細胞内の膜小胞形成に關与するタンパク質

京都大学理学部生物物理学教室 鍵 和 田 聡

intracellular vesicular transport/vesicle formation/coated vesicle/coat proteins/brefeldin A

真核生物では、外来の物質を細胞内に取り込む際や、小胞体で合成されたタンパク質を細胞内のオルガネラや細胞外へと選別する際に、小胞を利用した輸送が行われている。小胞輸送は、小胞の形成・目的のオルガネラや形質膜への移動・膜融合といった過程に分けられ、各過程を正確に遂行するために、それらを制御する仕組みが存在し、一連のタンパク質がこの働きを担っている。特に小胞の形成と膜融合は、膜構造の劇的な変化を伴うので、それらを制御する分子機構がどのようなものなのか、大変興味深い。これまでに、小胞の形成については、受容体媒介エンドサイトーシスにおける被覆小胞の形成や小胞体・ゴルジ体膜からのタンパク質輸送小胞の形成といった現象に關与するタンパク質群が次々と明らかになり、また、それらが互いによく似た構造を持っていることがわかってきた。そして、エンドサイトーシス・エキソサイトーシスという異なる経路での小胞形成に共通の分子機構が働いていることが予想されてきた。そこで本稿では、主として小胞の形成に關与するタンパク質についての現在の知見について紹介する。

受容体媒介エンドサイトーシスにおける被覆小胞の形成に關与するタンパク質

受容体媒介エンドサイトーシスは、さまざまな栄養物・ホルモン・成長因子を細胞内に特異的・効率的に取り込む機構である。受容体は、形質膜の被覆ピットという窪みに集合して濃縮され、被覆ピットの細胞内への陥入に伴い、効率的にすばやく取り込まれる。トランスフェリンや低密度リポタンパク質 (LDL) の受容

体は、恒常的に被覆ピットに集まっており、リガンド（この場合、トランスフェリンや LDL）と結合しなくてもとりこまれる。一方、上皮増殖因子 (EGF) に対する受容体は、EGF と結合してはじめて、被覆ピットに濃縮され取り込まれる。被覆ピットが陥入して生じる被覆小胞は、取り込み後すぐに被覆が取り除かれてエンドソームと呼ばれる小胞になり、エンドソーム内のリガンドはリソソームで分解されるなど、リガンドに応じた処理を施され、細胞内の機能を制御する。

生化学的研究により、まず、被覆小胞の被覆を形成するタンパク質が明らかになった^{1), 2)}。これらはクラトリンと呼ばれ、分子量18万の重鎖と分子量約3万の軽鎖とからなり、このクラトリン3分子が、C末端を中心とするように集合して3量体を形成し、その3量体が5角ないし6角形を基本単位とする編目構造を作り、小胞膜を覆う (図1)。このクラトリン被覆の内側の層にはアダプターと呼ばれるタンパク質群が存在し、受容体とクラトリンとの結合を仲介する役目をする。アダプターは、 α アダプチン、 β アダプチン、AP50、AP16というタンパク質から成る (表1)。アダプターも、クラトリンと同様に、特徴的な高次構造を形成する。一次構造から、 α アダプチンと β アダプチンはどちらも、N末端側のコア領域と、タンパク質分解酵素に対する感受性が高い中間領域 (プロリンと

図1. クラトリン3量体 (左) および、それが集合して形成する多角形構造 (右)。 (文献1) より、一部改)

Proteins involved in the intracellular vesicle formation

Satoshi KAGIWADA

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University

表1. クラトリン被覆小胞と非クラトリン被覆小胞を構成するタンパク質の比較. (カッコ内は推定分子量) 互いに関連すると考えられているものは、同じ行に配置した.

局在:	クラトリン被覆小胞		非クラトリン被覆小胞
	形質膜	TGN	ゴルジ体
	クラトリン重鎖 (180kd)		α -COP (160kd)
	クラトリン軽鎖 (30kd)		
	β アダプチン (110kd) , β' アダプチン (115kd)		β -COP (110kd)
	α アダプチン (110kd) , γ アダプチン (104kd)		γ -COP (98kd)
	AP50 (50kd) , AP47 (47kd)		δ -COP (61kd)
	AP16 (16kd) , AP19 (19kd)		

グリシンに富む), およびC末端領域に分けられる. そして, α アダプチンと β アダプチンが会合し, 結果として, 両タンパク質のN末端側のコアからC末端側の“耳”が突き出た構造をとることが, 凍結エッチング電子顕微鏡写真から推測されている(図2). このアダプター複合体が, クラトリンと結合するわけだが, 4種のアダプターのうち, いまのところ, β アダプチンが*in vitro*でクラトリンと結合できることが知られている. AP50とAP16は, コア部分に存在すると予想されているが, 具体的にどの領域と結合しているかはわかっていない.

クラトリン・アダプターなどの, 被覆を構成する成分は, 実際に小胞の形成にどう関与するのだろうか. *in vitro*では, クラトリンだけでも自己集合して, 中身の無い小胞を形成できるが, アダプターが共存すると, より, コンパクトで均一の小胞を形成する. また, クラトリンに対するアダプターの量比を増加させると(最大1対1)小胞の直径は小さくなる($\sim 80\text{nm}$)傾向にある. このことから, アダプターは, 隣合うクラトリン3量体をより近接させて密な構造を作り上げ, 小胞の形成を助ける役割をすると考えられる.

Linらは, 被覆小胞の形成と分離(出芽)に必要な因子を探るために, この過程を*in vitro*で再構成した³⁾. これは, ポリリジンでコートしたカバーガラス

にヒト繊維芽細胞を張り付け, 超音波破碎して細胞質や細胞内の膜成分を取り除き, 形質膜だけをカバーガラス上に残すことにより, 細胞質への形質膜の陥入の様子を, 電子顕微鏡や蛍光顕微鏡で観察したものである. この結果, 37度でインキュベーションするだけで, 被覆ピットの陥入・被覆小胞の形成が観察されたが, 小胞の出芽にはATP (1 mM)・ Ca^{2+} (150 μM)・細胞質タンパク質が必要であることがわかった. これらの因子とクラトリンやアダプターとが, どの段階で相互作用し, 小胞の形成・出芽を完了させるのかははっきりしない. しかし, このような再構成系を使い, 小胞形成の際の, クラトリン・アダプター, もしくは他のタンパク質の役割がより一層明らかになると期待される.

ところで, アダプターはどのようにして形質膜上に存在する多種類の膜タンパク質から, エンドサイトーシスすべき, 受容体を認識するのだろうか. アダプターによる受容体の認識には, 受容体の細胞質領域が関与しているのは当然だが, なかでも, エンドサイトーシスされる受容体の細胞質領域にはチロシンが保存的に存在し, これがエンドサイトーシスのためのシグナルになるといわれている⁴⁾. ただし, チロシンのリン酸化が, 認識を制御するわけではなく, 受容体の細胞質部分の立体構造が認識に関係し, この立体構造の維持にチロシンが関与しているらしい.

トランスゴルジネットワークにおける被覆小胞の形成に関するタンパク質

クラトリン被覆小胞は, ゴルジ体のトランス領域にある一連の膜構造体(トランスゴルジネットワーク: 以下TGN)にも存在する^{1), 2)}. この小胞は, 小胞体で合成されたリソソーム酵素をゴルジ体を経由して, リソソームへと運ぶ. この被覆を構成するタンパク質で, クラトリン以外のものもアダプターと呼ばれ, 上

図2. アダプタータンパク質 AP-2 (左) および AP-1 (右) の模式図. (文献1より, 一部改)

述したアダプタータンパク質とは区別されている。

(形質膜におけるものを、AP-2またはHA-2, TGNにおけるものを、AP-1またはHA-1という。) AP-1アダプターは、 β' アダプチン、 γ アダプチン、AP47, AP19と呼ばれるタンパク質からなり、それぞれが、AP-2での β アダプチン、 α アダプチン、AP50, AP16に対応すると考えられている(表1)。実際に、モノクローナル抗体の交差性やペプチドマッピングにより β' は β アダプチンと相同性の高い構造をとり、 β アダプチンと同様にクラトリンとの結合に関与するとされている。また、 γ アダプチンは、N末端側に α アダプチンとよく似たアミノ酸配列を持ち、 $\alpha \cdot \beta$ アダプチンと同様にプロリンとグリシンに富む領域も存在する。こうしたことから、具体的な証拠はないが、AP-1アダプターも、AP-2のような高次構造をとると予想される(図2)。そして、 β' アダプチンもまた、クラトリンとの結合に関与していると考えられる。AP-1アダプターについては、*in vitro*での再構成系は報告されてなく、このため、小胞形成の機構については、まったくわかっていない。しかし、どちらの小胞も、細胞質外から細胞質内への膜の陥入という現象から形成され、そこに関与するタンパク質の組成も似ているので、共通の機構が働いていると考えてもよさそうである。

これらの互いに類似したタンパク質が、異なる経路(エンドサイトーシス経路とTGNからリソソームへ向かう経路)の小胞形成に関与している。一方の経路を他方と区別しているのは何なのだろうか。両種のアダプターともに、細胞質内に存在するなら、どんなシグナルが働いて、例えば、 α アダプチンを形質膜へ、 γ アダプチンをTGNへと向かわせるのだろうか。この問いに対する答えを示唆する知見が、両方の経路に共通して存在するマンノース-6-リン酸(M6P)受容体を使って、得られた。M6P受容体は、リソソームの可溶性酵素が持つM6Pを認識し、これらの酵素をリソソームに運ぶ。この受容体は、形質膜にもTGNにも存在するので、AP-1とAP-2の両種のアダプターに認識されるはずである。そこで、Glickmanらは、M6Pの細胞質領域を結合させたアフィニティーカラムを作り、この細胞質領域に対するAP-1とAP-2の結合能を調べた⁵⁾。通常の条件では、両種のアダプターとも、カラムに結合、すなわち、M6P受容体の細胞質領域を認識した。その後、あらかじめアダプターを結合させたカラムに、M6P受容体の細胞質領域を流し、競争阻害実験を行うと、両種のアダプター

とも溶出されてきた。ところが、細胞質領域に存在する二つのチロシンをアラニンとバリンに置換した変異タンパク質を使って、同様の競争阻害実験を行うと、AP-1だけが溶出してきた。つまり、M6P受容体の細胞質領域を置換してもAP-1はこれに結合できるのである。このことから、AP-1による受容体の認識には、受容体の細胞質領域のチロシンは必要でなく、一方、AP-2による認識には、チロシンが必要であることが示された。上述したように、チロシンだけが認識に必要なだけでなく、細胞質領域全体の構造が関係するのだろう。異なる経路での小胞形成を司るタンパク質が、同じ受容体を、異なる機構で認識するといえる。

アシアロ糖タンパク質の受容体を使った研究により、 β アダプチンがこの受容体を認識するという結果が得られた。 β と β' アダプチンの構造が類似していることを考えると、 β' も受容体を認識するのだろう。AP-1とAP-2による受容体の認識機構が異なるのに、それを行うタンパク質の構造がきわめて似ているというのは意外である。今後、M6P以外の受容体のどの部分が、アダプターによる認識に必要なのかを解析できれば、よりはっきりとした認識機構が明らかになるに違いない。

非クラトリン被覆小胞の形成に関するタンパク質

ゴルジ体の各偏平囊間・小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を担う小胞にも被覆が存在する。(この被覆にはクラトリンが含まれないので、非クラトリン被覆小胞ともいう。)これまで述べたクラトリン被覆小胞が、特定のタンパク質を特定の場所へ輸送するという選別輸送を担っているのに対し、この非クラトリン被覆小胞は、分泌タンパク質を無差別に輸送する。非クラトリン被覆小胞を単離し分析した結果、被覆を構成するタンパク質群が明らかになった。これらは、アダプターに対し、コートマー(coatmer)と呼ばれ、分子量の順に、 α -, β -, γ -, δ -, COPと名付けられた⁶⁾(表1)。 α -COPは分子量からクラトリンに対応する働きをすると考えられているが、クラトリンのような構造体を作るかどうかは不明である。他のタンパク質も同等の分子量を持つアダプタータンパク質に対応する働きをすると考えられるが(表1)、 β -COPと β アダプチンとが一次構造に相同性があることがわかっている以外、予測の域を出ていない。また、非クラトリン被覆小胞には、コートマーのほかに3量体型Gタンパク質G_sの α サブユニットをADPリボ

シル化する因子が含まれることは興味深い。なぜなら、ここでは詳しく触れないが、3量体型Gタンパク質がTGNからの分泌顆粒の形成に、低分子量GTP結合タンパク質⁷⁾が細胞内の膜タンパク質輸送のさまざまな過程に、関与しているからである。

以上述べたように、3つの異なる経路の輸送を司る小胞に、それぞれ異なる種類の被覆が存在する(図3)。これらの被覆を構成するタンパク質は、クラトリンのように自己集合して膜の曲率を増大させ、小胞がくびれるのを助けるほかに、ある経路と他の経路とを区別するためのシグナルとして働き、経路間の混線を防ぐ役割をするとも考えられる。ただし、例えば、エンドソームに取り込まれた物質の形質膜への復帰や、上皮細胞での免疫グロブリンAなどのトランスサイトosisのような経路に位置する小胞には被覆がない(発見されていないだけかもしれないが)ので、被覆だけが、そのようなシグナルとして機能するわけではないだろう。

また、被覆のもう一つの役割として、小胞のランダムな融合を防ぐとも考えられる。いったん出芽した小胞は、目的地に運ばれるまで、他の膜と融合してはならない。小胞は、被覆に覆われることにより、輸送中に他の膜と必要以上(膜同士が融合してしまうほど)に接近することが避けられる。そして、目的地に到着してはじめて被覆が取り除かれ、膜融合が可能な状態になるのではないだろうか。実際、*in vitro*では、クラトリン被覆小胞とリソソームとの融合や非クラトリン被覆小胞とゴルジ体膜との融合には、被覆が取り除かれることが必要だとされている。

図3. 異なる経路に位置する小胞には、異なる被覆が存在することを表した概念図。

ブレフェルジンAによる小胞の形成の阻害

β -COPの分解産物を、高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、微小管とゴルジ体の両方に結合するタンパク質として発見された110kdタンパク質と同一のものであることがわかった。この110kdタンパク質は、タンパク質分泌阻害剤のブレフェルジンAなどの糸状菌が生産する抗生物質、(*Penicillium brefeldianum* 分子量280)の標的となるタンパク質である。ブレフェルジンA(以下、BFA)は細胞内小胞輸送に大きな変化を及ぼすので、急速に注目を集めている物質である^{8),9)}。

BFAを培養細胞に加えると、糖タンパク質の輸送が阻害されるだけでなく、ゴルジ体も消失し、ゴルジ体に局在するはずの糖鎖付加酵素が小胞体に移動してしまう。さらに、ゴルジ体からチューブ状の膜が微小管に沿って小胞体へと延びる様子も観察され、ゴルジ体から小胞体へのタンパク質の輸送の存在が示唆された。ただし、BFAが、積極的にゴルジ体から小胞体への膜輸送を促進したのではなく、ゴルジ体からの、本来の分泌方向に沿った膜輸送がBFAによって阻害され、その結果、ゴルジ体から小胞体への逆向きの輸送が優勢になったのだと解釈された。つまり、ゴルジ体は、通常、形質膜やリソソームへと向かう膜輸送と小胞体へと向かう膜輸送との平衡状態にあり、このバランスがBFAによって崩され、みかけ上、消失してしまったのである。先ほど述べた110kdタンパク質の局在場所が、BFA存在下で、ゴルジ体から細胞質へと変化的ことから、この110kdタンパク質がBFAの標的であることがわかった。*in vitro*でも、 β -COP(=110kdタンパク質)は、BFA存在下ではゴルジ体に結合できず、このとき、ゴルジ体からの被覆小胞の形成も見られなかった。すなわち、BFAは β -COPに作用し、 β -COPや他のコートマータンパク質による、ゴルジ体や小胞体からの非クラトリン被覆小胞の形成を阻害し、ゴルジ体からの小胞輸送を停止させたと考えられた。

最近、BFAの作用部位がゴルジ体からの小胞の形成だけではなく、BFA存在下では、エンドソームなどのエンドサイトーシス経路に位置する膜とTGNとが融合し、チューブ状の膜からなる複雑なネットワークが構築されることが発見された。ここで観察されたチューブ状の膜や、先に述べた、ゴルジ体から小胞体へと向かうチューブ状の膜が、細胞の正常な機能を反映したものかどうかについては、次のように意見が分

かれる。

まず、BFA は、 β -COP のような被覆タンパク質に作用し、輸送小胞の形成を不完全なままにした結果、部分的な膜のくびれは形成されるが、そこから小胞が出芽することではなく、チューブ状の膜が延びてくるとい説がある⁸⁾。したがって、BFA 存在下で形成されるチューブ状の膜は、被覆が外れたことからくる異常な産物だとするのである。これに対して、細胞内のタンパク質輸送が、必ずしも、小胞によるわけではないという説がある¹⁰⁾。チューブ状の膜は、細胞が通常タンパク質輸送のために利用しているものであり、BFA によって、その存在が強調されたために、観察できるようになったに過ぎないという考え方である。

BFA の効果は、これまで、ほとんどの場合、培養細胞を用いて、蛍光顕微鏡により観察された。これは、BFA による膜構造の変化が大きいため、*in vitro*での生化学的研究には向かないためである。したがって、BFA の効果を分子レベルで論じる段階ではない。BFA の標的となるタンパク質が、 β -COP 以外にも発見されてくれば、細胞内の小胞形成や小胞輸送全体についての理解も深まるだろう。

おわりに

細胞内の膜形成について、主として小胞の被覆を形

成するタンパク質について述べてきた。もちろん、このほかのタンパク質や、細胞骨格との相互作用も小胞の形成に重要な働きをしているだろう。また、小胞輸送における他の過程(膜融合など)とも密接に関連し、全体として、小胞輸送が滞りなく行われるよう制御されているのだろう。これらを制御する機構についてはほとんどわかっていないので、今後の研究による成果が期待される。

文 献

- 1) Pearse, B. M. F., Robinson, M. S. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 151-171.
- 2) Keen, J. H. (1990) *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 415-438.
- 3) Lin, H. C., Moore, M. S., Sanan, D. A., Anderson, R. G. W. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 881-891.
- 4) Trowbridge, I. S. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **3**, 634-641.
- 5) Glickman, J. N., Conibear, E., Pearse, B. M. F. (1989) *EMBO J.*, **8**, 1041-1047.
- 6) Duden, R., Allan, V., Kreis, T. (1991) *Trends Cell Biol.*, **1**, 14-19.
- 7) Balch, W. E. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 473-477.
- 8) Pelham, H. R. B. (1991) *Cell*, **67**, 449-451.
- 9) Klausner, R. D., Donaldson, J. D., Lippincott-Schwartz, J. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 1071-1080.
- 10) Mellman, I., Simons, K. (1992) *Cell*, **68**, 829-840.

かぎわだ さとし

略歴 1988年京都大学理学部卒業。現在、同大学院生物物理学専攻、博士課程在学中。

細胞内での小胞輸送を、特に膜融合に注目して研究しています。

連絡先 〒606 京都市左京区北白川追分町

京都大学理学部生物物理学教室

☎075-753-4216 (直通)