンパク質である Gas1p の輸送には Emp24p/Erp25p 複合体がアダプターとして機能しているようである¹⁰⁾。また、サイトゾル領域をもつような V-ATPase, Axl2p といった膜タンパク質に対しても、それぞれ Vma12/21p, Erp14p がアダプターとして機能していることが明らかになっており^{11), 12)}、アダプター分子については、アダプターを必要とする個々の積み荷に対して特異的なものが用意されているようである。サイトゾル領域をもつ膜タンパク質が COPII と直接結合するのではなく、このようなアダプター因子を必要とする理由として、積み荷となるタンパク質のサイトゾル領域がそのタンパク質の機能上重要であり、COPII 結合のための配列が付加できないためではないかと考えられている。

輸送シグナルと結合する Sec24p サブユニットには、膜と接する面に少なくとも「A-site」, 「B-site」, および「Arg342」とよばれる 3 つの輸送シグナル結合部位が存在し、それぞれが異なったタイプの輸送シグナルと結合することが明らかになっている^{13), 14)}。また、出芽酵母には Sec24p に加え、Iss1p (Sec24p と 56% の相溶性)¹⁵⁾ と Lst1p (Sec24p と 23% の相溶性)¹⁶⁾ という 2 つのホモログが存在し、動物細胞においても、Sec24A-D という 4 つのホモログが同定されている¹⁷⁾。これらの Sec24p ホモログは、それぞれ Sec23p と複合体を形成し、Sec24p とは異なるタイプの輸送シグナルと結合するようである。これらのコートタンパク質が組み合わさることにより幅広い積み荷が認識され、COPII 小胞への効率的な積み荷の取り込みを可能にしていると考えられる。

4. COPII 小胞形成のパラドックス

一般に低分子量 GTPase は、GEF による GDP 結合型から GTP 結合型への変換と、GTPase 活性化因子 (GAP) による GTP 加水分解促進によって GDP 結合型に戻るという 2 つの状態をサイクリックに行き来し、これによってさまざまな生体反応を調節していることが知られている。COPII 小胞の形成で機能する低分子量 GTPase Sar1p の場合、小胞体膜上の Sec12p が GEF として機能しているのに対して、GAP として機能しているのは Sec23/24p 複合体のうちの Sec23p サブユニットである。このため、膜上で pre-budding complex が形成されたとたん、GTP が加水分解されて Sar1p と Sec23/24p は膜から解離してしまい、COPII 小

胞の形成が中断されてしまうことになる (Fig. 2)。実際、リポソームに Sar1p, Sec23/24p, および Sec13/31p 存在下で、GTP の非水解アナログである GMP-PNP を加えて Sar1p を GTP 型にロックした状態では COPII 小胞が形成されるのに対して、GTP 存在下では COPII 小胞の形成が起こらないことが示されている¹⁸⁾。COPII 小胞形成過程において、Sar1p はどの段階で GTP を加水分解しているのであろうか？ このパラドックスが長年大きな謎として残っていた。

この謎を解くためには、COPII 小胞形成過程における Sar1p の GTP 加水分解を測定して解析する必要がある。細胞から分画した小胞体膜を用いた COPII 小胞形成の *in vitro* 実験系は 10 年以上前からあるものの、この実験系では Sar1p 以外の GTPase が多数混在しているため、COPII 小胞形成過程における Sar1p の GTP 加水分解のみを切り離して測定することはこれまで非常に困難であった。そこでわれわれは、単一の積み荷タンパク質を再構成したプロテオリポソームに、精製した Sar1p, Sec23/24p, Sec13/31p を加えて、精製因子のみによる COPII 小胞形成反応の完全再構成系を構築して COPII 小胞形成過程における Sar1p の GTP 加水分解について解析を行った¹⁹⁾。

5. FRET を用いた pre-budding complex 形成・解離の検出

われわれは pre-budding complex の形成と解離の過程を詳細に解析するため、CFP (青色蛍光タンパク質) で標識した積み荷タンパク質と、YFP (黄色蛍光タンパク質) で標識した Sec23/24p を用いて、CFP-YFP 間の FRET シグナルを指標とした積み荷タンパク質とコートタンパク質間の相互作用と、Sar1p の自家蛍光変化を指標とした GTP 加水分解をリアルタイムでモニターする実験系を構築した (Fig. 3a)^{20), 21)}。われわれが積み荷タンパク質のモデルとして用いたのが SNARE とよばれる膜タンパク質である。SNARE は輸送小胞上の v-SNARE と、ターゲットとなるオルガネラ膜上の t-SNARE との間の相互作用によって膜融合を引き起こす因子であり、すべての輸送小胞は必ず SNARE を取り込んでいる。小胞体から形成された COPII 小胞はゴルジ体へと運ばれて膜融合するが、このときに機能しているのが v-SNARE である Bet1p と、Sed5p/Sec22p/Bos1p 複合体から構成される t-SNARE である。

これらの SNARE のうち、まず Bet1p に CFP を融合させたものを再構成したプロテオリポソームに、あ

あらかじめスクレオチドを結合させた Sar1p を加えておく。ここに YFP を融合させた Sec23/24p を加えると、GMP-PNP 存在下ではプロテオリポソーム上での pre-budding complex 形成にともなう CFP-YFP 間の FRET シグナルの上昇が観察される (Fig. 3b)。これに対して GTP 存在下では、pre-budding complex 形成にともなう一時的な FRET シグナルの上昇が観察されるものの、Sar1p の GTP 加水分解にともなう pre-budding complex の解離によって、FRET シグナルが徐々に減少していくようすが観察される。ところが、このときの Sar1p の GTP 加水分解のタイムコースを見てみると、FRET シグナルの減少が完了する前に、Sar1p の GTP 加水分解が完了してしまっていることがわかる。このことから、Sec23/24p の Bet1p からの解離は、Sar1p の GTP 加水分解と同時にではなく、Sar1p が GTP を加水分解したのち、少し遅れて解離が起こっているということになる。これに対して、Bet1p 上の輸送シグナルに変異を入れて、Sec23/24p が結合できなくした変異型 CFP-Bet1p-LxxAA で同様の実験を行ったところ、Sar1p-Sec23p 間の相互作用により pre-budding complex は形成されるものの、Sec23/24p の Bet1p からの解離は Sar1p の GTP 加水分解とほぼ同時に完了する (Fig. 3c)。これらのことから、Sec23/24p と Bet1p との間の結合は、Sar1p が GTP を加水分解した後も、輸送シグナルに依存してごく短時間の間保持されているということになる。

以上はモノマーで COPII 小胞に取り込まれる v-SNARE, Bet1p についての現象であるが、それでは複合体を形成して COPII 小胞に取り込まれると考えられている t-SNARE についてはどうなのであろうか？ t-SNARE を構成する Sed5p/Sec22p/Bos1p の因子のうち、まず Sec22p に CFP を融合させたもののみを再構成したプロテオリポソームを用いて FRET のアッセイを行うと、Sec23/24p の Sec22p からの解離は Sar1p の GTP 加水分解とほぼ同時に完了する (Fig. 3d)。これに対して完全な状態の t-SNARE である Sed5p/Sec22p/Bos1p では、Sar1p が GTP を加水分解しているにもかかわらず、Sec23/24p と Sed5p/Sec22p/Bos1p 複合体との結合が維持されている。さらに、GDP 存在下においても Sec23/24p が Sed5p/Sec22p/Bos1p 複合体へゆっくりと結合していくようすが観察される (Fig. 3e)。これは、Sed5p/Sec22p/Bos1p のそれぞれがもっている輸送シグナルが複合体上に呈示されたことによって、Sec23/24p との親和性が上昇したためと考えられる。これらのことから、Bet1p や t-SNARE 複合体のように COPII 小胞に取り込まれる要件を満たした SNARE に結合し

Fig. 3

Assembly/disassembly kinetics of Sec23/24p as detected by FRET and tryptophan fluorescence assay of GAP-catalyzed GTP hydrolysis on Sar1p with proteoliposomes. (a) FRET experimental design. (b-e) The reaction initially contained proteoliposomes reconstituted with CFP-Bet1p (b), CFP-Bet1p-LxxAA (c), CFP-Sec22p (d), or CFP-Sec22/Bos1/Sed5p (e) and Sar1p loaded with GDP, GTP, or GMP-PNP. At the indicated time points, YFP-Sec24/23p was added and the FRET signal at 530 nm was continuously monitored (top panels). Sar1p GTP hydrolysis was monitored by tryptophan fluorescence of Sar1p at 340 nm (bottom panels).

た Sec23/24p は, Sar1p の GTP 加水分解後も, Sec23/24p-SNARE 複合体がごく短時間保持されていることになる. 一方, 複合体を形成していないモノマーの t-SNARE に結合した Sec23/24p は, Sar1p の GTP 加水分解と同時に解離してしまう. われわれはこの Sar1p の GTP 加水分解から Sec23/24p が積み荷から解離するまでのわずかな「ラグ」が COPII 小胞への積み荷の選別に重要な役割を果たしていることを, 次に述べるような実験から見いだした.

6. Sar1p の GTPase サイクルによる積み荷タンパク質の選別

上記の FRET アッセイでは, Sar1p にあらかじめ結合させておいた GTP が加水分解されるという 1 ラウンドの反応しか観察することができない. ところが, 小胞体膜上では GEF である Sec12p の働きによって, 加水分解を終えた GDP 型の Sar1p は, 再び GTP 型へと変換される. そこで, Sec12p 存在下で FRET アッセイを行ってみると, Bet1p, および Sec22p のどちらの場合においても, GTP 存在下で FRET シグナルの減少, すなわち Sec23/24p の SNARE からの解離が観察されなくなるという結果が得られた. これは, pre-budding complex 中の Sar1p が Sec23p の GAP 活性により GTP を加水分解して GDP 型となるものの, 膜上の Sec12p の働きによって速やかに GTP 型へと変換され, pre-budding complex が再度形成されるというサイクルを繰り返している結果と考えられる.

前述の Sec12p 非存在下での FRET アッセイの結果から, Bet1p や t-SNARE 複合体に結合した Sec23/24p は Sar1p の GTP 加水分解後もごく短時間複合体が保持される. このことから, Sec12p 存在下では Sar1p が GTP を加水分解したのち, Sec23/24p が Bet1p や t-SNARE 複合体から解離する前に再活性化された GTP 型 Sar1p が Sec23/24p-SNARE 複合体に再結合するというモデルが考えられる. この場合, ひとたび Bet1p や t-SNARE に結合した Sec23/24p は, Sar1p が GTP 加水分解を繰り返しても解離することなく, pre-budding complex が維持される. これに対して Sec22p のみの場合, Sar1p の GTP 加水分解と同時に Sec23/24p が解離してしまうことから, Sec22p 上では Sar1p の GTP 加水分解のたびに Sec23/24p が解離を起こし, Sec12p による再活性化と同時に新たな Sec23/24p が結合するというサイクルを繰り返していることが予想される. これらのモデルを検証するために, Sec12p 存在下の FRET アッセイの反応途中で, YFP を

Fig. 4 Coat exchange on SNAREs during Sar1p GTPase cycle. The FRET assay was carried out as in Fig. 3 with CFP-Bet1p/Sec12p (a) or CFP-Sec22p/Sec12p (b).

Fig. 5 Model for GTP hydrolysis-driven proof-reading by Sar1p.

融合させていない Sec23/24p を加えることにより, SNARE 上にすでに結合している YFP-Sec23/24p と後から加える Sec23/24p との交換反応を調べた (Fig. 4). その結果, Bet1p や t-SNARE 複合体上では Sec23/24p を添加しても FRET シグナルに変化は見られず, Sec23/24p の交換反応は起こっていないのに対して, Sec22p 上では Sec23/24p の添加にともなって FRET シグナルがゆっくりと減少し, Sec23/24p の交換反応が観察された.

これらの結果から, 適切な積み荷である Bet1p や t-SNARE 複合体に結合した Sec23/24p は, Sar1p の GTPase サイクルの中でも常に結合が保持され, Sec13/31p による架橋により COPII 小胞へと効率的に取り込まれる. 一方, 複合体を形成していないような不適切

な積み荷タンパク質に結合した Sec23/24p は, Sar1p の GTPase サイクルによって常に解離が起こっており, COPII 小胞への取り込みの効率が低下する (Fig. 5). つまり, Sar1p は GTP 加水分解を繰り返すことによって積み荷タンパク質の選別を行っているという分子機構が浮かび上がってくる.

7. おわりに

小胞体はタンパク質合成の場であるため, 合成直後の積み荷タンパク質の中には, 高次構造形成やサブユニットのアセンブリーが完了していないものも多く存在していると考えられる. そのようなタンパク質でも, サイトゾル側に輸送シグナルを呈示しているため, Sec23/24p は結合することができる. ところが実際に COPII 小胞に取り込まれるタンパク質は高次構造の形成が完了したものがほとんどであり, これは積み荷タンパク質の選別が, Sec23/24p の輸送シグナルへの結合のみによって行われているという従来のモデルでは説明ができない. また, これまでに同定されている輸送シグナルは, FF モチーフ, DXE モチーフなどのように単純なアミノ酸配列であり, 小胞体から輸送されないタンパク質にもこれと似たアミノ酸配列をもつものが数多く存在する. そういったタンパク質が COPII 小胞に誤って取り込まれるのを防ぐため, Sar1p は GTP 加水分解のエネルギーを利用して, 積み荷タンパク質選別過程において「校正」(proof-reading)を行っていると考えられる.

われわれは最近, 完全再構成系を發展させ, 顕微鏡下で人工脂質平面膜上に蛍光標識した積み荷タンパク質を再構成し, 輸送小胞形成過程を可視化することを試みている. 小胞輸送のような生体膜上で複数の因子がダイナミックな解離会合を行うことで発現する現象の分子レベルでの解析について, 膜上でのタンパク質の解離会合のようすを直接可視化して定量的に解析することができれば, 大きなブレークスルーとなることが期待できる.

文 献

- 1) Barlowe, C. *et al.* (1994) *Cell* **77**, 895-907.
- 2) Bi, X., Corpina, R. A. and Goldberg, J. (2002) *Nature* **419**, 271-277.
- 3) Kuehn, M. J., Herrmann, J. M. and Schekman, R. (1998) *Nature* **391**, 187-190.
- 4) Antonny, B., Gounon, P., Schekman, R. and Orci, L. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 419-424.
- 5) Lee, M. C. *et al.* (2005) *Cell* **122**, 605-617.
- 6) Barlowe, C. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 295-300.
- 7) Belden, W. J. and Barlowe, C. (2001) *Science* **294**, 1528-1531.
- 8) Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F. and Hauri, H. P. (1999) *Nature Cell Biol.* **1**, 330-334.
- 9) Sato, K. and Nakano, A. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 2518-2532.
- 10) Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H. P. and Riezman, H. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 925-930.
- 11) Graham, L. A., Hill, K. J. and Stevens, T. H. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 39-49.
- 12) Powers, J. and Barlowe, C. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 880-891.
- 13) Mossessova, E., Bickford, L. C. and Goldberg, J. (2003) *Cell* **114**, 483-495.
- 14) Miller, E. A. *et al.* (2003) *Cell* **114**, 497-509.
- 15) Kurihara, T. *et al.* (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 983-998.
- 16) Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R. and Kaiser, C. A. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 659-672.
- 17) Tang, B. L., Kausalya, J., Low, D. Y., Lock, M. L. and Hong, W. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 679-684.
- 18) Matsuoka, K. *et al.* (1998) *Cell* **93**, 263-275.
- 19) Sato, K. and Nakano, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 1330-1335.
- 20) Sato, K. and Nakano, A. (2005) *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 167-174.
- 21) Sato, K. and Nakano, A. (2005) *Methods Enzymol.* **404**, 83-94.

佐藤 健

佐藤 健(さとう けん)

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻准教授

1993 年東京工業大学工学部卒業, 97 年東京工業大学大学院生命理工学研究科修了. 博士 (理学). 97-98 年米国ダートマス大学博士研究員, 98-2000 年名古屋大学大学院理学研究科 助手, 00-07 年 3 月理化学研究所中央研究所研究員, 02-06 年科学技術振興機構さきがけ (兼務), 07 年 4 月より現職.

研究内容: 小胞体からの小胞輸送

連絡先: 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

E-mail: kensato@bio.c.u-tokyo.ac.jp