細胞内小胞輸送を司る N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) の構造と機能

東京薬科大学生命科学部 多賀谷 光 男

N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) is originally characterized as a factor involved in intra-Golgi protein transport reconstituted in a cell-free system. Later studies show that NSF is an ATPase and generally used as machinery for vesicle-mediated intracellular protein transport. This review summarizes the structure and function of NSF.

Vesicular transport/ATPase/*N*-ethylmaleimide/Golgi

はじめに

インシュリンやアルブミンのような分泌タンパク質は、細胞の中で合成された後に血中へと放出される。1950年代後半から1960年代前半にかけて、Palade ら¹⁾は [³H] アミノ酸ですい臓の切片を標識し、電子顕微鏡を用いて放射能の行方を追いかけることによって分泌タンパク質の細胞内輸送経路を明らかにした。彼らは、放射標識された分泌タンパク質が小胞体からゴルジ体を経て分泌小胞に移行し、最終的に細胞外へと分泌されることを見いだした (図1)。そして、それらのタンパク質輸送は小胞によって媒介されていることから「細胞内小胞輸送」という概念が生まれた。Palade らの研究によって小胞輸送の経路は明らかとなったが、小胞がどのように生成し、どのように融合するのかという、小胞輸送の機構は1980年代に至るまでは全くと言っていいほど解明されなかった。小胞輸送の研究の難しさは、小胞輸送が小胞の生成、目的オルガネラ膜へのターゲティング、小胞の融合といったいくつもの反応から成り (図2)、さらに個々の反応にいくつものタンパク質が関与しているという点にある。1980年前半に小胞輸送研究における2つのブレークスルーが起こった。1980年にカリフォルニア大学の Schekman ら²⁾は、酵母の分泌経路に変異のある温度感受性変異株 (*sec* 変異株) を単離し、遺伝学的

手法によって輸送に関与するタンパク質の同定への道を開いた。一方、スタンフォード大学の Rothman ら³⁾は1984年に単離したゴルジ体を用いて、ゴルジ体のシス層から中間層への小胞輸送を再構成し、生化学的手法によって輸送に関与するタンパク質の精製への道を開いた。そして、1989年に Rothman グループ⁴⁾がゴル

図1 分泌タンパク質の細胞内輸送経路。分泌系タンパク質は、まず小胞体からゴルジ体のシス層へ輸送される。小胞体でコア-グリコシル化された糖タンパク質は、ゴルジ体の層板間を輸送される間にプロセッシングを受ける。タンパク質はトランス-ゴルジネットワークでソーティングを受け、インシュリンなどは分泌顆粒へ、カテプシンなどはリソソームへ輸送される。

The structure and function of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) involved in vesicle-mediated intracellular protein transport.

Mitsuo TAGAYA

School of Life Sciences, Tokyo College of Pharmacy

図2 小胞輸送のスキーム。Rothmanらのモデルを一部改変。

ゴルジ体内輸送に関与する *N*-エチルマレイミド感受性因子 (NSF: *N*-ethylmaleimide-sensitive factor) が Sec18 タンパク質に相当することを見いだして、この2つのアプローチに初めて接点が見いだされた。

NSFの発見

Rothman らによって再構成されたゴルジ体内タンパク質輸送の再構成系を図3に示した。このアッセイ系は、糖タンパク質がゴルジ体内の層板を輸送されて行く時に、糖鎖がプロセッシングされることを用いている。輸送反応は2種類の機能の異なる単離ゴルジ膜の間で行われる。ドナーと呼ばれるゴルジ膜は水疱性口内炎ウイルス (VSV) を感染させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) の15Bクローン細胞より調製し、アクセプターは野性型 CHO 細胞より調製する。前者のクローンはゴルジ体の中間層に存在する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I を欠損しており、VSV のコードする唯一の糖タンパク質 (VSV-G タンパク質) は *N*-アセチルグルコサミンの転移を受けずに細胞膜へと輸送される。もし、ドナー膜のシス層に存在する VSV-G タンパク質がアクセプターの中間層へ飛び移ったとすると、アクセプター膜に存在する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I によって、UDP-*N*-アセチルグルコサミンから *N*-アセチルグルコサミンが転移される。それゆえ、UDP-*N*-[³H] アセチルグルコサミンを加えておけば、輸送されたタンパク質量を、VSV-G タンパク質を免疫沈降させてから沈殿中の [³H] 量を測定することによって定量することができる。ここで、ドナー膜の調製に15B細胞を使うのがトリックで、野性型細胞からドナー膜を調製すると、

図3 無細胞系を用いたゴルジ体内小胞輸送アッセイの原理³⁾。ドナーのシス層の VSV-G タンパク質がアクセプターの中間層へ輸送されると *N*-アセチルグルコサミンが転移される。ドナーのシス層から中間層へも輸送はおこるが、ドナーの中間層には *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I が存在しないため、*N*-アセチルグルコサミンの転移はおこらず、この輸送は測定されない。図で、□は *N*-アセチルグルコサミン、○はマンノース、■は [³H] *N*-アセチルグルコサミンを示す。

ドナーの中間層に存在する VSV-G も [³H] で標識されてしまうので、VSV-G タンパク質の輸送量を求めることができなくなってしまう。この輸送系はゴルジ膜画分以外に細胞質画分 (CHO 細胞ホモジネートの10万 X g 上清) と ATP を必要とする。

ドナーとアクセプターのゴルジ膜を氷上で 1 mM *N*-エチルマレイミド (NEM) で15分間インキュベートし、過剰量の NEM をジチオスレイトールで不活性化させてから、細胞質画分と ATP を加えても輸送反応はほとんどおこらない。このことは、輸送に関与する成分が NEM に感受性であることを示している。この NEM 処理ゴルジを用いたアッセイ液に、VSV を感染させていない CHO 15B 細胞から調製したゴルジ膜を加えると輸送活性は回復する⁵⁾。この膜は、VSV を感染させていないのでドナーとは成りえないし、また、CHO 15B 細胞由来であるからアクセプターとも成りえない。Rothman と Glick⁵⁾ は、この現象を膜表面性の NEM に感受性な因子が VSV 非感染 CHO15B 細胞のゴルジ膜から遊離し、失活した因子と置き代わったためと考え、その因子を NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor) と名付けた。そして、NSF の膜からの遊離には Mg-ATP が必要であることを見いだした⁵⁾。この NEM 処理ゴルジの輸送活性を回復させる活性を指標にして、NSF は CHO 細胞のホモジネート (Mg-ATP 存在下に調製) の可溶性画分より1,000倍に精製された⁶⁾。精製された NSF は4量体構造をとっており、そのサブユニット分子量は76,000であった。NSF は不安定で、精製中にすみやかに失活するが、この失活は ATP で抑ええられる (この安定化のためには Mg は必要ではない)。

NSF の関与する小胞輸送経路

NSF はゴルジ体内小胞輸送に関与する因子として同定されたが、他の輸送再構成系を用いて、小胞体からゴルジ体への輸送⁷⁾、さらにエンドソームの融合⁸⁾にも必要であることが示された。また、最近我々は、NSF が神経伝達物質の開口分泌を司るシナプス小胞にも存在することを見いだした⁹⁾。NSF の膜への結合には、膜表在性の SNAP (soluble NSF attachment protein)¹⁰⁾ と膜内在性の SNAP レセプター¹¹⁾ を必要とするが、最近 Rothman グループ¹²⁾ は、脳の SNAP レセプターのひとつがシナプス小胞に存在するシナプトプレビンであることを明らかにした。この結果は我々の結果と合致しており、NSF が開口分泌に関与することは間違いないと思われる。NSF はおそらく全ての細胞内小胞輸送経路にたずさわっていると考えられる。酵母においても NSF の相同タンパク質である Sec18 タンパク質が、小胞体からゴルジ体¹³⁾、ゴルジ体内¹⁴⁾、ゴルジ体から細胞膜¹⁴⁾ への輸送に関与することが示されている。

NSF の ATPase 活性

NSF を CHO 細胞より精製した時には、ATPase 活性は検出されなかったが、大腸菌で発現された CHO NSF の精製中に、NSF が微弱な ATPase 活性を持つことが明らかとなった¹⁵⁾。この ATPase 活性は温和な NEM 処理によって失活し、抗 NSF モノクローン抗体 (2C5) によって 2-2.5 倍程度活性化されることから、他の ATPase のコンタミによるものではない。ATP に対する見かけの K_m 値は 0.65 mM で、 V_{max} 値は $4.0 \mu \text{ mol/h} \cdot \text{mg}$ である。この ATPase 活性は、活性測定溶液中のタンパク質濃度が $10 \mu \text{ g/ml}$ 以下では失活してしまう。低濃度では、抗体 2C5 による ATPase 活性の活性化の度合いが増大することから、4 量体の NSF が低濃度では単量体に解離してしまい、抗体 2C5 はそれを抑えるのではないかと考えているが、まだこの点は明らかになっていない。CHO NSF 精製時には精製量が少なかったために ATPase 活性が検出できなかったものと思われる。タンパク質輸送活性測定時における NSF の濃度は $0.2 \mu \text{ g/ml}$ 程度であるが、この場合には NSF は SNAP を介して膜に結合しているため、4 量体構造が安定化されていると考えられる。

小胞輸送における NSF の役割

ゴルジ膜に ATP と細胞質画分を加えると、生成す

る小胞はほとんどがコートタンパク質で覆われている。しかし、NEM 処理ゴルジの場合はほとんどが脱コート化した小胞となっている¹⁶⁾。図 2 に示すように、小胞はターゲット膜に結合してから脱コート化すると考えられるので、Rothman ら¹⁶⁾ は、NSF は脱コート化以後の段階、おそらく小胞の融合段階に関与し、NSF が失活すると融合段階がブロックされて脱コート化小胞が蓄積すると考えた。GTP γ S は低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである ARF (ADP-ribosylation factor) に結合して脱コート化を阻害するが¹⁷⁾、NEM 処理ゴルジに GTP γ S を加えて小胞を生成させると、小胞はコートタンパク質に覆われていた¹⁸⁾。この結果は、NSF が関与する段階は、脱コート化以後であるという考えと合致する。また、ゴルジ体内タンパク質輸送のアクセイのキネティックの結果もこの考え方を支持する¹⁶⁾。一方、Rexach と Schekman¹³⁾ は、酵母の小胞体からゴルジ体への輸送のアクセイ系において、Sec18 タンパク質を NEM 処理すると輸送小胞がゴルジ膜へ結合できないことを見だし、Sec18 タンパク質はターゲッティングに関与していることを提唱している。もし小胞が脱コート化してからターゲッティングが起こるのなら、NSF の役割をターゲッティングとしても Rothman らの結果と矛盾しないが、Sec18 タンパク質を NEM 処理した時にゴルジ膜に結合できなくなった小胞が脱コート化しているかどうかはわかっていない。膜融合機構のモデルとして、タンパク質が、その疎水領域を通じて近接する 2 つの脂質二層膜間を連結し、2 つの膜の外側の層が拡散して結合することで融合が引き起こされるという考え方があるが、Rothman と Orci¹⁹⁾ は NSF 複合体 (NSF, SNAP, SNAP レセプター) がそのような役割をしている可能性を考えている。もしそうだとすると、NSF は小胞とターゲット膜を連結することがその役割であり、Rexach と Schekman の結果と矛盾しない。

NSF の構造

図 4 に CHO 細胞の NSF のドメイン構造を示した。NSF のアミノ末端はブロックされているため、推定された開始コドンで 1 番目の残基としている。NSF は 744 残基のアミノ酸から成り (分子量は 83,000)、2 箇所の相同な領域 (24% のアミノ酸が同一) を持っている。2 つの領域には、 F_1 -ATPase や *ras* p21 タンパク質などに見られる、Gly-X-X-X-Gly-Lys-Thr というヌクレオチド結合のためのコンセンサス配列が存在していることから、これらの領域はヌクレオチド結

図4 NSFのドメイン構造。下線を引いたアミノ酸は、ヌクレオチド結合配列中の保存されたアミノ酸を示す。ATP I のコンセンサス配列中にシステイン残基が存在する。

合活性を持っていると考えられている。第1のコンセンサス配列中にはシステイン残基が存在している。酵母の Sec18 タンパク質はコンセンサス配列中にはシステイン残基がなく²⁰⁾、また NEM に対する感受性が低い⁴⁾ことから、この残基が NEM の結合部位である可能性が高い。NSF をトリプシンで限定分解すると、低濃度のトリプシン処理では 60kDa の断片が生成し、高濃度のトリプシン処理では、60kDa 由来の 31kDa の断片が認められる¹⁵⁾。限定分解された NSF はタンパク質輸送活性も ATPase 活性も持たない。60kDa 断片は Gln-206、31kDa 断片は Gly-478 から始まっており、切断領域はアミノ末端領域と 2 つのヌクレオチド結合領域の境界部分である。分子量から考えると、60kDa と 31kDa 断片のカルボキシル末端は NSF のカルボキシル末端と同じか、または非常に近く、NSF の 2 つのヌクレオチド領域はドメイン構造をとっていると考

表1 NSFの各ドメインの相同性

ドメイン	CHO	ヒト脳	酵母
アミノ末端	100%	92%	32%
第1のATP結合領域	100%	99%	64%
第2のATP結合領域	100%	99%	42%
全領域	100%	97%	48%

えられる。

表1にCHO細胞⁴⁾、ヒト脳(洪と多賀谷、未発表)、酵母の NSF²⁰⁾の相同性と各ドメイン間の相同性を示した。驚くべきことに、CHOとヒトNSFでは全体で97%のアミノ酸が同一であり、2つのヌクレオチド結合領域では、第1の領域で2残基、第2の領域で1残基しか異なっていなかった。この2つの領域の役割を調べるために、CHO NSF のコンセンサス配列中のリジン残基に部位特異的変異導入によって変異を導入したところ、第1のヌクレオチド結合領域の変異タンパク質は全く輸送活性を示さず、第2のヌクレオチド結合領域の変異タンパク質は野性型の1-2%の活性を示すことがわかった(住田と多賀谷、未発表)。このことは、2つのヌクレオチド結合領域がタンパク質の輸送活性に重要であることを示している。これらの変異タンパク質が ATPase 活性を持つかどうかについては現在解析を進めている。

NSF 類似タンパク質

NSF のヌクレオチド結合領域にホモロジーのあるタンパク質がいくつか発見されている(表2)。これ

表2 NSF 類似タンパク質

起源	タンパク質	局在	機能	ATPase 活性 検出の有無
CHO 細胞	NSF	ゴルジ膜、シナプス小胞	小胞輸送	有
アフリカツメガエル 卵母細胞	VCP (p97)	核と細胞質	CDC48 のホモログ	有
ヒト Jurkat T-細胞	Tat	主に核	HIV 遺伝子発現の調節	無
HeLa 細胞	MSS1	不明	cdc28/cdc2 類似キナーゼを欠損した酵母の低温感受性を相補	無
酵母	SEC18	不明	NSF のホモログ	無
酵母	CDC48	ミクロームまたは 高分子量タンパク質複合体	細胞分裂	無
酵母	PAS1	不明	ペルオキシソームの形成	無
酵母	BCS1	ミトコンドリア膜画分	シトクロム bc ₁ の機能発現	無
酵母	YME1	ミトコンドリア	ミトコンドリア DNA の 核への移行	無
酵母	SUG1	不明	GAL4 と相互作用し、転写調節	無
大腸菌	FTSH	内膜	PBP3 の輸送	無

らのタンパク質のヌクレオチド結合領域間では30-45%のアミノ酸が同一であるが、その機能や局在性は多種多様であり、なんの共通性もないように思われる。酵母においては、Cdc48タンパク質（アフリカツメガエル卵母細胞ではVCP）は細胞分裂に、Pas1タンパク質はペルオキシソームの形成に、Bcs1タンパク質はミトコンドリアのシトクロム bc₁ 複合体の機能発現に、Yme1はミトコンドリアから核へのDNAの移行に、Sug1タンパク質（哺乳類では、HIVの遺伝子発現に関与するTat-結合タンパク質）はGal4タンパク質と相互作用して転写調節に関与している。大腸菌のFtsH（Fts: filamentation temperature sensitive）の変異は細胞分裂をおこさせなくするが、このタンパク質はペニシリン結合タンパク質3の輸送に関与していると考えられている。今のところ、これほど機能の異なったタンパク質間になぜこのように高い相同性が見られるのかは全くわかっていない。ATPase活性が検出されているのはp97とNSFだけであるが、おそらく他のタンパク質もATPase活性を持っていると予想される。

終わりに

最近の研究によって、NSFの構造と機能について多くのことが明らかとなってきた。しかしながら、ATPの加水分解と共役してNSFがどんな反応を触媒し、小胞のドッキングまたは融合を媒介しているのかは全くわかっていない。この点が今後に残された大きな課題と言えよう。ここで紹介した研究の一部は、日産科学振興財団、武田科学振興財団によって援助されており、この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Palade, G. E. (1975) *Science*, **189**, 347-358
- 2) Novik, P., Field, C., Schekman, R. (1980) *Cell*, **21**, 205-

215

- 3) Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A., Rothman, J. E. (1984) *Cell*, **39**, 405-416
- 4) Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W.-J., Henzel, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., Rothman, J. E. (1989) *Nature*, **339**, 355-359
- 5) Glick, B. S., Rothman, J. E. (1987) *Nature*, **326**, 309-312
- 6) Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., Rothman, J. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 7852-7856
- 7) Beckers, C. J. M., Block, M. R., Glick, B. S., Rothman, J. E., Balch, W. E. (1989) *Nature*, **339**, 397-398
- 8) Diaz, R., Mayorga, L. S., Weidman, P. J., Rothman, J. E., Stahl, P. D. (1989) *Nature*, **339**, 398-400
- 9) Tagaya, M., Moriyama, Y., Yamamoto, A., Tashiro, Y. (1993) *J. Cell. Biochem.*, **17C**, 28
- 10) Clary, D. O., Griff, I. C., Rothman, J. E. (1990) *Cell*, **61**, 709-721
- 11) Weidman, P. J., Melançon, P., Block, M. R., Rothman, J. E. (1989) *J. Cell Biol.*, **108**, 1589-1596
- 12) Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J. E. (1993) *Nature*, **362**, 318-324
- 13) Rexach, M. F., Schekman, R. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 219-229
- 14) Graham, T. R., Emr, S. D. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 207-218
- 15) Tagaya, M., Wilson, D. W., Brunner, M., Arango, N., Rothman, J. E. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 2662-2666
- 16) Malhotra, V., Orci, L., Glick, B. S., Block, M. R., Rothman, J. E. (1988) *Cell*, **54**, 221-227
- 17) Taylor, T. C., Kahn, R. A., Melançon, P. (1992) *Cell*, **70**, 69-79
- 18) Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., Rothman, J. E. (1989) *Cell*, **56**, 357-368
- 19) Rothman, J. E., Orci, L. (1992) *Nature*, **355**, 409-415
- 20) Eakle, K. A., Bernstein, M., Emr, S. D. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4098-4109

たがや みつお

昭和55年大阪大学理学部化学科卒業。昭和60年大阪大学理学研究科博士課程修了（生物化学）後、大阪大学産業科学研究所食品化学講座において教務職員助手を経て、現在東京薬科大学生命科学部助教授。平成元年より3年まで、米国プリンストン大学 Rothman 教授の下へ留学。趣味はテニス。