

- 1) Baes, M. & Van Veldhoven, P.P. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10. 1016/j. bbadis. 2012. 03. 003
- 2) Morita, M. & Imanaka, T. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10. 1016/j. bbadis. 2012. 02. 009
- 3) van der Klei, I.J., Yurimoto, H., Sakai, Y., & Veenhuis, M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1453–1462.
- 4) Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J., & Kiel, J.A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1767–1775.
- 5) Kawaguchi, K., Yurimoto, H., Oku, M., & Sakai, Y. (2011) *PLoS ONE*, 6, e25257.
- 6) Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quinones, W., Cáceres, A.J., Bringaud, F., Concepción, J.L., & Michels, P.A. (2012) *Int. J. Parasitol.*, 42, 1–20.
- 7) Misset, O., Bos, O.J., & Opperdoes, F.R. (1986) *Eur. J. Biochem.*, 157, 441–453.
- 8) Herman, M., Pérez-Morga, D., Schtickzelle, N., & Michels, P. A. (2008) *Autophagy*, 4, 294–308.
- 9) Jedd, G. & Chua, N.H. (2000) *Nat. Cell Biol.*, 2, 226–231.
- 10) Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., & Jedd, G. (2011) *Dev. Cell*, 21, 457–468.
- 11) Escaño, C.S., Juvvadi, P.R., Jin, F.J., Takahashi, T., Koyama, Y., Yamashita, S., Maruyama, J., & Kitamoto, K. (2009) *Eukaryot. Cell*, 8, 296–305.
- 12) Martín, J.F., Ullán, R.V., & García-Estrada, C. (2012) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 367–382.
- 13) 山内一也, 北 潔 (2008) 〈眠り病〉は眠らない (岩波科学ライブラリー 140). pp. 1–97, 岩波書店, 東京.

川口 甲介, 今中 常雄

(富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室)

Survival strategies of microbes from the point of view of peroxisome with diversity and dynamics  
Kosuke Kawaguchi and Tsuneo Imanaka (Department of Biological Chemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

## 細胞内ホスファチジルセリン (PS) が制御する膜輸送経路

### 1. はじめに

ホスファチジルセリン (phosphatidylserine, 以下 PS と略) は極性頭部にセリン残基を持つグリセリン脂質である (図 1A). 真核細胞の膜の 5~10% を構成し, 特に細胞膜の細胞質側に濃縮して存在することが知られている. 細胞膜における PS の機能として, (1) カルシウムイオン, ジアシルグリセロールと協調してプロテインキナーゼ C

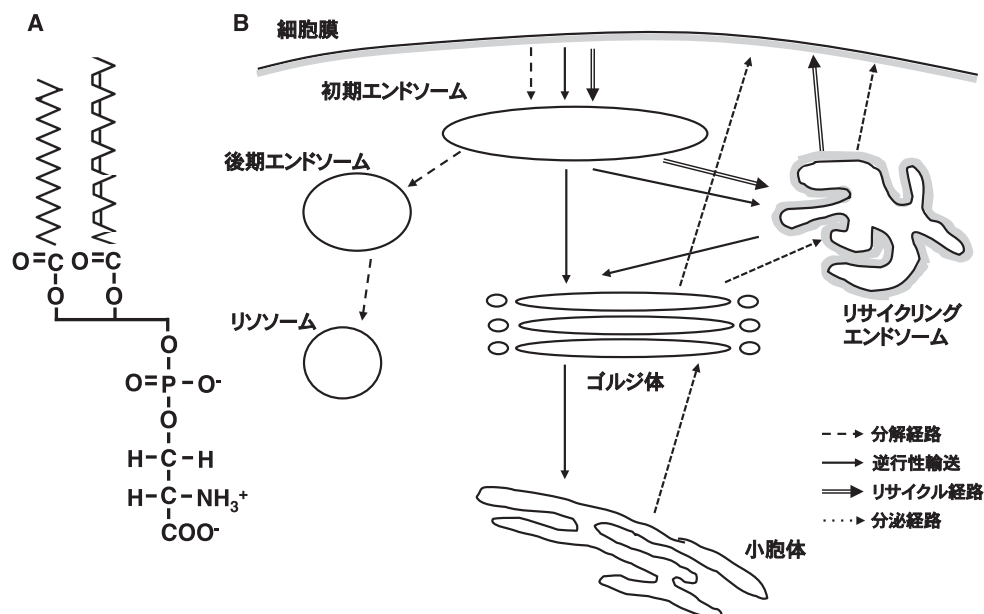


図 1 PS の細胞内分布

(A) PS の構造. グリセロ骨格を持つリン脂質であり, 極性頭部にセリン残基を持つ.

(B) 細胞内物質輸送経路の概念図. PS は, リサイクリングエンドソームと細胞膜の細胞質側に強く濃縮して存在する (灰色で示す).

を細胞膜へ移行・活性化すること、(2) 細胞死に伴い細胞外に露出し、死細胞の貪食を誘起する“eat-me”シグナルとして機能すること、などが良く知られている<sup>1)</sup>。これらふたつは細胞膜におけるPSの機能であるが、近年になって、細胞内小器官に存在するPSの機能も明らかになってきた。本稿では、その中でも特に細胞内物質輸送を制御する細胞内PSに関しての最新の知見を、我々の研究を含めて紹介する。

## 2. PSの細胞内分布

エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた細胞膜上または外界の物質のたどる経路には、(1) リソソームへ運ばれ分解を受ける経路(分解経路)、(2) 細胞膜へ戻る経路(リサイクル経路)、(3) ゴルジ体へと運ばれる経路(逆行性輸送経路)の3種類がある<sup>2,3)</sup>。これら物質の運搬は、エンドソームと総称される細胞小器官群によって担われている(図1B)。細胞内に取り込まれた物質は、まず初期エンドソームと呼ばれるエンドソームに運搬される。物質のたどる運命はここから分岐し、上述した3経路のいずれかによってさらに細胞内へと輸送されていく。初期エンドソームの特徴として、その内部のpHが弱酸性(pH 6付近)であること、細胞質に面している側にPI3P(ホスファチジルイノシトール3-リン酸)を豊富に有することがあげられる。分解経路に乗る代表的な因子に、活性化したEGFR(上皮成長因子受容体)がある。リガンドであるEGFを細胞膜上で認識/結合したEGFRは細胞質部分にユビキチンによる修飾を受け、このユビキチンを認識する因子によって、初期エンドソームから後期エンドソームへ、次いでリソソームへ運搬されることで最終的に分解を受ける。このシステムは、活性化された増殖因子受容体から増殖シグナルが出続けることによって細胞が過増殖することを防ぐための重要な細胞増殖の負の調節機構である。後期エンドソームはその内部に多くの小胞を有することから、multivesicular body (MVB) と呼ばれることもある。後期エンドソームの特徴として、その内部のpHが初期エンドソームよりさらに低下しpH 5付近であること、細胞質に面している側にPI(3,5)P<sub>2</sub>(ホスファチジルイノシトール3,5-ビスリン酸)を有することがあげられる。初期エンドソームから細胞膜へ戻る(リサイクルされる)代表的な分子に、トランスフェリン/トランスフェリン受容体がある。リサイクルに関しては二つの経路が知られている。初期エンドソームから直接細胞膜へ戻る経路と、リサイクリングエンドソームと呼ばれるエンドソームをいった

ん通過して細胞膜へ戻る経路である。リサイクリングエンドソームは多くの細胞で核近縁部に存在するエンドソームであり、その内部のpHは6.5と弱酸性である。

近年、GrinsteinのグループがPSに高い特異性を持つタンパク質性の可視化プローブ(Lactadherinタンパク質のC2ドメインにGFPを結合させた融合タンパク質:以下LactC2-GFPと略)を開発した<sup>4)</sup>。LactC2-GFPを細胞質中に発現することによって細胞膜および細胞小器官の細胞質側のPSを可視化したところ、(1) 小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアなどのPSの合成/代謝/運搬に関与している細胞小器官で予想に反して染色が認められず、(2) エンドソームと細胞膜に強い染色が認められたと報告している。さらに、彼らは大腸菌から精製した組換え型のLactC2-GFPタンパク質を用いることによって細胞固定後のPS染色を行い、細胞内PSの分布を検討している<sup>5)</sup>。この方法では膜のトポロジーと関係なく(細胞質側、細胞小器官の内腔側)PSを検出することができる。この検出方法によって、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアにもPSが観察されたことから、PSはこれら三つの細胞小器官ではその内腔側に主に存在するのだろうと結論している。エンドソームに関しては、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームの細胞質側にPSの局在を認めているが、その中でも特にリサイクリングエンドソームに強い局在を認めたとしている。

evectin-2は、N末端にPH(pleckstrin homology)ドメイン(100~120アミノ酸から構成される領域で、酸性脂質、特にホスファチジルイノシトールリン酸を好んで結合する)を持ち、C末端に膜貫通領域を持つ約220アミノ酸から構成されるタンパク質である(図2A)<sup>6)</sup>。我々は、(1) evectin-2がリサイクリングエンドソームに局在すること、(2) evectin-2 PHがホスファチジルイノシトールリン酸でなくPSを特異的に認識すること、(3) O-ホスホセリンとの共結晶をX線構造解析することで、リガンド認識に必要なアミノ酸残基を特定、(4) リサイクリングエンドソームの細胞質側に豊富に存在するPSをevectin-2 PHが認識することでevectin-2がリサイクリングエンドソームに局在することを明らかにした<sup>7,8)</sup>。この結果は、GrinsteinらのLactC2-GFPを用いた結果と合致するものである。また、ホスファチジルイノシトールリン酸以外のリン脂質を認識するPHドメインを初めて同定したという意義を持つことになった。

リサイクリングエンドソームにPSが濃縮して存在することは、他の細胞小器官が固有のホスファチジルイノシ

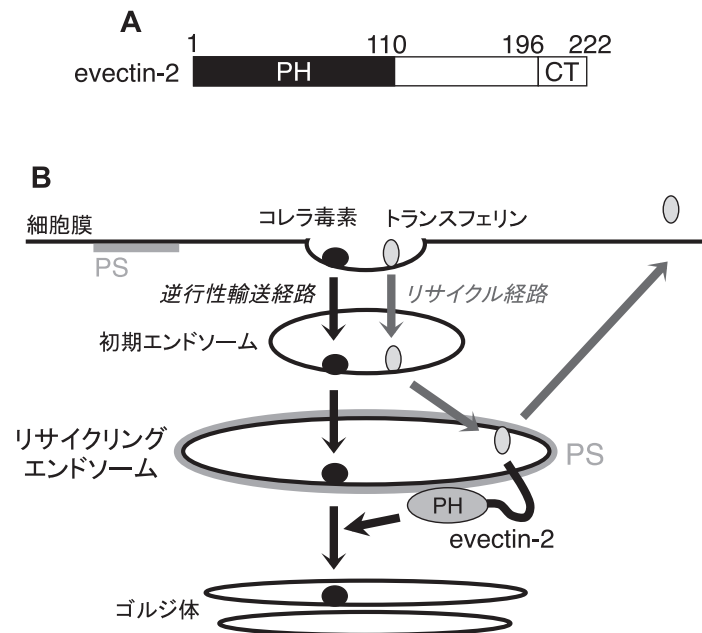


図2 evecin-2による逆行性膜輸送経路の制御

(A) evecin-2の一次構造. N末端にPHドメインを, C末端に膜貫通領域(CT)を持つ.

(B) evecin-2はPHドメインによってリサイクリングエンドソームに局在し, リサイクリングエンドソームからゴルジ体への逆行性膜輸送(例: コレラ毒素)を制御する. リサイクル経路には関与しない. evecin-2はGP73と結合することから, 逆行性膜輸送経路に乗る物質の選別を行っている可能性が考えられる.

トルリン酸を有していることを考えると大変ユニークである [ゴルジ体 (PI4P), 初期エンドソーム (PI3P), 後期エンドソーム (PI(3,5)P<sub>2</sub>), 細胞膜 (PI(4,5)P<sub>2</sub>/PI(3,4,5)P<sub>3</sub>)]<sup>9)</sup>. PSを認識してリサイクリングエンドソームに局在する分子によって, リサイクリングエンドソーム独自の機能が担われている可能性が十分に考えられる (次節を参照).

### 3. リサイクリングエンドソームを通過する膜輸送へのPSの必要性

初期エンドソームからゴルジ体へ至る輸送経路を逆行性輸送経路と呼ぶ (図1B)<sup>10)</sup>. この輸送の流れは, エキソサイトosis (細胞外へと向かう物質の流れ: 小胞体→ゴルジ体→細胞膜) のちょうど裏返しなので, 逆行性輸送と呼ばれている. 近年, 遺伝学の研究からこの経路の重要性が明らかにされた. Wingless と呼ばれる形態形成決定因子が細胞外へ放出されるためには Wntless という受容体が必須であるが, Wntless がゴルジ体に主に局在し, ゴルジ体と

細胞膜の間を逆行性膜輸送を使うことによって行き来していることが示されている. また, コレラ毒素やシガ毒素などのタンパク質性の毒素は, 逆行性膜輸送経路を利用して細胞内に侵入し, エンドソームを通過してゴルジ体/小胞体へ, そして更に細胞質へと輸送されることで毒性を発揮することが知られている<sup>11)</sup>.

我々は evecin-2 がリサイクリングエンドソームからゴルジ体へ向かう逆行性膜輸送経路の特異的な制御因子であることを明らかにした (図2B)<sup>7)</sup>. evecin-2 のノックダウンによって, コレラ毒素の輸送がリサイクリングエンドソームで大幅に遅滞し, また逆行性膜輸送を使ってゴルジ体局在を維持しているタンパク質 (TGN46 と GP73) のゴルジ体局在が失われることがわかった. しかし, その一方でトランスフェリンのリサイクリングエンドソームから細胞膜へ向かう経路 (リサイクル経路) には影響が認められなかった. また, 細胞質中に LactC2-GFP を過剰に発現させ evecin-2 の PH ドメインと PS に対して競合させるとコレラ毒素の逆行性膜輸送がリサイクリングエンドソームで

遅滞することから、リサイクリングエンドソームにおけるPSによる膜輸送制御を示すことができた。

以上、evectin-2の解析を通じて、リサイクリングエンドソームのPSの機能が膜輸送の観点から初めて明らかとなった。PSが単なる生体膜の構成脂質として存在するのではなく、PS結合タンパク質を通じてより広範囲な細胞生物学的機能を果たしている可能性を示唆しているといえる。

#### 4. PSによるCdc42pの極性化機構

哺乳細胞のみならず、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においても近年、PSの機能が明らかにされてきている。GrinsteinのグループはLactC2-GFPを用いることで、酵母の出芽部位を構成する細胞膜にPSが特に濃縮して存在することを示した(図3A)<sup>12)</sup>。分泌経路に異常を持つ温度感受性変異細胞 (*sec1<sup>ts</sup>*, *sec6<sup>ts</sup>*, *sec7<sup>ts</sup>* 細胞)を用いることによって、この出芽部位におけるPSの濃縮がゴルジ体からの分泌経路によって形成・維持されていることを示唆した。*sec1<sup>ts</sup>*, *sec6<sup>ts</sup>* 細胞では非許容温度培養下で出芽部位へのPSの濃縮は認められなくなり、その一方で出芽部位の細胞質部分にPSが蓄積する(図3B)。これは、ゴルジ体から分泌されたPSを含む輸送小胞が出芽部位を構成する細胞膜に融合することができず、その直下の細胞質部分に蓄積してしまったものと解釈できる。

彼らは、このPSの出芽部位での濃縮がCdc42pという

細胞極性の制御因子の局在と酷似していることに着目して、PSとCdc42pの関係について研究を進めた。*cho1Δ*細胞はPSの合成酵素を欠損している変異細胞であるが、(1)出芽形成率が野生株と比較して非常に悪いこと、(2)出芽をしている細胞でCdc42pの局在を見てみると出芽部位へのCdc42pの局在が完全に失われていること、(3)培地にlyso体のPS(細胞内に取り込まれたのちにPSへと代謝される)を添加することによって出芽形成率が上昇し、Cdc42pの出芽部位への局在が回復すること、を明らかにした。Cdc42pはそのC末端に正電荷を持つアミノ酸残基がクラスターを形成している。PSとCdc42pが静電的な相互作用をすることで、PSの極性を持った分布がCdc42pの極性化を制御している可能性が考えられる。

#### 5. 鉄トランスポーターの膜輸送

鉄は生存に必要な元素である。*Saccharomyces cerevisiae* は、フェリクローム (ferrichrome) という低分子性の鉄キレート剤に捕捉された鉄イオンを Arn1p という鉄トランスポーターを介して細胞外から細胞質に取り込む<sup>13)</sup>。Arn1p は、細胞外にフェリクロームが存在しないときはゴルジ体から分解系の細胞小器官へと運搬されるが、細胞外にフェリクロームがナノモルオーダーの濃度で存在すると細胞膜へと輸送され、フェリクロームを細胞外から取り込むことができる。Philpottのグループらは、このフェリクロームの刺激による Arn1p の細胞膜への転移ができない

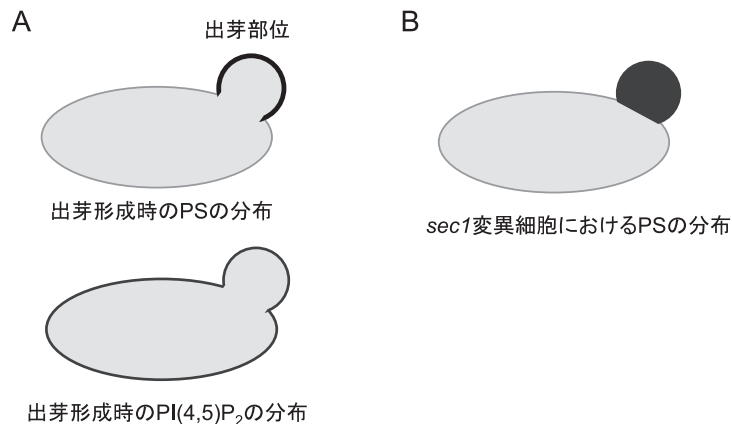


図3 酵母出芽形成時におけるPSの極性分布

(A) LactC2-GFPの発現によるPSの分布。PSが出芽部位に濃縮して存在する。PI(4,5)P<sub>2</sub>は均一に分布している。

(B) *sec1<sup>ts</sup>*細胞(非許容温度培養下)における出芽部位でのPSの分布。出芽部位の細胞膜ではなく、出芽部位の細胞質領域にPSの集積が認められる。

酵母のスクリーニングを行い、*SER1* と *SER2* (セリンの主要な合成酵素をコード) がその過程に必要な遺伝子であることを示した<sup>10)</sup>。セリンは更にプリン、スフィンゴ脂質、リン脂質などに代謝されていくが、リン脂質である PS を細胞培地から補充した時のみ Am1p の細胞膜への転移が回復した。このことから PS は Am1p のフェリクローム依存的な細胞内から細胞膜への輸送過程を制御していることが示唆された。

## 6. おわりに

evectin-2 の同定および PS 特異的な可視化プローブの開発などを通じて、細胞膜に限定されない PS の機能が哺乳細胞で明らかとなってきた。酵母においては細胞内小器官における PS の存在は可視化されていないが (これは単純に量的な問題と考えられる)、それにもかかわらず PS の欠損によって、細胞内物質輸送を介した細胞極性形成 (出芽) や刺激依存的な分泌経路に異常が出ることは興味深い。細胞質にはまだ同定されていない多種多様な PS 結合タンパク質が存在し、哺乳細胞では特にリサイクリングエンドソームを介した膜輸送経路を制御することで多彩な細胞現象に貢献している可能性が考えられる。またなぜひサイクリングエンドソームと細胞膜の細胞質側に特異的に PS が濃縮して存在するのか? その濃縮機構についても今後解明が進むことで、PS を介した細胞生物学的現象の理解が深まることが期待できる。

- 1) Leventis, P.A. & Grinstein, S. (2010) *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 407-427.
- 2) Mellman, I. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 575-625.
- 3) Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 121-132.
- 4) Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (2008) *Science*, **319**, 210-213.
- 5) Fairn, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.I., Grinstein, S., & Parton, R. G. (2011) *J. Cell Biol.*, **194**, 257-275.
- 6) Krappa, R., Nguyen, A., Burrola, P., Deretic, D., & Lemke, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4633-4638.
- 7) Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Iemura, S., Natsume, T., Kuwahara, R., Nakagawa, T., Nishikawa, K., Mukai, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Sheff, D., Lencer, W.I., Taguchi, T., & Arai, H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15846-15851.
- 8) Okazaki, S., Kato, R., Uchida, Y., Taguchi, T., Arai, H., & Wakatsuki, S. (2012) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **68**, 117-123.
- 9) Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006) *Nature*, **443**, 651-657.

- 10) Johannes, L. & Popoff, V. (2008) *Cell*, **135**, 1175-1187.
- 11) Lencer, W.I. & Tsai, B. (2003) *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 639-645.
- 12) Fairn, G.D., Hermansson, M., Somerharju, P., & Grinstein, S. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 1424-1430.
- 13) Kim, Y., Yun, C.W., & Philpott, C.C. (2002) *EMBO J.*, **21**, 3632-3642.
- 14) Guo, Y., Au, W.C., Shakoury-Elizeh, M., Protchenko, O., Basrai, M., Prinz, W.A., & Philpott, C.C. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 39564-39573.

田口 友彦, 新井 洋由

(東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室)

Emerging roles of intracellular phosphatidylserine (PS) in membrane traffic

Tomohiko Taguchi and Hiroyuki Arai (Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

## 神経軸索突起の進路決定メカニズム

### 1. はじめに

脳神経系の機能は、膨大な数の神経細胞が連結したネットワークによって支えられている。適正なネットワーク構築のためには、神経軸索突起が定められた標的まで正確に到達し、連絡構造を形成する必要がある。軸索がたどる道のりには、軸索ガイダンス因子と呼ばれる進行方向を示す標識の役割を果たす分子が存在する。この標識に応じた軸索の進路転換を担うのが、軸索先端部に存在する成長円錐である。ガイダンス因子を受容した成長円錐は、その情報に基づいて自らの運動性を変化させ、進路を転換する。つまり、成長円錐においてどのようにガイダンス因子の情報が処理されるか、そのプロセスを追うことで、正確な軸索投射を制御するメカニズムを解明できると考えられる。その成果は、神経ネットワークの形成過程の理解、さらには損傷軸索再生技術の開発に大きく貢献できる。本稿では、成長円錐の進路決定メカニズムについて、我々の研究成果を中心に概説する。

### 2. 成長円錐における進路方向指示シグナル

軸索ガイダンス因子は、2種類に大別できる。成長円錐を引き寄せる誘引因子と、遠ざける反発因子だ。例えば、