解説

エンドソームとリソソームの相互作用

京都大学理学部生物物理学教室 大橋 正人

Endocytosis/Lysosome/Membrane Transport/Intracellular Sorting/Membrane Fusion

はじめに

細胞には、外来物質を形質膜の陥入によって内部に取り込み（エンドサイトーシス）、それをリソソーム中で分解するという膜動過程がある。古典的にはこの現象は、ゴルジ体から生じた酸性加水分解酵素を含む一次リソソームが、エンドサイトーシスによって生じたエンドソームと融合して、二次リソソームを生じると表現されていた（図1）。現在では、この経路に關与する膜系の生化学的なキャラクタリゼーションを通して、エンドソームが単一の膜構造体ではないことがわかってきている。またそれらは、非常に制御された膜動輸送をおこなっている動的な構造であるらしい。本稿では、細胞内のエンドソーム-リソソーム相互作用についての最近のイメージを紹介する。つぎに、その不明な点を明らかにするため、現在進められている研究方法について述べる。

図1.

1. エンドソーム-リソソーム相互作用の再構成¹⁾

細胞内での膜動輸送を、*in vitro*で再現しようとい

Endosome-Lysosome Interaction

Masato OHASHI

Department of Biophysics, Faculty of Science Kyoto University

う試みが種々、なされている。最近、ラットの肝実質細胞でエンドサイトーシスされる、アシアロフェチュインのエンドソームからリソソームへの移行が、*in vitro*で再構成された。

Mullock らは、放射性標識されたアシアロフェチュインをラット肝に受容体媒介エンドサイトーシスで取り込ませ、その、後ミトコンドリア画分を、ナイコデントの密度勾配遠心法で、密度の軽いエンドソームと、それより重いリソソームを分離、分析した。このリガンドを10分間だけ取り込ませると、リガンドはエンドソーム画分にだけ見いだされる。このようにしてエンドソームにだけリガンドを含んだ、後ミトコンドリア画分をATP再生系とともに、37℃で30分インキュベートすると、リガンドが重いリソソーム画分に移るのが観察された。この移行には無傷のサイトゾル、リソソーム画分、それにATP再生系の存在が必要であった。さらに、フィコールの密度勾配遠心で、エンドソームをエンドサイトーシス後、初期（5分以内）にリガンドのあらわれる密度の軽いものと、それより後の重いエンドソームの二種類に分画して分析すると、このリソソームへの移行は、重い方の後期エンドソームからのみ起こることがわかった。

このように、エンドサイトーシス直後のエンドソームがそのままランダムにリソソームと融合するのではなく、段階をふんだエンドソームが、特異的にリソソームと相互作用する。そして、その過程を進行、あるいは制御している、細胞内因子が存在しているのである。

2. 初期エンドソームと後期エンドソーム

一方、*in vitro*でのエンドソーム同志の融合という現象が知られている。その場合には、融合はエンドサイトーシス後5分以内の初期エンドソーム間でのみ起こる。このことから、エンドサイトーシス経路の膜小胞の融合能が、初期エンドソームから、後期エンドソームへの進行にともない制御されているといえる。

このように融合能の変化は、エンドソームのステップの進行を特徴づけることの一つである。

実のところ、初期、後期エンドソームに明確な区別があるわけではない。エンドソームは明確な構造を持たず、また少なくとも最近まで、よいマーカータンパク質はなかった。現状では、それぞれの研究グループがそれぞれの分析法で、エンドソーム過程の進行を検出し、段階づけており、それらの間にはふつう対応付けられていない。しかし一般に、初期-後期エンドソーム過程で、次のようなことが進行していると考えられている。

- (1) 前期エンドソームは一般に形質膜に近い細胞表層部にあり、後期のそれは、より深いところにあるといわれる。つまり、細胞内での場所の変化が起こっている。
- (2) エンドサイトーシスされた物質は、すべてリソソームに移行して分解されるのではない。あるものは、再利用のために形質膜へ逆輸送され、またあるものは、はじめにエンドサイトーシスされた形質膜と隔てられた、形質膜の異なった面に運ばれる。そのような物質は、後期エンドソームに達することなく、前期エンドソームのみを経由して目的地に達する。このように、前期エンドソームから先へ進む段階で、輸送物質の選別が行われている。
- (3) 初期エンドソームと、後期エンドソームは、形態的にも特徴がある。初期エンドソームは、チューブ状の構造や、膜小胞から延びたチューブ状などが知られ、よく tubulovesicular であると表現される。後期エンドソームには、内部にさらに小胞を持った MVB (multivesicular body) が最も特徴的である。
- (4) 初期、後期エンドソームは、それぞれ特徴的なタンパク質組成を持っている。

このようなエンドソーム過程の進行について二つのモデルがある。それらは、この過程の進行が、リガンドの膜構造間の輸送であるのか、それともリガンドを含む膜構造体が成熟してゆくのか、という問題意識によっている。第一の可能性では、初期・後期エンドソームに対応する膜構造が、細胞内に恒常的に存在して、リガンドは、その間をシャトルベシクルによって移行して行く。第二の可能性では、リガンドを含む膜構造自身が、変容をとげ、後期エンドソームに成熟する。これらのモデルのどちらが正しいかという決着はついていない。このうちベシクルのシャトルという考え方は、よく知られている小胞体-ゴルジ体間、あるいは、ゴルジ層板間輸送にみられる小胞輸送にならっ

たものである。しかし、恒常的なエンドソームというのは明らかに捕らえられていない。では、エンドソーム膜が成熟するとしたらそのメカニズムはどんなものであろうか。それはやはり、おもにその膜構造に対する、膜融合、膜分裂をとともなう物質の出入りによって達成されるのではないだろうか。だとすれば、上の二つのモデルの区別はリガンドを含む膜構造がそこに出入りする膜小胞より大きいのか（成熟）、それとも逆にリガンドを含むものの方が小さいか（輸送）ということになり、本質的な違いはないのかも知れない。いずれにせよ、非常によく制御された膜輸送の進行の結果、この段階が進んでいるといつてよいであろう。

3. エンドソームにおける輸送制御の機構

エンドソームにおける輸送の制御はどの様に行われているのだろうか。エンドソームの乗客の仕分けのメカニズム、および輸送小胞が、その目的地をどの様に見分けるかという問題はほとんどわかっていない。このような現象は、それぞれの膜構造に比較的特異的に存在する因子によって担われている可能性が高い。初期・後期エンドソーム間でその組成が異なっていることをすでに述べた。しかしエンドソームに局在することがわかっているタンパク質でその素性が同定されているものは少ない。

1) エンドソームに局在するタンパク質

最近になって、ras タンパク質と相同性の高い低分子量 GTP 結合タンパク質群のうちのあるものが、エンドソームに局在することが明らかとなった²⁾。真核細胞でのタンパク質分泌経路では、少なくとも12の低分子量 GTP 結合タンパク質が、膜動輸送の制御に関わっていることが、直接、間接に示唆されている。酵母では、小胞体-ゴルジ間、およびゴルジ層板間輸送に関わる YPT1, ARF, SAR1, また分泌小胞から形質膜への移行に関与する SEC4 等が含まれる。哺乳動物細胞では、rab 遺伝子ファミリーがこれにあたる。そのうちの rab5 遺伝子産物が形質膜および、初期エンドソームに、また rab7 遺伝子産物が後期エンドソームにそれぞれ局在することがわかったのである。分泌系でも低分子量 GTP 結合タンパク質は、膜構造に特異的に分布している。したがって、rab5 および rab7 は、エンドソームでのプロセスの制御に直接、間接に関与している可能性が高い。実際、*in vitro* での初期エンドソームの融合が、GTP- γ -S によって、阻害されることが報告されており³⁾、これらは、エンドソーム膜のダイナミクスの制御に関与しているのかも知れない。

もう一つ、サイクリック AMP プロテインキナーゼ (タイプ II) が MDBK 細胞のエンドサイトーシス経路の膜構造に局在していることが報告された⁴⁾。このプロテインキナーゼは、核質膜、コーテッドピットその他に、初期エンドソーム、また特に後期エンドソームの一種と考えられるプレリソソーマルコンパートメント、およびトランスゴルジ網目構造 (TGN) に多く存在している。この局在が何を意味するのか今のところ不明である。しかし情報伝達系の受容体のエンドサイトーシス、リサイクリング等の動態、あるいは受容体機能の細胞内への伝達をタンパク質リン酸化を介して、制御するという役割が想定されている。

膜輸送に関わる因子が、そのリン酸化によって制御されていることは十分に有り得ることである。実際、上皮成長因子 (EGF) 受容体のリソソームへの輸送が、この受容体自身のもつチロシンキナーゼ活性に依存していることが報告されている⁵⁾。通常、エンドサイトーシス後リソソームへ向かうこの受容体が、人工的に変異を加え、そのチロシンキナーゼ活性をなくしてしまうと、核質膜にリサイクルしてしまうのである。このことから、リン酸化を受けることによって、リソソームへのタンパク質選別をつかさどっている、細胞質因子が存在するという仮説が提案されている。そのほかにも、アシアロ糖タンパク質のリソソーム輸送がプロテインキナーゼ阻害剤で阻害される例⁶⁾、IgA 多量体受容体の細胞内選別が受容体のリン酸化によって制御されている例などが知られている。また cdc2 キナーゼによって、*in vitro* の初期エンドソーム同士の融合が阻害される⁷⁾。この様にタンパク質リン酸化が、エンドソーム-リソソーム形路における物質の選別、膜の動態、およびその特異性の決定に深く関わっている可能性がある。

2) 微小管の関与

エンドソームやリソソームの運動は、微小管に依存していることが知られている。特に神経細胞の軸索輸送の研究から、これらの運動が、微小管と、これに沿って膜構造体を駆動するキネシンやダイニンのようなモータータンパク質によってなされていると考えられている。さきに初期エンドソームが細胞表層に、後期エンドソームはそれより深部に観察されることを述べた。微小管が、細胞核近傍から放射状に伸びている像がよくみられる。したがって微小管がエンドソームの運動の方向性を決めていること、またはエンドサイトーシス経路の膜構造の空間配置に関与し、それによって例えば、エンドソーム、リソソーム間の融合の

効率を増していることなどが容易に想像できる。膜構造の空間的な局在の程度は細胞のタイプによって異なっているが、事実、ノコダゾールのような微小管を破壊する薬剤で、エンドサイトーシスされた物質のリソソーム輸送が阻害される例が、少なくともいくつか知られている。

最近、Gruenberg ら⁸⁾ は、BHK-21 細胞で、形態的観察から、直径約 0.5 μ m の“大きな”球形のキャリアベシクルが、リソソームへ運ばれる物質を乗せて、初期エンドソームから後期エンドソームの橋渡しをしていることを示唆した。ノコダゾールで微小管を壊してやると、リソソームへの輸送は、このキャリアベシクルの段階で止まってしまう。この研究では *in vitro* のエンドソームの融合アッセイが同時に行われており、初期エンドソーム間では高い融合活性がみられたが、キャリアベシクル同志、あるいはキャリアベシクルと初期エンドソーム間での融合活性は低かった。融合能の変化のような初期・後期エンドソーム過程に、微小管が積極的に関与しているのかも知れない。他の因子による、リソソーム移行の制御と、微小管との関わりが興味深い。

4. エンドソームとリソソームの融合

ところで、ゴルジからのリソソーム酵素は、密度の重い、ほとんどの酸性加水分解酵素を含む典型的なリソソームに直接輸送されるのではなくて、後期エンドソームに輸送される。従って、いわゆる一次リソソームとの融合という場合は、トランスゴルジからの輸送小胞 (一次リソソーム) と、後期エンドソーム (プレリソソームと呼ばれるもの) との相互作用をさすことになるのかも知れない。はじめに述べた再構成系の実験によれば、エンドソームはどれもはじめから存在している典型的なリソソームと直接相互作用しているようである。この意味で古典的な一次リソソーム-エンドソームの融合と、リソソーム (典型的な) へのエンドサイトーシスされた物質の移行とは、別の段階をさすことになるのかも知れない。

さて、後期エンドソームとリソソームの融合はどの様にして起こるのだろうか。融合という言葉からイメージされるのは、後期エンドソームとリソソームが接して両者の膜が混ざり始め、ついで内容物が連絡し、ついには両者が一体になってしまうというスキームである。このような完全な融合が頻繁に起こっている時、後期エンドソームやリソソームは維持されうるのであろうか。リソソーム酵素を運ぶ受容体 (MPR) が、

後期エンドソームから、トランスゴルジへ向かう経路が知られている。このように、少なくとも、後期エンドソームからの輸送が、すべて雪崩式にリソソームへ向かっているわけではない。

生きたマクロファージや繊維芽細胞が、リソソームよりも大きなピノソームを形成したときの様子がビデオ付き顕微鏡で観察されている。リソソームと思われる小体は、まるでピノソームを繰り返し攻撃し、少しずつ小さな塊をかじりとっているように見える。この様子は、リソソームがピノソームと“一時的に”融合し、すぐにはなれ、その時、ピノソームの内容物を一部だけ取り去るのだろうと解釈されている(図2-2)。このような“一時的”で“可逆的な”融合が一般にエンドソームとリソソームの間に起こっているのかも知れない。こう考えれば、融合する際に、比較的選択的な膜の構成物や、内容物の移行が、エンドソーム、リソソームの間に起こることも可能になり、それぞれの組成が維持されていると理解することができる。しかし、一時的な融合や選択的移行がそもそも細胞内のどこかで実際に起こっているかということに明確な証明はない。

それとは異なるエンドソームとリソソームの融合のモデルもいくつか提唱されている。例えば、完全な融合が起こるが、その後すぐに、異なった組成の膜小体に分裂するというものである。また、後期エンドソームから、さらに小さな小体がでて、リソソームに融合しているのかも知れない(図2-4)。いずれが事実に近いとしても、そのようなことを可能にしているメカニズムは、非常に興味深いものといえよう。

図2. エンドソームとリソソームの関係のモデル⁹⁾

5. エンドソーム-リソソーム相互作用研究の方法

1) 膜系の形態的理解

エンドソーム-リソソーム過程の実態が理解しにくいのは、一つには生細胞で観察されている膜系の動態と、そこで観察されている膜の分類(例えば、免疫電顕、細胞化学、密度勾配遠心法による膜構造のタイピング)とを結び付けることが困難であることが理由となっている。膜系の生化学的なタイピングはいっそう進んで行くと考えられる。一方、高感度ビデオ装置付きの顕微鏡の使用により、エンドソームはこれまで考えられていたよりも、ずっと連続した網状の構造を持つ、非常に動的な構造であるらしいことがわかってきた¹⁰⁾。このような、生細胞で膜系の動態を観察する方法の進歩が、どの様に膜系の分類と結び付けられるかが、今後の理解の鍵となろう。それには生細胞観察に用いる新しいプローブ・ラベル法の開発が必要となるかも知れない。

2) 細胞内因子の同定

エンドソーム-リソソーム過程に関与している細胞内因子はほとんど同定されていない。はじめに述べた再構成系ができたおかげで、そうした因子の同定が可能となりつつある。ゴルジ層板間輸送などの *in vitro* 再構成系を用いて、例えば、ある種の阻害剤で輸送が停止する条件をつくっておき、その条件下で輸送を復活させる因子を、細胞質などからスクリーニング、単離するという手順は、すでに常套化している。エンドソーム、リソソーム相互作用も、いずれはそのようにして、細胞質因子が単離されるであろう。それには、再構成系のアッセイとして煩雑な密度勾配遠心法に代えて、より迅速、簡便な方法が必要となるかも知れない。また、今のところ、前期エンドソーム-後期エンドソーム過程に関連する再構成系は報告されていない。興味深い過程であるだけに、その報告が待たれる。

エンドソーム-リソソーム過程の細胞内因子の同定に有効と思われる変異株細胞はまだ樹立されていない。タンパク質分泌系での関与因子同定には、酵母の温度感受性分泌欠損株群に対する分子遺伝学的アプローチが重要な役割を果たしてきたことを考えると、このような変異株の樹立の意味は、きわめて大きいものがある。それにはエンドソーム-リソソーム経路の進行を生細胞で見積るアッセイ法、および、その結果に応じた細胞の分取法が必要となるだろう。こうした方向での研究も進められている¹¹⁾。

3) 膜系の動態の分子メカニズム

膜融合・膜分裂・細胞骨格と膜の相互作用等は、モデル膜を用いた生物物理学的研究の対象となっている。それらのメカニズムが解明されれば、それを基に、一

見複雑に見えるエンドソーム、リソソーム系の膜のダイナミクスが説明できる可能性がある。例えばエンベロープウイルスのスパイクタンパク質による膜融合のメカニズムの研究がすすんでおり¹²⁾、エンドソーム、リソソーム融合に関与する因子の機能の理解につながるかも知れない。

おわりに

「形質膜の陥入によって生じたエンドソームが一次リソソームと融合して二次リソソームを形成する。」と、古典的には単純に表現される内容について、現在のイメージを述べてきた。図3はそのようなイメージの一つを示したものである。エンドソームがどちらかといえば不定形であること、非常に動的な構造であること、その分類の不完全さなどが理由となって、エン

ドソーム過程のイメージには、まだまだ曖昧な点が残されている。一方では、エンドソームにおける選別、特異的な膜の相互作用が、一見ランダムに見えるような膜構造で秩序だて行われているのは、驚異的とも取れよう。その分子論的研究は始まったばかりであり、今後の成果が期待される。

文 献

- 1) Mullock, B. M., Branch, W. J., van Schaik, M., Gilbert, L. K., Luzio, J. P. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 2093-2099.
- 2) Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., Zerial, M. (1990) *Cell*, **62**, 317-329.
- 3) Mayorga, L. S., Diaz, R., Stahl, P. D. (1989) *Science*, **244**, 1475-1477.
- 4) Griffiths, G., Hollinshead, R., Hemmings, B. A., Nigg, E. A. (1990) *J. Cell Sci.*, **96**, 691-703.
- 5) Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A., Schlessinger, J. (1990) *J. Cell Biol.*, **110**, 1541-1548.
- 6) Ohashi, M., Ohnishi, S. (1991) *Exp. Cell Res.*, **197**, in press.
- 7) Tuomikoski, T., Felix, M.-A., Dree, M., Gruenberg, J. (1989) *Nature*, **342**, 942-945.
- 8) Gruenberg, J., Griffiths, G., Howell, K. E. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 1301-1316.
- 9) Holtzman, E. (1989) *Lysosomes*, Plenum Press, New York.
- 10) Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M., Miller, K. (1990) *Nature*, **346**, 335-339.
- 11) 大橋正人, 鍵和田聡, 村田昌之 (1991) 組織培養, **17**, 220-224.
- 12) Ohnishi, S. (1988) *Current topics in membranes and transport*, **32**, 257-296.

図 3.

おおし まさと

昭和61年京都大学理学部卒。現在同大学院博士課程在学中。趣味は、クラシックギター演奏。細胞内膜輸送でのタンパク質の選別、輸送の特異性にもっとも興味があります。

☎075-753-4216(直通)