

小胞体におけるタンパク質局在化の分子メカニズム

佐 藤 健

小胞体タンパク質の局在化には KDEL シグナルや di-lysine シグナルといった C 末端アミノ酸配列を介した選別機構が知られているが、これらのシグナルを持たない小胞体タンパク質も数多く存在する。筆者らは、出芽酵母において様々な膜タンパク質の小胞体局在化に働く Rer1 タンパク質 (Rer1p) を発見し、この因子が膜タンパク質の膜貫通領域を認識し、ゴルジ体から小胞体に送り返すことによって小胞体に局在化させる新たな分子選別装置であることを明らかにした。また、Rer1p が複合体形成する膜タンパク質や膜貫通領域に異常を持つタンパク質の品質管理機構にも働くことが明らかとなってきた。近年、ヒトの Rer1p が γ -セクレターゼの構成因子に結合し、複合体形成を制御することによって活性を調節していることが明らかとなっており、Rer1p の研究は酵母からヒトにおける役割へと新たな展開をみせている。

1. はじめに

小胞体は細胞内膜系の大半を占め、膨大な量の分泌タンパク質やエンドメンブレンシステムを構成するタンパク質の合成、糖鎖修飾、品質管理や脂質の生合成を行っており、細胞機能を維持する上できわめて重要な役割を担っている。小胞体において合成された新生タンパク質は糖鎖修飾を受けながら正しいフォールディング、複合体形成を行い、その後、低分子量 GTPase Sar1p によって制御される COPII (coat protein complex II) 小胞によってゴルジ体へと輸出され、それぞれの目的地へと輸送される (図 1)¹⁾。一方、ゴルジ体からは低分子量 GTPase Arf1p によって制御される COPI (coat protein complex I) 小胞によってタンパク質や膜成分が次々と小胞体に送り返されてくる (図 1)^{2,3)}。この膨大な量の物質の流入と流失が繰り返される中で、どのようにして小胞体を構成するタンパク質はゴルジ

体以降に進むタンパク質から選別され、小胞体独自の機能を維持しているのであろうか。この一つの解として、小胞体局在化シグナルを介した様々な分子選別メカニズムの存在が明らかとなってきた。興味深いことに、この小胞体タンパク質の局在化には、単にタンパク質を小胞体から

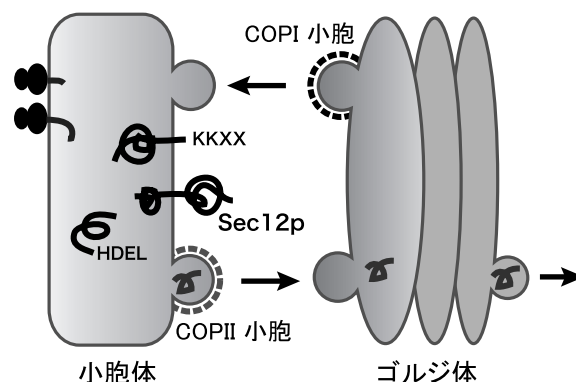


図1 タンパク質の小胞体-ゴルジ体間サイクリングによる小胞体局在化機構

小胞体可溶性タンパク質の C 末端には HDEL/KDEL シグナル、I 型膜タンパク質の C 末端細胞質領域には di-lysine シグナルが存在することがあるが、Sec12p はこれらのシグナルを持っていない。これらのタンパク質は小胞体から全く輸出されないわけではなく、小胞体-ゴルジ体間をリサイクリングしながら定常状態において小胞体に局在している。小胞体からゴルジ体への輸送は COPII 小胞が、ゴルジ体から小胞体への輸送は COPI 小胞が担っている。

群馬大学生体調節研究所細胞構造分野 (〒371-8512 群馬県前橋市昭和町 3-39-15)

Molecular mechanisms of protein localization in the endoplasmic reticulum

Ken Sato (Laboratory of Molecular Traffic, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa, Maebashi, Gunma, 371-8512, Japan)

本総説は 2008 年度奨励賞を受賞した。

出ないようにする（静的残留）だけではなく、ゴルジ体に輸送されてきたタンパク質を再び小胞体へ送り返すこと（動的リサイクリング）が重要である。本稿では筆者らが明らかにした Rer1p を介した膜タンパク質の小胞体局在化メカニズムを中心にその他の分子メカニズムについても解説する。また、複合体を形成してから細胞膜へと輸送される膜タンパク質が単独で存在する場合や膜貫通領域に異常を持つ膜タンパク質が小胞体に留まる際にも、これらの小胞体局在化メカニズムが関与することが明らかとなりつつある。このような膜タンパク質の品質管理における小胞体局在化メカニズムの役割についても紹介したい。

2. 小胞体可溶性タンパク質の局在化メカニズム

小胞体内腔の可溶性タンパク質である免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) やタンパク質ジスルフィドイソメラーゼなどの C 末端にはリジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン (KDEL) というアミノ酸配列が存在する。Pelham らはこの点に着目し、この KDEL 配列がタンパク質の小胞体局在化に必要十分であることを証明した⁴⁾。さらに、出芽酵母においても一群の小胞体可溶性タンパク質にヒスチジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン (HDEL) という類似の C 末端配列が存在し、やはり小胞体局在化に必要十分であったことから、このシグナルを介した選別機構は真核生物において広く保存されていることが明らかとなった (図 1)⁵⁾。KDEL/HDEL シグナルは Sec20p⁶⁾ や Sed4p⁷⁾ などの膜 1 回貫通タンパク質の C 末端にも見出されており、Sec20p に関しては小胞体局在化に重要であることが示唆されている。また、プロリル-4-ヒドロキシラーゼやグルコシダーゼ II の触媒サブユニット、Ero1p などの小胞体タンパク質は KDEL/HDEL シグナルを持っていないが、このシグナルを持つタンパク質と複合体を形成することによって、小胞体に局在化していることが知られている^{8~10)}。興味深いことに、KDEL/HDEL シグナルを分泌タンパク質などに付加すると、定常状態では小胞体に局在化するようになるが、徐々にゴルジ体シス領域特異的な糖鎖修飾を受けることが示されている¹¹⁾。このことから、KDEL/HDEL シグナルを持ったタンパク質は小胞体からまったく出ないわけではなく、ゴルジ体に輸送されても再び小胞体へ送り返されていると考えられる。

Pelham らはこの KDEL/HDEL シグナルを認識し、小胞体に局在化させる分子メカニズムを解明するために、出芽酵母において HDEL 配列を分泌タンパク質に結合したモニタータンパク質を発現させ、その小胞体局在化が異常になるような *erd* (ER retention defective) 変異株を分離した¹²⁾。このうち *erd2* 変異株の原因遺伝子は、定常状態において主にゴルジ体に局在する膜 7 回貫通タンパク質 (Erd2p) をコードしており、生育に必須であった¹³⁾。Erd2p

は HDEL 配列を持つタンパク質を特異的に認識し小胞体に局在化させることから、HDEL 配列を持つタンパク質をゴルジ体から小胞体へと送り返すことによって局在化させるレセプターであると考えられている¹⁴⁾。実際、Erd2p のほ乳類ホモログである KDEL レセプターは、試験管内において KDEL ペプチドと pH 依存的に結合する¹⁵⁾。また、KDEL レセプターの Arg-5, Asp-50, Tyr-162, Asn-165 の四つのアミノ酸残基が KDEL 結合ポケットを形成しており、このうち Asp-50 が種によって異なるシグナル認識の特異性に重要であることが明らかとなっている^{16,17)}。さらに、KDEL レセプターがゴルジ体において KDEL 配列を持つタンパク質と結合すると多量体を形成し、Arf1p の GTPase 活性化タンパク質である ArfGAP1 と COPI 複合体を膜上にリクルートし、ゴルジ体からの小胞形成を促すことが明らかとなっている^{18~22)}。この際、KDEL レセプターの C 末端細胞質領域に存在する Ser-209 がプロテインキナーゼ A によってリン酸化されることが、ArfGAP1、COPI 複合体との相互作用およびゴルジ体から小胞体への逆送に重要であることが示唆されている²³⁾。これらのことから、Erd2p/KDEL レセプターはゴルジ体において小胞体から輸送されてきた HDEL/KDEL タンパク質と pH 依存的に結合し、COPI 小胞を介して再び小胞体へと送り返すことによって局在化させるレセプターであると考えられている。

3. di-lysine シグナルと arginine-based シグナルの発見

アデノウイルス由来の E3/19K タンパク質は、N 末端が小胞体内腔側を向いた膜 1 回貫通タンパク質で、クラス I 主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex; MHC) と相互作用し、小胞体に局在化させることによって細胞膜への輸送を阻害する^{24~26)}。このためアデノウイルスが動物細胞に感染するとクラス I MHC 抗原の細胞表面における発現が抑制され、結果として傷害性 T 細胞による攻撃を受けにくくなる。この E3/19K タンパク質の小胞体局在化に必要十分な領域として、細胞質側に突出している C 末端の DEKKMP という配列が特定された^{27,28)}。さらに詳細な解析から、C 末端から 3, 4 番目 (KKXX) あるいは 3, 5 番目 (KXKXX) に位置するリジン残基が小胞体における局在化に重要であることが明らかとなった (図 1)²⁹⁾。これらの配列をモニタータンパク質に結合させると小胞体とゴルジ体間をリサイクリングするようになり、定常状態において小胞体に局在化する。このような配列はほ乳類の UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼや出芽酵母の Wbp1p などの内在性小胞体膜タンパク質の C 末端にも存在し、小胞体局在化に必要十分であることから、今では di-lysine シグナルとして広く認知されている。この di-lysine シグナルは COPI 複合体の α -COP と β' -COP によっ

て直接認識される^{30,31)}。また一方で、出芽酵母の COPI 複合体の構成因子の変異株では di-lysine シグナルを持つマーカートンパク質の局在が異常になる²⁾。これらのことから、ゴルジ体に輸送されてきた di-lysine シグナルを持つ小胞体タンパク質は、COPI 複合体によって直接的に選別され、COPI 小胞に組み込まれることによってゴルジ体から小胞体へと送り返されていると考えられている。

一方、アルギニン残基を含む小胞体局在化シグナルも明らかとなってきている。ヒトクラス II MHC に含まれる invariant chain (Ii) 33 は N 末端が細胞質側を向いたタイプ II 膜タンパク質で、単独で存在する場合には小胞体に局在する³²⁾。この Iip33 の N 末端細胞質領域にはアルギニン残基を含む MHRRRSRSCREDQKPV-という配列が存在し、小胞体への局在化に重要であることが明らかとなっている。このうち二つのアルギニン残基が N 末端から 2, 3 番目, 3, 4 番目, 4, 5 番目あるいは 2, 4 番目, 3, 5 番目に位置することが重要であったことから、di-arginine モチーフと呼ばれている³³⁾。それ以外にもアルギニン残基を含む小胞体局在化シグナルは、ATP 感受性 K⁺チャネルなどの複合体形成後に小胞体から細胞膜へと輸送される膜

タンパク質にも見られ、これらが単独で存在する場合には小胞体に留める役割を担っている^{34,35)}。この場合は、 $\phi/\psi/R-R-X-R$ (ϕ 芳香族アミノ酸, ψ 大型疎水性アミノ酸, X あらゆるアミノ酸) というアミノ酸配列 (arginine-based シグナル) が重要であると考えられている^{36,37)}。また, arginine-based シグナルは di-lysine シグナルや di-arginine モチーフの場合とは異なり、必ずしもタンパク質の末端に存在する必要はないが、脂質二重層から約 16-46 Å の距離のごく近傍に存在すると機能的であるという報告がある³⁸⁾。arginine-based シグナルも COPI 複合体の β -COP と δ -COP によって直接認識され、COPI 小胞によって小胞体に送り返される際のシグナルとして働くと考えられている³⁹⁾。

4. Rer1p による膜貫通領域を介した小胞体局在化メカニズム

出芽酵母の Sec12p タンパク質 (Sec12p) は N 末端側が細胞質、C 末端側が小胞体内腔を向いた膜 1 回貫通タンパク質で、上述のような小胞体局在化シグナルは持っていないが定常状態において主に小胞体に局在化している (図 1)⁴⁰⁾。Sec12p は低分子量 GTPase Sar1p のグアニンヌクレ

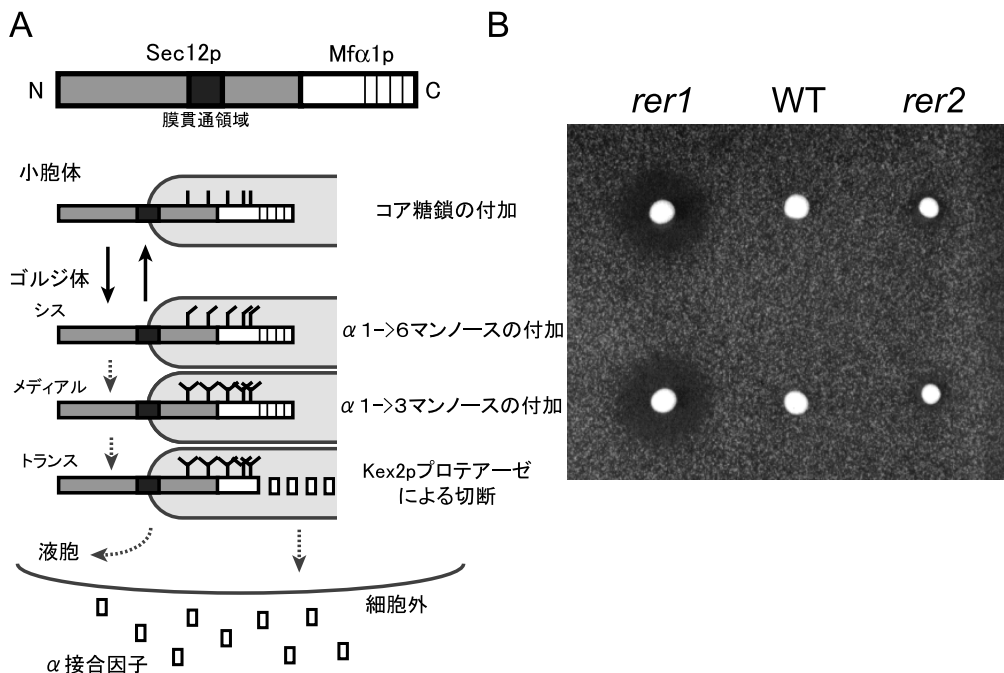


図2 rer 変異株の獲得

Sec12p の C 末端側に酵母 α 接合因子 (性フェロモン) の前駆体である Mf α 1p を結合し、小胞体局在性のモニタータンパク質として用いた (A)。野生株では Sec12p-Mf α 1p は小胞体とゴルジ体シス領域の間をリサイクリングしている (実線)。一方、この局在が異常になるような変異株では、Sec12p-Mf α 1p がゴルジ体トランス領域まで輸送され、Mf α 1p 部分が Kex2p プロテアーゼによってプロセッシングを受けることにより、成熟型 α 接合因子が分泌されるようになる (点線)。 α 接合因子の分泌は、 α 接合因子超感受性株をテストストレインとして用いるハローアッセイによって調べた (B)。その結果、二つの相補性群に分類される劣性変異株 *rer1* (左) 及び *rer2* (右) が分離された。野生株は α 接合因子を分泌しないが (中央), *rer* 変異株のまわりには、 α 接合因子の分泌量に応じて α 接合因子超感受性株の生育できない領域である増殖阻止円 (ハロー) が形成される。

オチド交換因子であり、小胞体において Sar1p を活性化し、COPII 小胞の形成を促進している¹⁾。したがって、Sec12p が正しく小胞体に局在化することは、小胞体からの物質輸送に重要である。Sec12p は *in vitro* 再構成系において形成される COPII 小胞内にはほとんど検出されないが^{41,42)}、ゴルジ体シス領域における糖鎖修飾を徐々に受けていくことから^{43,44)}、このタンパク質の小胞体局在化には、Sec12p を COPII 小胞から排除する静的残留機構と、それでも漏れ出てしまったものを小胞体に戻す動的リサイクリング機構という2段階のメカニズムが働いていると考えられる。詳細なドメイン解析の結果、Sec12p の細胞質領域が静的残留シグナル、膜貫通領域が動的逆送シグナルとして働くことが明らかとなっている⁴⁴⁾。

そこで、この Sec12p の小胞体局在化メカニズムを解明するために、Sec12p の C 末端側に酵母性フェロモンである α 接合因子の前駆体を結合し、このモニタータンパク質の局在が異常になるような *rer* (return to the ER あるいは retention in the ER) 変異株が分離された (図 2)⁴³⁾。このうち *rer1* 変異株では HDEL シグナルを持つ BiP の小胞体局在性にはほとんど異常はなかったが、Sec12p がゴルジ体シス領域以降にまで輸送されてしまうという特異性の高い表現型を示した⁴⁵⁾。そこで、この *rer1* 変異株の原因遺伝子を同定したところ、酵母から動物、植物まで高度に保存された 188 アミノ酸からなる機能未知の膜 4 回貫通タンパク質 (Rer1p) をコードしていることが明らかとなった (図 3)^{45~47)}。Rer1p は定常状態において主にゴルジ体シス領域に局在し、Sec12p の膜貫通領域と特異的に相互作用することが明らかとなった⁴⁸⁾。また、Rer1p の C 末端細胞質領域は COPI 複合体と相互作用すること、COPI 複合体の変異株において Rer1p が液胞へと誤って輸送されてし

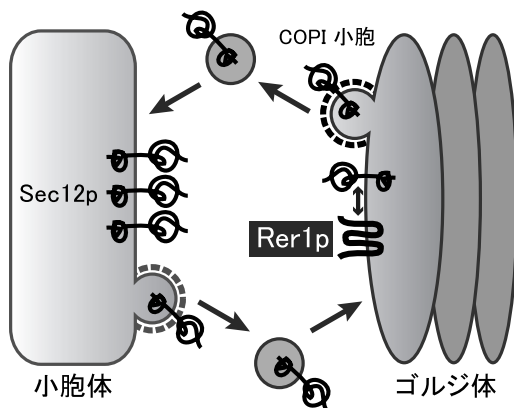


図 3 Sec12p の小胞体局在化における Rer1p の役割

Rer1p は膜 4 回貫通タンパク質で、定常状態において主にゴルジ体シス領域に局在化している。Rer1p はゴルジ体に輸送されてきた Sec12p の膜貫通領域を認識し、COPI 小胞を介して再び小胞体へと送りかえすことによって Sec12p を小胞体に局在化させている。

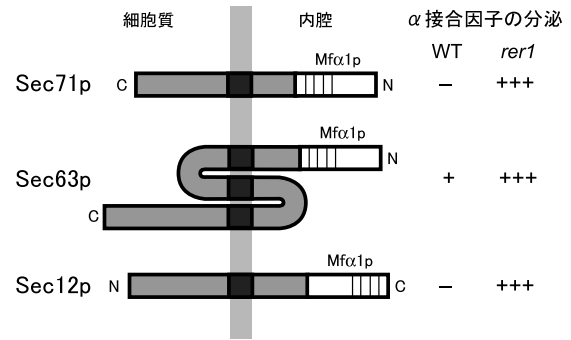


図 4 様々なタイプの小胞体膜タンパク質の局在化における Rer1p の重要性

Sec12p とは逆のトポロジーをとる Sec71p や膜を 3 回貫通している Sec63p についてそれぞれ α 接合因子前駆体 (Mf α 1p) を結合し、これらの小胞体局在における Rer1p 依存性について検討した。これらのモニタータンパク質は、野生株においては主に小胞体に局在化するが、*rer1* 変異株では誤ってゴルジ体トランス領域まで輸送され、 α 接合因子が分泌されるようになる。

まうことから、Rer1p はゴルジ体に輸送されてきた Sec12p の膜貫通領域を認識し、COPI 小胞を介して再び小胞体へと送り返す新たな分子選別装置であることが明らかとなった (図 3)⁴⁸⁾。さらに、Rer1p の機能の一般性を知るために、Sec12p と異なるタイプの小胞体膜タンパク質についても解析を行ったところ、Sec12p とは全く正反対のトポロジーをとる Sec71p や膜を 3 回貫通している Sec63p に関してもやはり Rer1p が認識し、小胞体に局在化させることが明らかとなった (図 4)^{49,50)}。その後、Mns1p など様々なタイプの小胞体膜タンパク質の局在化にも Rer1p が働くことが明らかとなってきている^{51~53)}。これらのことから、Rer1p を中心とした分子選別機構は膜タンパク質の小胞体局在化に働く普遍的なメカニズムであると考えられる。

5. Rer1p による膜貫通領域の選別メカニズム

Rer1p はどのようにして一次配列上相同性のない様々なタイプの膜タンパク質を認識しているのだろうか。まず Rer1p 依存的な小胞体局在化に必要な Sec12p の膜貫通領域について解析したところ、膜貫通領域の中央に見られる適度な長さの疎水性残基のクラスターとその両端の極性残基というアミノ酸の分布様式が Rer1p による認識に重要であることが明らかとなった (図 5)⁴⁴⁾。一方、Sec12p とまったく正反対のトポロジーをとる Sec71p の場合も膜貫通領域が小胞体膜への挿入および局在化に必要十分であり、この膜貫通領域が Rer1p によって直接的に認識されることが明らかとなった (図 6)⁵⁰⁾。また、Sec71p の膜貫通領域についても、疎水性残基のクラスターと極性残基の空間的な位置が Rer1p による認識に重要であった (図 7)。一方、Rer1p の膜貫通領域にも注目し、Rer1p の四つの膜貫通領域に存在する極性残基について網羅的に変異解析を行った

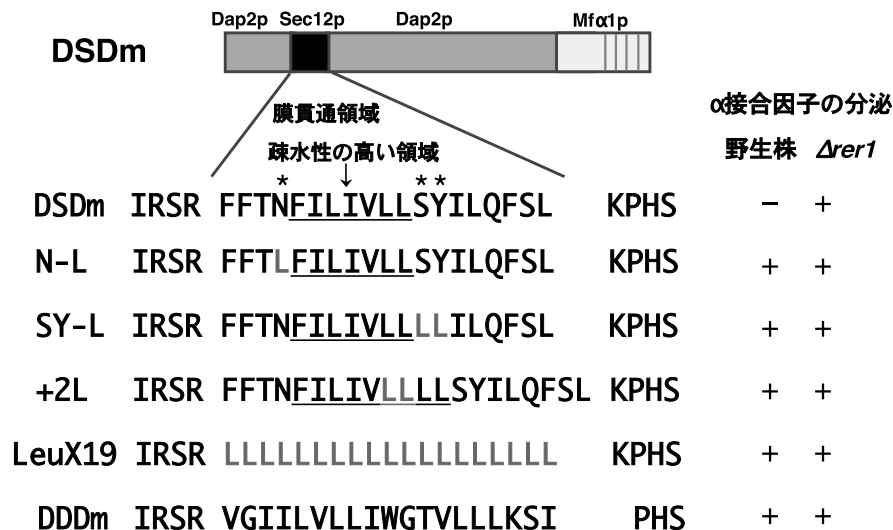


図5 Sec12p における Rer1p 依存的な小胞体局在化シグナル
液胞膜タンパク質 Dap2p の膜貫通領域を Sec12p のものと置換すると、Rer1p 依存的に小胞体に局在化する。そこで、このタンパク質に α 接合因子前駆体 (Mfα1p) を融合し、このモニタータンパク質 (DSDm) における Sec12p の膜貫通領域について変異解析を行った。Sec12p の膜貫通領域には疎水性の高い領域 (下線) とその両側に存在する極性アミノ酸 (*) が見られる。これらの極性アミノ酸をロイシンに置換すると (N-L, SY-L), Rer1p 依存的な小胞体局在性が消失し、DSDm はゴルジ体トランス領域まで輸送され、α 接合因子が分泌される。また、疎水性の高い領域に二つのロイシンを挿入したり (+2L), すべて膜貫通領域をすべてロイシンに置換した場合にも Rer1p 依存的な小胞体局在性が失われる。これらのことから、疎水性の高い領域と極性残基の空間的配置が Rer1p 依存的な小胞体局在化に重要であると考えられる。

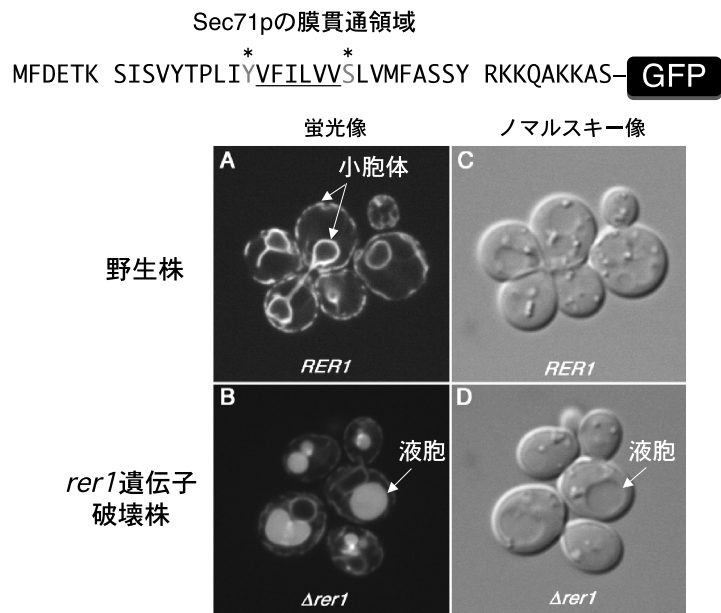


図6 Sec71p における Rer1p 依存的な小胞体局在化シグナル
Sec12p とは逆のトポロジーをとる Sec71p の膜貫通領域とその近傍の 35 アミノ酸を GFP に融合し、その細胞内局在性を観察した。野生株では定常状態においてはほぼ完全に小胞体に局在化するが (A), *rer1* 遺伝子破壊株ではほとんど液胞 (酵母のリソソーム) へと輸送されてしまう (B)。Sec71p の膜貫通領域にも中央の疎水性の高い領域 (下線) とその両側の極性アミノ酸残基 (*) が存在する。

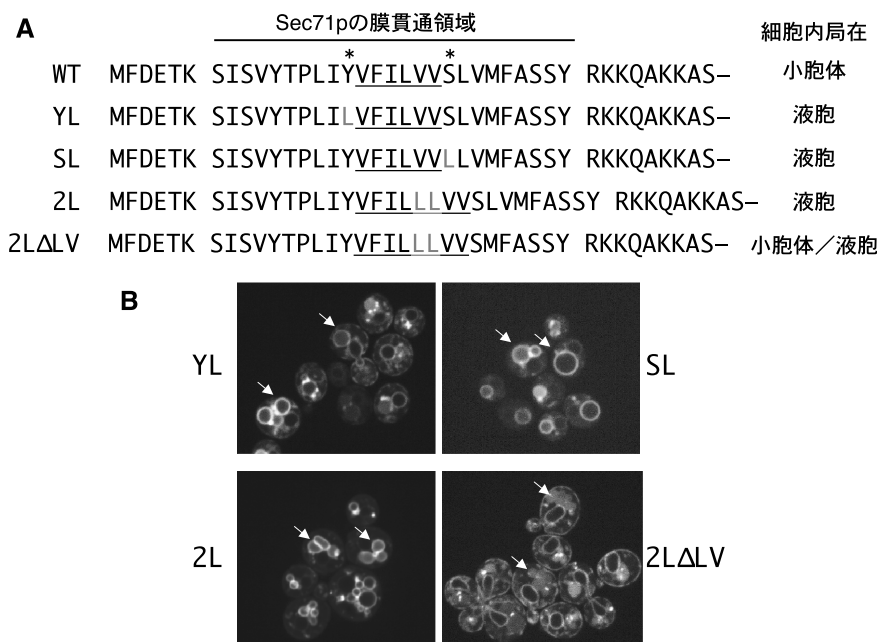


図 7 Sec71p の膜貫通領域における Rer1p 依存的シグナルの探索

Sec71p の膜貫通領域とその近傍の 35 アミノ酸を GFP に融合したモニタータンパク質を用いて、Sec71p の膜貫通領域について変異解析を行った。Sec71p の膜貫通領域にも疎水性の高い領域（下線）とその両側に存在する極性アミノ酸残基（*）が見られる。これらの極性アミノ酸をロイシンに置換すると（YL, SL），Rer1p 依存性が消失し、液胞へと輸送されてしまう。また、疎水性の高い領域に二つのロイシンを挿入した場合（2L）にも Rer1p 依存的な小胞体局在性が失われる。しかし、二つのロイシンを挿入した代わりに疎水性の高い領域から二つのアミノ酸残基を欠失させ、膜貫通領域の長さを野生型と同じにした場合（2LΔLV）でも依然として液胞へと輸送されてしまう。これらのことから、単に膜貫通領域の長さではなく、疎水性の高い領域と極性残基の空間的配置が Rer1p 依存的な小胞体局在化に重要であると考えられる。

ところ、Rer1p のホモログ間で非常によく保存された 4 番目の膜貫通領域に存在する 152 番目のチロシン残基が、Sec12p の膜貫通領域との相互作用に重要であることが明らかとなった⁵⁰⁾。一方で、この 152 番目のチロシン残基をロイシンに置換したような変異 Rer1p でも Sec71p の膜貫通領域と相互作用し、小胞体に局在化させることができることから、Rer1p による小胞体膜タンパク質の認識には複数の様式があることが示唆された。

6. 異常膜タンパク質の小胞体局在化における Rer1p の役割

Gas1 タンパク質（Gas1p）は小胞体において膜貫通領域を持つ前駆体の形で合成され、その後、膜貫通領域近傍で切断され、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーが付加される。この Gas1p の GPI アンカー付加部位であるアスパラギン残基に変異を導入すると、膜貫通領域が切断されず小胞体に留まるようになる⁵³⁾。この小胞体局在化も Rer1p 依存的であり、Gas1p の膜貫通領域における極性残基の存在が重要であった⁵³⁾。このことから、Rer1p は Gas1p に GPI アンカーが付加されるまで小胞体に

留めておく役割を担っている可能性がある。一方、出芽酵母の膜 7 回貫通型の性ホルモン受容体である Ste2 タンパク質（Ste2p）において 7 番目の膜貫通領域に存在する 290 番目のプロリン残基をアスパラギン酸に置換すると、やはり小胞体に蓄積してしまう。このタンパク質の小胞体局在化も Rer1p 依存的であり、COPI 小胞を介したゴルジ体から小胞体へのリサイクリングが重要であることが明らかとなっている⁵³⁾。興味深いことに、*RER1* 遺伝子を破壊するとこの変異 Ste2p は小胞体から細胞膜へと輸送され、性ホルモン受容体としての活性を回復する。

7. 複合体形成する膜タンパク質の品質管理機構

細胞膜上で複合体として働くタンパク質の多くは、小胞体膜上で複合体を形成後、ゴルジ体、細胞膜へと輸送される。一方で、これらの各サブユニットを単独で発現させると定常状態において小胞体に局在化してしまい、あるものは分解されてしまうことが知られている。このような小胞体における品質管理にも小胞体局在化シグナルが利用されている。免疫グロブリン E の高親和性レセプターである FcεR1 の α 鎖には di-lysine シグナルが存在し、単独で存在

すると小胞体に局在化する。しかし、 γ 鎖と会合すると、 α 鎖の di-lysine シグナルが γ 鎖の細胞質ドメインによって物理的にマスクされるため、小胞体局在化機構を回避し、細胞膜へと輸送されるようになる⁵⁴⁾。

一方で、arginine-based シグナルを持つ内在性の小胞体膜タンパク質は実は見つかっておらず、このシグナルは MHC クラス II タンパク質や K^+ チャネル等といった複合体形成後に細胞膜へと輸送されるタンパク質に多く見られる³⁶⁾。これらは単独で存在していると小胞体に局在化しますが、複合体形成が完了するとやはり arginine-based シグナルが物理的にマスクされ、小胞体から細胞膜へと輸送される。この arginine-based シグナルをマスクする方法としては、複合体を形成すると物理的に隠れてしてしまう場合³⁴⁾と 14-3-3 タンパク質などがリクルートされ、arginine-based シグナルを覆ってしまう場合⁵⁵⁾等が報告されている。

8. 膜タンパク質の複合体形成過程における Rer1p の役割

筆者らは膜タンパク質の複合体形成過程における品質管理機構に Rer1p が関与している例を見出している。出芽酵母の鉄輸送タンパク質 Ftr1p と二価鉄のオキシダーゼ Fet3p は小胞体で複合体を形成したのち、細胞膜へと輸送される。しかし、*ftr1* 遺伝子破壊株では Fet3p が定常状態において小胞体に局在化してしまい、細胞膜へと輸送されなくなる (図 8, 図 9)⁵⁶⁾。解析の結果、*ftr1* 遺伝子破壊株における Fet3p の小胞体局在化には Fet3p の膜貫通領域が

必要であること、また糖鎖修飾の解析から、複合体形成できない Fet3p は小胞体とゴルジ体シス領域間をリサイクリングしていることが判明した。そこで、この Fet3p の小胞体局在化における Rer1p の関与について検証するために、*FTR1* と *RER1* の二重遺伝子破壊株を構築し Fet3p の細胞内局在を解析したところ、Fet3p はもはや小胞体に局在化しておらず、ほとんどのものは液胞へと輸送されていた (図 9A)。また、*ftr1* 遺伝子破壊株における Fet3p の小胞

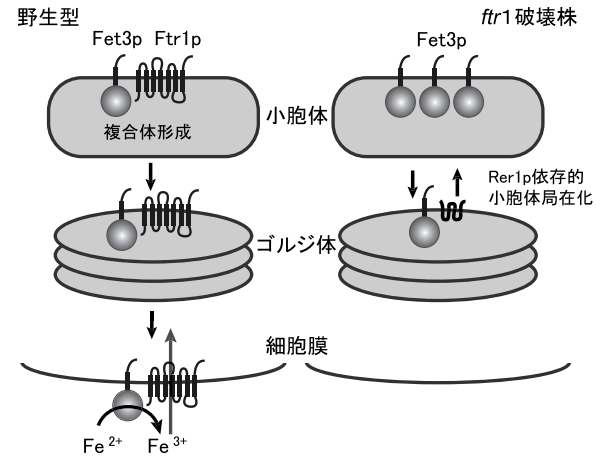


図 8 鉄輸送タンパク質 Ftr1p と二価鉄のオキシダーゼ Fet3p の複合体形成と細胞内輸送

野生株において Ftr1p と Fet3p は複合体形成後に小胞体から細胞膜へと輸送される (左図)。一方、Ftr1p を欠損した株では、Fet3p は Rer1p 依存的に小胞体に局在化ようになる (右図)。

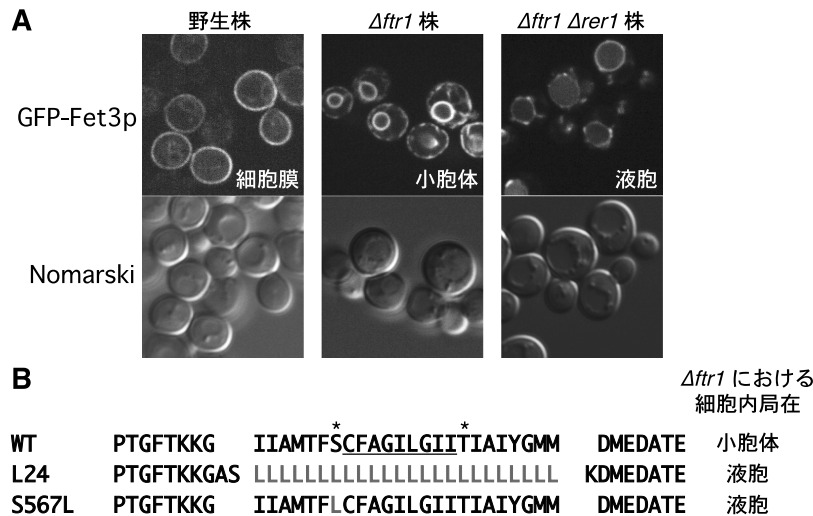


図 9 Fet3p の Rer1p 依存的な小胞体局在化

(A) 野生株において GFP を融合した Fet3p (GFP-Fet3p) を発現すると、細胞膜に局在化する (左)。 $\Delta ftr1$ 破壊株においては、GFP-Fet3p が小胞体に局在化してしまう (中央)。FTR1 遺伝子に加え、RER1 遺伝子も同時に欠損すると、GFP-Fet3p は小胞体から液胞へと輸送される (右)。(B) $\Delta ftr1$ 破壊株における Fet3p の小胞体局在化に必要な領域の解析。Fet3p の膜貫通領域にも疎水性の高い領域 (下線) と極性アミノ酸残基が存在する。膜貫通領域をすべてロイシンに置換した場合 (L24) や 567 番目のセリン残基をロイシンに置換した場合 (S567L) は液胞へと輸送されてしまう。

体局在化にも膜貫通領域に存在する極性残基が重要であること、複合体形成していない Fet3p と Rer1p が物理的に相互作用することが明らかとなった (図 9B)。さらに, *rer1* 破壊株では Ftr1p が存在していても細胞内の Fet3p の量が著しく減少することから, Rer1p は複合体形成を完了していない膜タンパク質を小胞体-ゴルジ体間でリサイクリングさせることによって複合体の形成効率を高めているのではないかと考えられる。

9. γ -セクレターゼ複合体形成における Rer1p の役割

γ -セクレターゼはプレセニン、ニカストリン、APH-1, PEN-2 を含むアスパルチルプロテアーゼ複合体であり, 少なくとも 30 種以上のタイプ I 膜タンパク質を膜内で切断することが明らかとなっている⁵⁷⁾。アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は γ -セクレターゼの基質の一つであると考えられており, この APP に β -セクレターゼおよび異常な γ -セクレターゼが働くことによってアルツハイマー病において脳に沈着する A β 42 が産生すると考えられている⁵⁸⁾。特にプレセニンは家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としても同定されており, γ -セクレターゼの活性異常がアルツハイマー病の原因の一つではないかと考えられている^{59,60)}。近年, この γ -セクレターゼの複合体形成過程にヒトの Rer1p ホモログが関与することが明らかになってきた^{61,62)}。 γ -セクレターゼの複合体は, まずニカストリンと APH-1 が複合体を形成し, その後, プレセニン, PEN-2 が会合することで完成する (図 10)。この γ -セクレターゼ複合体の形成には小胞体とゴルジ体間のリサイクリング経路が重要な役割を担っていると考えられている。興味深いことに, ニカストリンと相互作用する因子としてヒトの Rer1p が同定された⁶²⁾。Rer1p は未成熟なニカストリンとのみ相互作用し, その相互作用にはやはり膜貫通領域における疎水性の高い領域と極性残基の配置が重要であった。また一方で, PEN-2 と相互作用する因子としても Rer1p が同定されている⁶¹⁾。PEN-2 は膜 2 回貫通タンパク質で, 単独で存在する場合には主に小胞体に局在化する。この場合, PEN-2 における二つの膜貫通領域のうち N 末端側にある膜貫通領域が Rer1p 依存的な小胞体局在化シグナルとして働く。また, PEN-2 の膜貫通領域においても, 種間で保存されたアスパラギン残基が小胞体局在化に重要である。興味深いことに, Rer1p は単独のニカストリンや PEN-2 とは相互作用するが, 最終産物である成熟した γ -セクレターゼ複合体には存在しない。また, Rer1p が認識するニカストリンの膜貫通領域中の極性残基は, ニカストリンと APH-1 の複合体形成にも重要な領域であった。さらにヒト Rer1p の発現をノックダウンすると γ -セクレターゼ活性が上昇し, 逆に過剰発現すると低下することから, APH-1 とニカストリンの結合部位を Rer1p が競合する

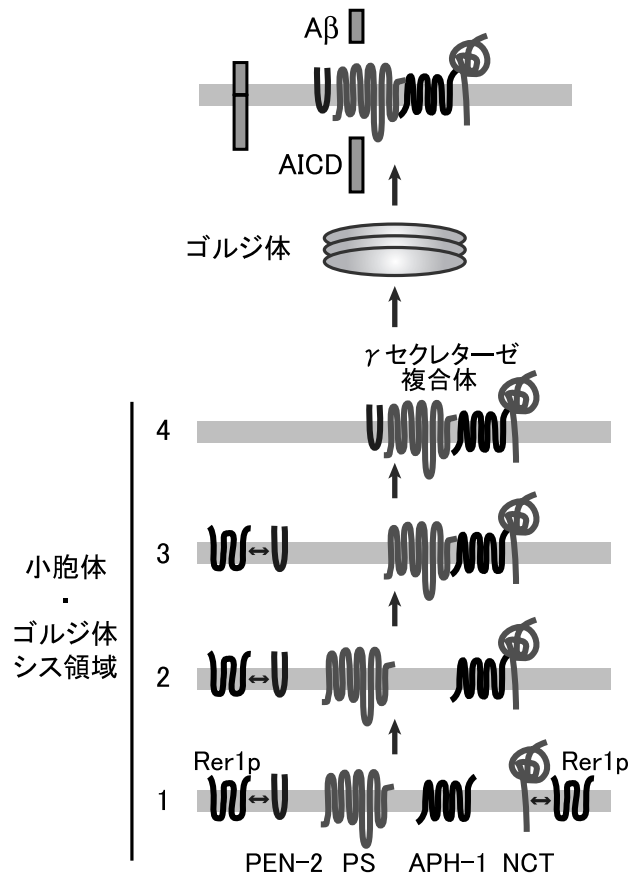


図 10 γ -セクレターゼの複合体形成と Rer1p

γ -セクレターゼはまずニカストリン (NCT) と APH-1 が複合体を形成し, その後プレセニン (PS) と PEN-2 が会合すると小胞体以降に輸送され, A β の産生に働くと考えられている。ヒト Rer1p はこのうちニカストリンおよび PEN-2 と膜貫通領域を介して相互作用し, γ -セクレターゼの複合体形成を制御していると考えられている。

ことで複合体形成の効率を調節している可能性が指摘されている。今後, Rer1p は γ -セクレターゼ活性を調節する新たな薬剤のターゲットになりうると期待される。

10. おわりに

このように, 小胞体タンパク質のゴルジ体からのリサイクリング経路には少なくとも三つの選別メカニズムが働くことが明らかになってきている。一つは Erd2p/KDEL レセプターによる KDEL/HDEL シグナル選別機構, 二つめは di-lysine シグナルや arginine-based シグナルを COPI 複合体が直接的に認識し小胞体へと送り返す選別機構, そして Rer1p を介した膜貫通領域をシグナルとする選別機構である (図 11)。すでに 7 種以上の膜タンパク質が Rer1p 依存的な小胞体局在性を示すことが明らかになってきており, この Rer1p を中心とした選別機構も広くタンパク質の小胞体局在化に働いていると考えられる。また, Ste2p の変異タンパク質の例のように膜貫通領域に変異を持つタン

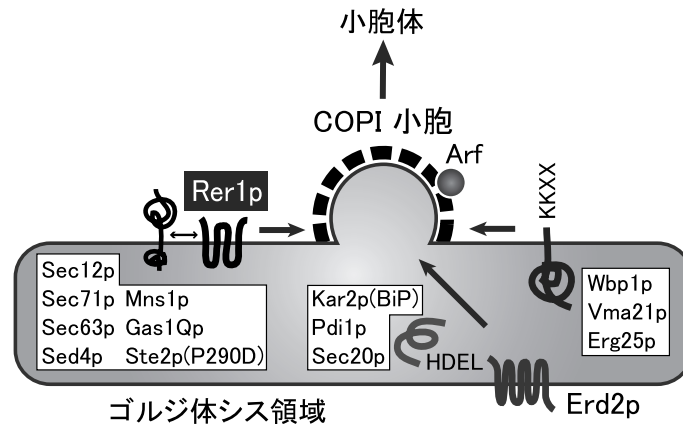


図 11 ゴルジ体における小胞体タンパク質の選別メカニズム

HDEL/KDEL シグナルを持つタンパク質は Erd2p に選別され、COPII 小胞を介して小胞体に送りかえされる。di-lysine シグナルや arginine-based シグナルを持つタンパク質は直接的に COPII 複合体のサブユニットによって認識され、COPII 小胞に組み込まれる。これらのシグナルを持たない Sec12p などの膜貫通タンパク質は Rer1p によって膜貫通領域が認識され、やはり COPII 小胞を介して小胞体へと送り返される。

パク質の小胞体局在化にも Rer1p が働くことが明らかとなってきた。近年、先天性高インスリン血症の原因遺伝子産物の一つとして、細胞膜上で働く ATP 感受性 K^+ チャンネルの構成因子 SUR1 が同定されてきている⁶³⁾。SUR1 は膜 3 回貫通タンパク質であるが、この最初の膜貫通領域に変異が入った結果、小胞体に留まってしまい細胞膜に輸送されないため、病態を引き起こすケースも見つかっている⁶⁴⁾。このような場合も Rer1p が異常タンパク質の小胞体局在化に関与している可能性がある⁶⁵⁾。さらに、Fet3p や γ -セクレターゼの例のように膜タンパク質の複合体形成にも Rer1p が働くことが明らかとなってきた。これらのことから、Rer1p は単に小胞体タンパク質の局在化だけではなく、小胞体-ゴルジ体間における膜タンパク質の品質管理においても重要であると考えられる。Rer1p は脂質二重層という疎水的な環境に露出された膜貫通領域における極性残基を認識し、小胞体へ送り返す新しいタイプの選別シャペロン (sorting chaperone) と言えるのかもしれない。

一方で、小胞体における膜タンパク質の静的残留メカニズムに関しては、いまだ未解明な点が多い。シトクロム b_5 のような C 末端側に膜貫通領域 (C 末端アンカー配列) を持つタンパク質やシトクロム P-450 のような N 末端側に膜貫通領域 (シグナルアンカー配列) を持つタンパク質は非常にゆっくりと小胞体-ゴルジ体間をリサイクリングするものの、そのほとんどは小胞体から出ないことが報告されている^{66~71)}。これらの小胞体局在化も膜貫通領域が小胞体局在化シグナルとして働き、シトクロム b_5 に関しては膜貫通領域の長さが重要であることが示唆されている^{67,72)}。最近、小胞体に局在化する短い C 末端アンカー配列 (17

アミノ酸残基) を持つタンパク質は細胞膜に輸送される長い C 末端アンカー配列 (22 アミノ酸残基) を持つタンパク質に比べ、小胞体の輸出部位 (ER exit site) にあまり分布しないことが明らかとなってきた⁷³⁾。このことから、小胞体膜には異なる脂質ドメインが分離して存在し、短い C 末端アンカー配列を持つタンパク質は小胞体の輸出部位を構成する脂質ドメインに分布しにくいという報告もある⁷⁴⁾。今後、膜タンパク質の COPII 小胞への選別メカニズムを考える上で、小胞体やゴルジ体における脂質ドメインの存在も考慮したさらなる検証が必要であろう。

謝辞

本研究は、東京大学大学院理学系研究科 中野明彦先生のご指導のもとに行いました。当時、ただ漠然と小胞体局在化機構を解明したいというだけだった筆者に論理的な方向性とその手法を懇切丁寧に指導いただきました中野明彦先生に心から感謝いたします。また、rer 変異株の分離と初期の実験指導をしてくださりました西川周一先生 (現名古屋大学) に深く感謝いたします。特に、この研究の初期から共に研究を進め、Sec12p の局在化シグナルの発見など多大な貢献をしてくれた佐藤美由紀博士 (現群馬大学) に心から感謝いたします。安楽泰宏先生、大矢禎一先生、茂木立志先生、岡敏彦先生をはじめ実験指導や貴重なご助言をいただきました当時の東京大学生体制御研究室と

理化学研究所生体膜研究室のメンバーの皆さんに感謝いたします。また、大学学部生の時にタンパク質局在化機構の魅力を教えていただいた九州大学の太田恒雄先生、三原勝芳先生、阪口雅郎先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Sato, K. & Nakano, A. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2076–2082.
- 2) Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., & Cosson, P. (1994) *Cell*, **79**, 1199–1207.
- 3) Rothman, J.E. (1996) *Protein Sci.*, **5**, 185–194.
- 4) Munro, S. & Pelham, H.R. (1987) *Cell*, **48**, 899–907.
- 5) Pelham, H.R. (1988) *EMBO J.*, **7**, 913–918.
- 6) Sweet, D.J. & Pelham, H.R. (1992) *EMBO J.*, **11**, 423–432.
- 7) Hardwick, K.G., Boothroyd, J.C., Rudner, A.D., & Pelham, H. R. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4187–4195.
- 8) Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Marttila, M., & Kivirikko, K.I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7467–7470.
- 9) Trombetta, E.S., Simons, J.F., & Helenius, A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 27509–27516.
- 10) Otsu, M., Bertoli, G., Fagioli, C., Guerini-Rocco, E., Nerini-Molteni, S., Ruffato, E., & Sitia, R. (2006) *Antioxid Redox Signal*, **8**, 274–282.
- 11) Dean, N. & Pelham, H.R. (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 369–377.
- 12) Pelham, H.R., Hardwick, K.G., & Lewis, M.J. (1988) *EMBO J.*, **7**, 1757–1762.
- 13) Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., & Pelham, H.R. (1990) *Cell*, **61**, 1349–1357.
- 14) Lewis, M.J., Sweet, D.J., & Pelham, H.R. (1990) *Cell*, **61**, 1359–1363.
- 15) Wilson, D.W., Lewis, M.J., & Pelham, H.R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7465–7468.
- 16) Townsley, F.M., Wilson, D.W., & Pelham, H.R. (1993) *EMBO J.*, **12**, 2821–2829.
- 17) Scheel, A.A. & Pelham, H.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2467–2472.
- 18) Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P.J., & Hsu, V.W. (1997) *EMBO J.*, **16**, 7305–7316.
- 19) Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S.C., Romero, G., Cassel, D., & Hsu, V.W. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20545–20549.
- 20) Aoe, T., Lee, A.J., van Donselaar, E., Peters, P.J., & Hsu, V. W. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1624–1629.
- 21) Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W., & Aoe, T. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3082–3091.
- 22) Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R., & Soling, H.D. (2001) *Dev. Cell*, **1**, 139–153.
- 23) Cabrera, M., Muniz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martin, M.E., & Velasco, A. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4114–4125.
- 24) Andersson, M., Paabo, S., Nilsson, T., & Peterson, P.A. (1985) *Cell*, **43**, 215–222.
- 25) Burgert, H.G. & Kvist, S. (1985) *Cell*, **41**, 987–997.
- 26) Severinsson, L. & Peterson, P.A. (1985) *J. Cell Biol.*, **101**, 540–547.
- 27) Nilsson, T., Jackson, M., & Peterson, P.A. (1989) *Cell*, **58**, 707–718.
- 28) Paabo, S., Bhat, B.M., Wold, W.S., & Peterson, P.A. (1987) *Cell*, **50**, 311–317.
- 29) Jackson, M.R., Nilsson, T., & Peterson, P.A. (1990) *EMBO J.*, **9**, 3153–3162.
- 30) Cosson, P. & Letourneur, F. (1994) *Science*, **263**, 1629–1631.
- 31) Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., & Duden, R. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1011–1023.
- 32) Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V., & Peterson, P.A. (1990) *Nature*, **348**, 600–605.
- 33) Schutze, M.P., Peterson, P.A., & Jackson, M.R. (1994) *EMBO J.*, **13**, 1696–1705.
- 34) Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., & Jan, L.Y. (2000) *Neuron*, **27**, 97–106.
- 35) Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., & Jan, L.Y. (1999) *Neuron*, **22**, 537–548.
- 36) Michelsen, K., Yuan, H., & Schwappach, B. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 717–722.
- 37) Zerangue, N., Malan, M.J., Fried, S.R., Dazin, P.F., Jan, Y.N., Jan, L.Y., & Schwappach, B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2431–2436.
- 38) Shikano, S. & Li, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5783–5788.
- 39) Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., & Schwappach, B. (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 209–217.
- 40) Nakano, A., Brada, D., & Schekman, R. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 851–863.
- 41) Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., & Schekman, R. (1994) *Cell*, **77**, 895–907.
- 42) Oka, T. & Nakano, A. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 425–434.
- 43) Nishikawa, S. & Nakano, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8179–8183.
- 44) Sato, M., Sato, K., & Nakano, A. (1996) *J. Cell Biol.*, **134**, 279–293.
- 45) Sato, K., Nishikawa, S., & Nakano, A. (1995) *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1459–1477.
- 46) Fullekrug, J., Boehm, J., Rottger, S., Nilsson, T., Mieskes, G., & Schmitt, H.D. (1997) *Eur. J. Cell Biol.*, **74**, 31–40.
- 47) Sato, K., Ueda, T., & Nakano, A. (1999) *Plant Mol. Biol.*, **41**, 815–824.
- 48) Sato, K., Sato, M., & Nakano, A. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 935–944.
- 49) Sato, K., Sato, M., & Nakano, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9693–9698.
- 50) Sato, K., Sato, M., & Nakano, A. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3605–3616.
- 51) Massaad, M.J., Franzusoff, A., & Herscovics, A. (1999) *Eur. J. Cell Biol.*, **78**, 435–440.
- 52) Massaad, M.J. & Herscovics, A. (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 4629–4635.
- 53) Letourneur, F. & Cosson, P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33273–33278.
- 54) Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C., & Cosson, P. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 971–978.
- 55) Kuwana, T., Peterson, P.A., & Karlsson, L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1056–1061.
- 56) Sato, M., Sato, K., & Nakano, A. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1417–1424.
- 57) Spasic, D. & Annaert, W. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 413–420.
- 58) Wolfe, M.S. & Guenette, S.Y. (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 3157–3161.
- 59) De Strooper, B. (2007) *EMBO Rep.*, **8**, 141–146.
- 60) Shen, J. & Kelleher, R.J., 3rd (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, 104, 403–409.
- 61) Kaether, C., Scheuermann, J., Fassler, M., Zilow, S., Shirotani, K., Valkova, C., Novak, B., Kacmar, S., Steiner, H., & Haass, C. (2007) *EMBO Rep.*, 8, 743–748.
 - 62) Spasic, D., Raemaekers, T., Dillen, K., Declerck, I., Baert, V., Serneels, L., Fullekrug, J., & Annaert, W. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 629–640.
 - 63) Huopio, H., Shyng, S.L., Otonkoski, T., & Nichols, C.G. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 283, E207–216.
 - 64) Yan, F., Lin, C.W., Weisiger, E., Cartier, E.A., Taschenberger, G., & Shyng, S.L. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 11096–11105.
 - 65) Schwappach, B. (2008) *Mol. Membr. Biol.*, 25, 270–278.
 - 66) Homma, K., Yoshida, Y., & Nakano, A. (2000) *J. Biochem.*, 127, 747–754.
 - 67) Honsho, M., Mitoma, J.Y., & Ito, A. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 20860–20866.
 - 68) Mitoma, J. & Ito, A. (1992) *EMBO J.*, 11, 4197–4203.
 - 69) Murakami, K., Mihara, K., & Omura, T. (1994) *J. Biochem.*, 116, 164–175.
 - 70) Pedrazzini, E., Villa, A., Longhi, R., Bulbarelli, A., & Borgese, N. (2000) *J. Cell Biol.*, 148, 899–914.
 - 71) Yamamoto, A., Masaki, R., & Tashiro, Y. (1985) *J. Cell Biol.*, 101, 1733–1740.
 - 72) Pedrazzini, E., Villa, A., & Borgese, N. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4207–4212.
 - 73) Ronchi, P., Colombo, S., Francolini, M., & Borgese, N. (2008) *J. Cell Biol.*, 181, 105–118.
 - 74) Pentcheva, T., Spiliotis, E.T., & Edidin, M. (2002) *J. Immunol.*, 168, 1538–1541.
-