

COPII 小胞による小胞体からのタンパク質選別輸送

佐藤 健

真核細胞内のオルガネラ間を結ぶ小胞輸送では、タンパク質の厳密な選別輸送が行われている。この小胞輸送の最も上流に位置するオルガネラが小胞体であり、主として COPII コートと低分子量 GTPase Sar1 によって形成される輸送小胞によって、さまざまな機能や構造をもったタンパク質が選別を受けて下流のオルガネラへと送り出されていく。当初は輸送小胞形成の開始を導くのが主な役割と考えられていた Sar1 であるが、筆者らの研究により積み荷タンパク質の分子選別と COPII 小胞への濃縮が Sar1 の GTP 加水分解サイクルによって行われていることが明らかとなった。本稿では出芽酵母を用いた筆者らの研究を中心に、COPII 小胞による小胞体からのタンパク質選別輸送メカニズムについて論じたい。

1. はじめに

真核生物の細胞内では、新たに合成された膨大な数と種類のタンパク質が正しく目的地へと運ばれ、また一旦目的地に到達したタンパク質も機能を果たしながらその局在を刻々と変化させている。このような細胞内のタンパク質輸送の中でも特に重要なものの一つが、オルガネラ間を小さな膜小胞等を介して結ぶ小胞輸送（メンブレントラフィック）である。小胞輸送は、供与オルガネラ膜からの輸送小胞の出芽、細胞内移動、標的オルガネラ膜への繫留/膜融合という一連の過程を経てタンパク質の選別輸送を行うシステムである。特に、細胞内膜系の半分以上を占める小胞体では、各オルガネラで機能するタンパク質や分泌タンパク質の合成が行われており、細胞内の全タンパク質の約3分の1が小胞体から下流のオルガネラへと送り出されている。そのため、小胞体ではさまざまな機能や構造をもったタンパク質が選別を受けて輸送されていく。小胞輸送で輸送担体となる輸送小胞は、コートタンパク質とよばれるタ

ンパク質複合体が低分子量 GTPase によって制御されながらオルガネラ膜上に集合し、「積み荷」となるタンパク質を取り込みながら膜を変形させることにより形成される。輸送の特異性を保つため、小胞輸送ルートごとにそれぞれ異なる種類のコートタンパク質と低分子量 GTPase が使い分けられており、小胞体からの輸送は COPII (coat protein complex II) とよばれるコートタンパク質が低分子量 GTPase である Sar1¹⁾によって制御されながら形成する COPII 小胞²⁾が一手に担っている (図1)³⁾。本稿では、筆者らの研究により明らかとなった COPII コートや Sar1 に

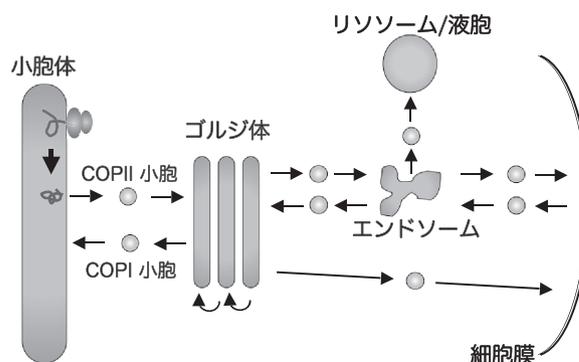


図1 オルガネラ間を結ぶ小胞輸送

ベルオキシソームを除くすべての単膜系細胞小器官は、直径50~100 nmの輸送小胞を介して物質のやりとりを行う小胞輸送とよばれるネットワークによって結ばれている。輸送小胞は被覆されるコートタンパク質の名前を冠したよび方をされ、小胞体からゴルジ体への輸送はCOPIIコートとよばれるコートタンパク質によって覆われたCOPII小胞が担っている。

東京大学大学院総合文化研究科 (〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1)

Selective protein export from the ER mediated by COPII-coated vesicles

Ken Sato (Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, 3-8-1, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan)

本総説は2009年度奨励賞を受賞した。

よって駆動される小胞体からの COPII 小胞形成とタンパク質選別輸送の分子メカニズムについて解説する。

2. 小胞体における COPII 小胞の形成

COPII 小胞の形成は、Sar1 に特異的なグアニンスクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor ; GEF) である Sec12 により Sar1 が GDP 結合型から GTP 結合型に変換されることによって開始される⁴⁾。GTP 結合型となった Sar1 は構造変化を起こして N 末端領域の両親媒性ヘリックスを分子の外に露出し、この領域を介して小胞体膜へと結合する⁵⁾。Sec12 は膜タンパク質であり、その局在は厳密に小胞体膜に限定されているため、Sar1 の結合も小胞体膜に限られている⁶⁾。

COPII 小胞の形成と積み荷タンパク質の取り込みについて図 2 を参照しながら解説する。COPII 小胞を被覆する COPII コートは膜表面を直接覆う Sec23/24 複合体と、その外層を覆う Sec13/31 複合体の二層によって構成されており、Sec23/24 複合体は主に積み荷タンパク質の選別、Sec13/31 複合体は小胞構造の形成に関与すると考えられている。GTP 結合型となって膜に結合した Sar1 は Sec23/24 複合体と Sec23 サブユニットを介して結合し、これと同時に主に Sec24 サブユニット側が積み荷タンパク質と結合する。積み荷タンパク質のうち膜タンパク質は、「輸送シグナル」とよばれる特定の amino 酸配列を細胞質側に呈示しており⁷⁾、この輸送シグナルを介して Sec24 サブユニットと直接結合する^{8,9)}。また、小胞体内腔の可溶性の積み荷タンパク質は、細胞質側のコートタンパク質と直接結

合することができないため、膜貫通型の積み荷タンパク質レセプター^{10,11)}を介して Sec24 サブユニットと結合する。このようにして、Sar1-Sec23/24-積み荷タンパク質からなる出芽前駆複合体 (prebudding complex) とよばれる複合体が小胞体膜上で形成される¹²⁾。この出芽前駆複合体どうしを Sec13/31 複合体が架橋していくことによって積み荷タンパク質を取り込んだ COPII 小胞が形成される。

X 線結晶構造解析から、Sec23/24 複合体は COPII 小胞の直径と同じ 60 nm の球面とほぼ同じ曲率で湾曲しており、膜と直接相互作用する面には多数の塩基性アミノ酸残基が露出していることが示されている¹³⁾。そのため、Sec23/24 は Sar1 や積み荷タンパク質との結合に加えて、酸性リン脂質を介して脂質膜とも直接結合している¹⁴⁾。また、Sec13/31 複合体はヘテロ四量体からなる棒状構造をしており、膜系の非存在下においても溶液中で格子状に自己集合して直径 60 nm 程度のバスケット様の中空構造体を形成することがクライオ電子顕微鏡により観察されている¹⁵⁾。これらのことから、出芽前駆複合体が形成されると Sec23/24 とリン脂質との相互作用により膜の局所的な湾曲が誘起され、それらを Sec13/31 が集合させることによって球状の COPII 小胞が形成されるものと考えられている。

3. 「ビルトイン GAP 活性」の謎

小胞体から形成された COPII 小胞は、次のコンパートメントであるゴルジ体と膜融合する前に COPII コートを解離 (脱コート) させる必要がある。小胞体を多く含んだ

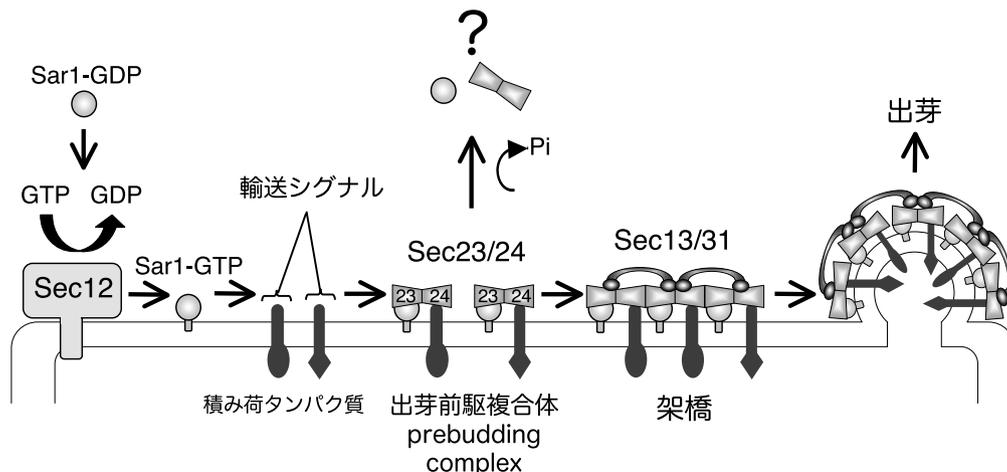


図 2 小胞体における COPII 小胞の形成と積み荷タンパク質取り込みのモデル

COPII 小胞の形成は、小胞体膜上のグアニンスクレオチド交換因子 Sec12 によって GTP 結合型となった Sar1 が膜に結合することによって開始される。GTP 型 Sar1 は小胞体膜上に Sec23/24 をリクルートし、主として Sec24 サブユニットが積み荷タンパク質と結合して出芽前駆複合体を形成する。この出芽前駆複合体どうしを Sec13/31 が架橋していくことによって COPII 小胞の形成と積み荷タンパク質の取り込みが行われる。しかし、Sec23 は Sar1 に対する GAP であるため、出芽前駆複合体が形成されると Sar1 が GTP を加水分解して複合体が解離してしまう。

出芽酵母のミクロソーム画分を用いて GTP の非加水分解アナログである GMP-PNP や GTP γ S 存在下で試験管内 COPII 小胞形成反応を行うと、COPII コートに被覆されたままの COPII 小胞が形成される²⁾。このことから、当初は Sar1 の GTP 加水分解は COPII 小胞の形成自体には必須ではなく、脱コートのステップで機能していると考えられていたのだが、この仮説には大きな疑問があった。

一般に低分子量 GTPase は、GEF による GDP 結合型から GTP 結合型への変換と、GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein; GAP) による GTPase 活性の促進によって GDP 結合型に戻るという二つの状態をサイクリックに行き来することによって、さまざまな生体反応を調節している。多くの低分子量 GTPase は GTP 結合型に変換されるとエフェクターとよばれる因子と結合して機能を発揮し、その後適切なタイミングで GAP と相互作用することにより GTP が加水分解されて GDP 結合型に戻ると同時にエフェクターが解離する。Sar1 の場合、エフェクターに相当するのは Sec23/24 複合体であるが、Sar1 と直接結合する Sec23 サブユニットは Sar1 に対する GAP 活性をもつ¹⁶⁾。つまり、Sec23/24 複合体は GAP 活性が「ビルトイン」されたエフェクター分子ということになる。そのため、出芽前駆複合体が形成されるのと同時に Sar1 の GTP 加水分解が起こり、Sar1 と Sec23/24 が膜から解離して COPII 小胞の形成が中断されてしまう (図 2)。実際、GMP-PNP 存在下でリポソーム上に形成させた出芽前駆複合体は安定に保持されるのに対して、GTP 存在下では速やかに解離が起こる¹⁷⁾。これらのことから、Sar1 の GTP 加水分解は脱コートよりも前の出芽前駆複合体が形成された段階で既に起こっていることになる。出芽前駆複合体は COPII 小胞の形成完了までどのようなメカニズムで保持されているのであろうか？ また、この段階における Sar1 の GTP 加水分解にはどのような役割があるのだろうか？ この問題はこの分野における大きな謎の一つとして残っていた。

4. Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる 積み荷タンパク質の選別と濃縮

この謎を解くためには、出芽前駆複合体の形成と解離の過程における Sar1 の GTP 加水分解を詳細に解析する必要がある。ところが、ミクロソーム画分を用いた試験管内 COPII 小胞形成反応では多種の GTPase が混在しているため、Sar1 の GTP 加水分解のみを切り離して検出することができなかった。そこで筆者らは、積み荷となる膜タンパク質を再構成したプロテオリポソームと精製した COPII コートと Sar1 を用いて、COPII 小胞の形成反応を必要最小限の精製因子のみにより再現する「完全」再構成系を構築した^{18,19)}。さらにこの実験系において、積み荷タンパク

質を CFP で蛍光標識し、Sec23/24 を YFP で蛍光標識することにより、CFP-YFP 間の FRET シグナルの変化を指標とした積み荷タンパク質と Sec23/24 との結合・解離の様子と、Sar1 の自家蛍光変化を指標とした GTP の加水分解をリアルタイムでモニターして解析を行った (図 3)²⁰⁾。

積み荷タンパク質のモデルとしては COPII 小胞にモノマーで取り込まれるタイプのもと、複合体を形成して取り込まれるタイプの 2 種類を用いた。SNARE は輸送小胞上の v-SNARE と、ターゲットとなるオルガネラ膜上の t-SNARE との間の相互作用によって膜融合を引き起こす因子であり、v-SNARE である Bet1 はモノマーとして COPII 小胞に取り込まれる。また、t-SNARE は Sed5/Sec22/Bos1 複合体から構成され、COPII 小胞に取り込まれてゴルジ体へと輸送される。これらの SNARE のうち、まず Bet1 を用いて解析を行ったところ、Sar1 の GTP 加水分解後、Sec23/24 と Bet1 との結合はすぐに解離するのではなく、ごく短時間の間保持されていることが明らかとなった (図 3 b)。この反応を Sec12 存在下で行うと Sec23/24 の Bet1 からの解離が観察されなくなることから (図 3c)、出芽前駆複合体中の Sar1 が Sec23 の GAP 活性により GTP を加水分解して膜から解離してしまうものの、膜上の Sec12 によって速やかに GTP 結合型に再活性化された Sar1 が Sec23/24-Bet1 複合体に再結合し、この過程が繰り返されることによって Sec23/24-積み荷タンパク質間の結合が安定に保持されていると考えられる。

また、t-SNARE 複合体 (Sed5/Sec22/Bos1) 中の各サブユニットはそれぞれが輸送シグナルとなる配列を呈示しており、サブユニット単独 (Sec22) では Sec23/24 との結合が弱く、Sar1 の GTP 加水分解と同時に Sec23/24 の解離が起こるため出芽前駆複合体が安定に保持されない (図 3d)。しかし、複合体を形成すると、Sar1 が GTP を加水分解しているにもかかわらず、Sec23/24 と Sed5/Sec22/Bos1 複合体との結合が維持される。さらに GDP 存在下においても Sec23/24 が Sed5/Sec22/Bos1 複合体へゆっくりと結合していくようすが観察される (図 3e)。小胞体膜上には高次構造の形成を終えて輸送を待つ完成品の複合体だけではなく、複合体形成途上のサブユニットも多数混在しているはずである。輸送シグナルと結合する Sec24 サブユニットには少なくとも三つの輸送シグナル結合部位が同定されており、それぞれが異なったタイプの輸送シグナルと結合することが明らかになっている^{8,9)}。そのため、複合体を形成した状態で輸送される必要がある積み荷タンパク質は、複合体中の各サブユニットがそれぞれ輸送シグナルとなる配列を呈示し、すべてのサブユニットが集合した状態で最も Sec23/24 との結合が強くなるようにデザインされているようである。そのため、複合体の形成が完了していない

個々のサブユニットのみでは、出芽前駆複合体が形成されたとしても安定に保持されないため COPII 小胞への取り込みの効率が低下する (図 4)。また前述のように、Sec23/24 は酸性リン脂質とも結合するため、Sec23/24 の膜への結合には積み荷タンパク質は必須ではない。積み荷タンパク質を含まないリポソーム膜からの Sec23/24 の解離を散乱光強度変化により検出し、Sar1 の GTP 加水分解のタイムコースと比較したところ、この場合も Sar1 の GTP 加水分解と同時に Sec23/24 の膜からの解離が起こっていた²⁰⁾。積み荷タンパク質を含まない Sar1-Sec23/24 複合体について

でも膜上で安定に保持されないため、COPII 小胞に取り込まれにくいようである。つまり、Sar1 は GTP 加水分解を繰り返すことによって、輸送に不適切な積み荷タンパク質を排除する「校正能」を発揮するとともに、積み荷タンパク質の COPII 小胞への濃縮も同時に行っているというメカニズムが浮かび上がってきた。その後、生細胞中でも光褪色後蛍光回復法 (FRAP) を用いた解析から、小胞体膜への Sar1 の結合、解離のサイクルは、Sec23/24 よりも 3 倍程度速いことが報告された²¹⁾。また同様の結果がゴルジ体膜上における低分子量 GTPase Arf1 と COPI (coat protein complex I) コートについても報告されていることから²²⁾、低分子量 GTPase による積み荷タンパク質の選別と濃縮は、輸送小胞形成における普遍的なメカニズムである可能性が高い。

5. 人工脂質平面膜上に再現した COPII 小胞形成過程の可視化

上記のような試験管内完全再構成系と FRET を組み合わせた実験から、Sar1 の GTP 加水分解サイクルによって COPII 小胞への積み荷タンパク質の選別と濃縮が行われていることが強く示唆された。実際、積み荷タンパク質の選別については、GMP-PNP 存在下で形成させた COPII 小胞には、GTP 存在下の時と比べて複合体の形成が不完全な状態の積み荷タンパク質が多く取り込まれてしまうことが筆者らの実験で示されている²³⁾。ところが、積み荷タンパク質の濃縮についての検証をするためには、輸送小胞 1 個あたりに取り込まれた積み荷タンパク質の分子数を定量する必要がある。しかし、それを検出するための実験系がな

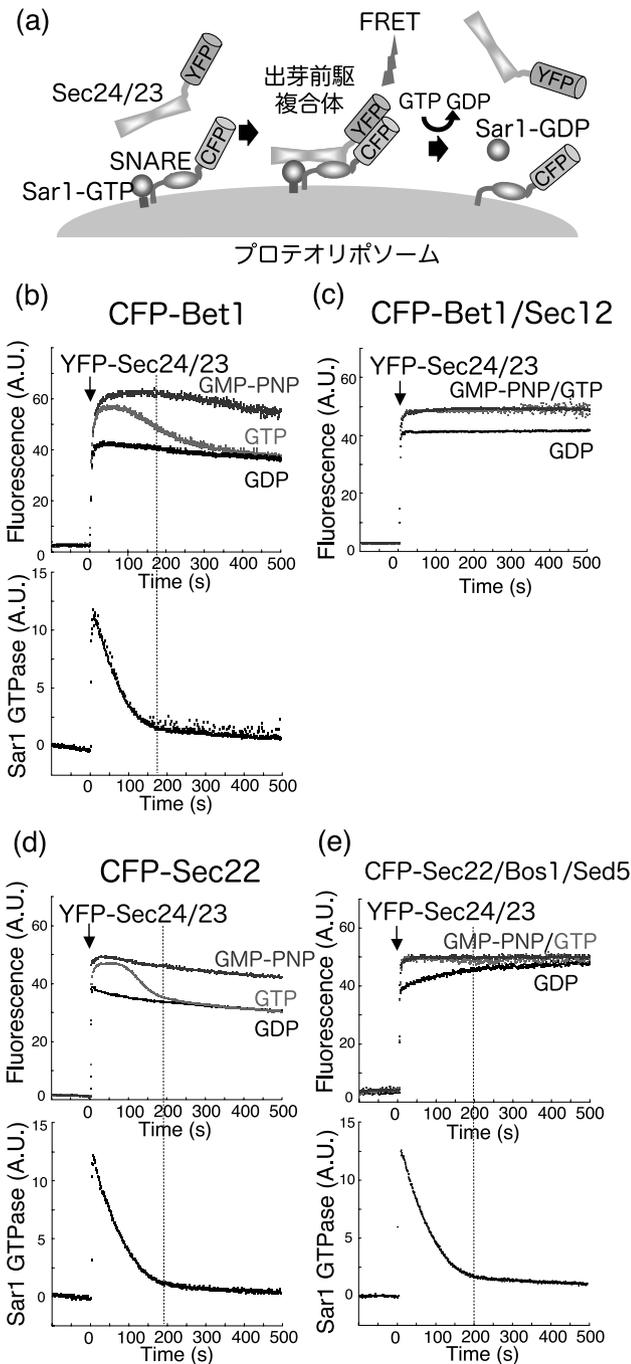


図 3 出芽前駆複合体の解離にともなう Sar1 の GTP 加水分解の解析

(a) CFP で蛍光標識した積み荷タンパク質をプロテオリポソームに再構成し、YFP で蛍光標識した Sec23/24 コートタンパク質との相互作用を FRET により検出する実験系。(b) CFP-Bet1 を再構成したプロテオリポソームにあらかじめ GTP を結合させた Sar1 を加えておき、ここに YFP-Sec24/23 を添加すると、出芽前駆複合体の形成にともなう一時的な FRET シグナルの上昇が観察されるもの、Sar1 の GTP 加水分解にともなう複合体の解離によって、FRET シグナルが徐々に減少していく様子が観察される。このときの Sar1 の GTP 加水分解のタイムコースを Sar1 のトリプトファン自家蛍光変化を指標として検出すると、FRET シグナルの減少が完了する前に、Sar1 の GTP 加水分解が完了してしまっている。このことから、Sec23/24 の Bet1 からの解離は Sar1 の GTP 加水分解と同時にではなく、Sar1 が GTP を加水分解したのち、少し遅れて Sec23/24 の解離が起こっていることになる。(c) Sec12 存在下では GTP 存在下においても Sec23/24 の Bet1 からの解離が見られなくなる。(d) t-SNARE 複合体 (Sed5/Sec22/Bos1) 中の Sec22 サブユニット単独では、Sar1 の GTP 加水分解と同時に Sec23/24 の解離が起こる。(e) 完全な複合体を形成した t-SNARE では Sar1 の GTP 加水分解後も Sec23/24 との結合が保持される。

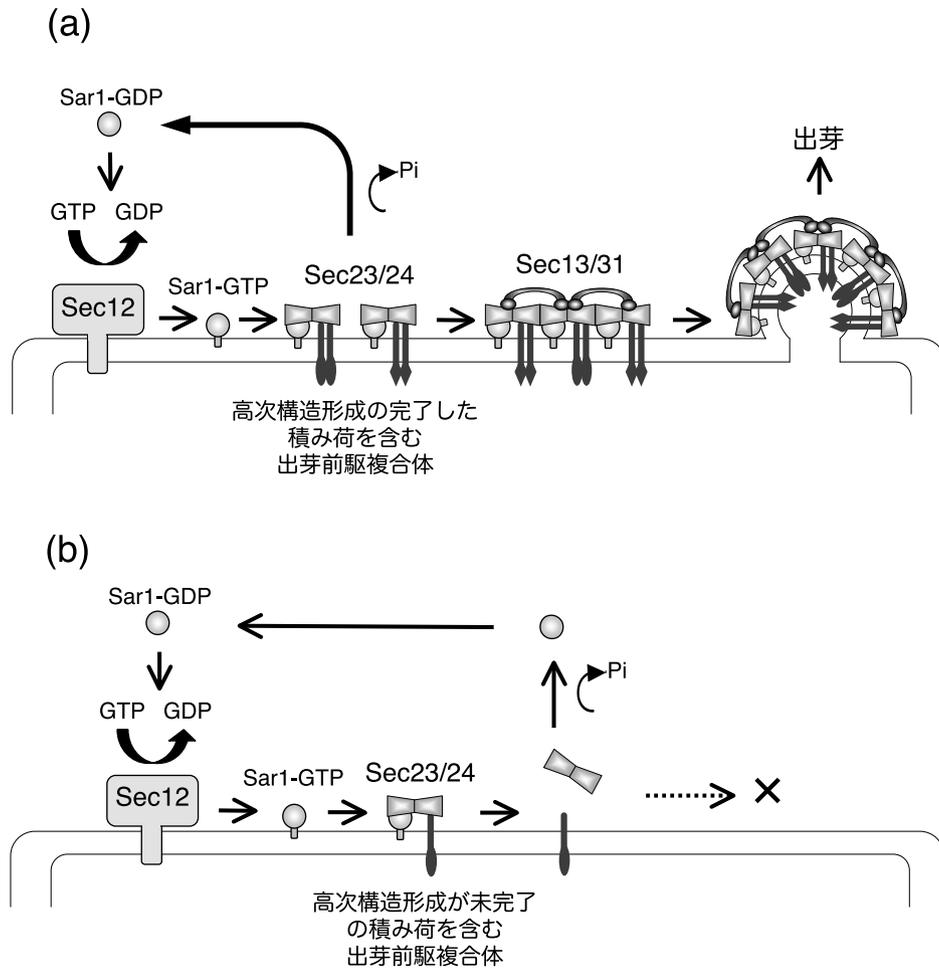


図4 COPII小胞形成過程におけるSar1のGTP加水分解の役割

(a) 小胞体膜上で出芽前駆複合体が形成されると、Sec23のGAP活性によってSar1はGTPを加水分解して出芽前駆複合体から解離してしまうものの、高次構造の形成が完了した適切な積み荷タンパク質とSec23/24との親和力は強いため、この結合は少なくとも短時間は保持される。その間、Sec12によって再活性化されたSar1の速やかな出芽前駆複合体への再結合が起こることによってSec23/24と積み荷タンパク質との結合が安定に保持される。(b) Sec23/24は高次構造の形成が完了していない積み荷タンパク質やリン脂質のみとの親和力は弱いため、Sar1のGTP加水分解と同時にSec23/24の解離が起こりCOPII小胞の形成が中断される。

かったため、当時、細胞内のどの小胞輸送経路においても、輸送小胞1個あたりに取り込まれる積み荷タンパク質の数は何分子なのか?というごく素朴な問いに答えられていなかった。

そこで筆者らは、1分子観察用の全反射顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜にCOPII小胞の形成反応を再構成し、COPII小胞形成過程における蛍光標識した積み荷タンパク質のダイナミクスをリアルタイムでイメージングする手法の開発を行った(図5)²⁴。Sec12と蛍光標識したBet1を人工脂質平面膜に再構成し、GTP存在下でSar1、Sec23/24、およびSec13/31を添加すると、Bet1が集めた蛍光輝点が膜上に数多く形成されるのが観察される。このとき、人工脂質平面膜の膜厚を厚くしておく、形成され

たCOPII小胞が膜からくびり切られるのが防がれるため、遊離する直前のCOPII小胞が膜上に蓄積し、個々のCOPII小胞が蛍光輝点として観察される。これらの輝点の蛍光強度からCOPII小胞1個あたりに取り込まれたBet1分子の数を見積もることができる。形成された一つ一つの輝点について蛍光強度を測定し、その分布を統計的に解析したところ、ガウシアン分布を示すことから、どの輝点にもほぼ均一な量のBet1分子が含まれていると考えられる(図6b)。また、形成される輝点の蛍光強度は、あらかじめ平面膜に再構成しておくBet1の濃度に比例して強くなっていくものの、ある濃度で飽和してしまう。つまり、COPII小胞1個あたりに取り込まれるBet1の数には限界があり、蛍光強度から見積もると一つの輝点につきBet1が最大で

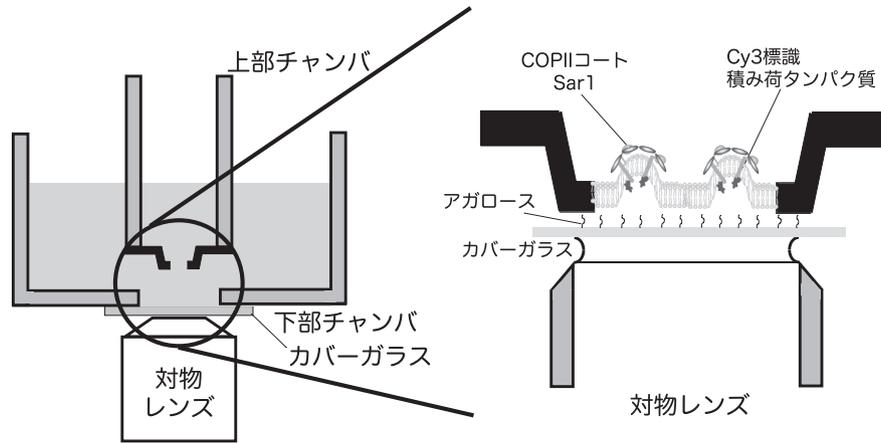


図 5 COPII 小胞形成の完全再構成系を顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上に再現し、反応過程における蛍光標識した積み荷タンパク質のダイナミクスを解析する実験系。

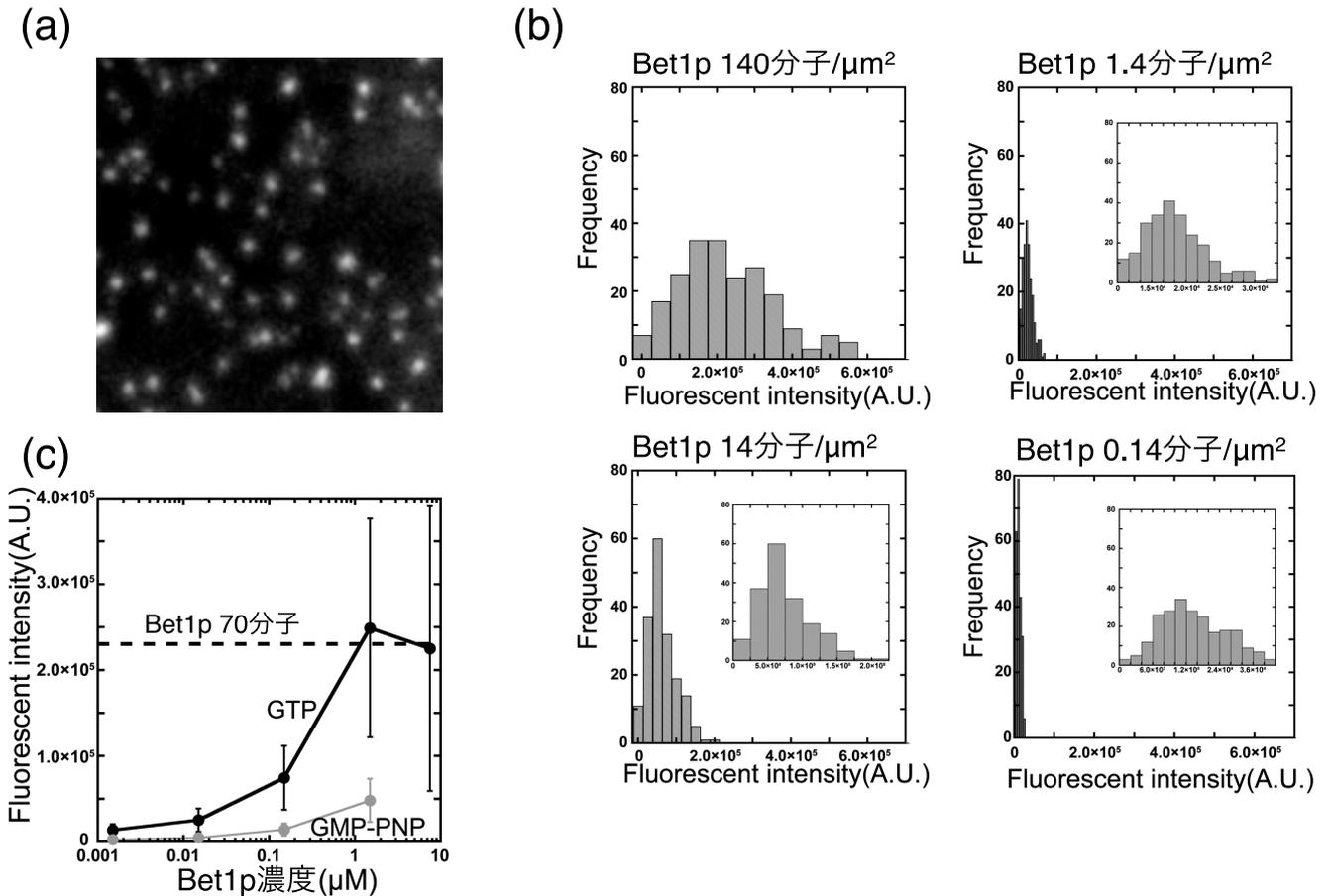


図 6 COPII 小胞形成にともなう積み荷タンパク質の集積

(a) 人工脂質平面膜から遊離する直前の COPII 小胞に取り込まれている積み荷タンパク質 (Bet1) を蛍光輝点として定量的に解析することができる。(b), (c) 膜上に形成された輝点の蛍光強度の分布。ガウシアン分布を示すことから、各輝点に含まれる Bet1 分子の数はほぼ均一と考えられる。人工脂質平面膜に再構成しておく Bet1 の濃度が高くなるのにしたがって COPII 小胞に取り込まれる Bet1 の数が増加していくものの、70 分子程度で飽和してしまう。

約70分子まで取り込まれると見積もられた(図6c)。積み荷タンパク質はSec23/24との結合によってCOPII小胞へと取り込まれることから、COPII小胞上のSec23/24分子の数が取り込む積み荷タンパク質の分子数を規定していることになる。Sec13/31が自己集合して形成する格子は連結部分がフレキシブルなため、条件により立方八面体あるいは二十・十二面体構造を取ることが確認されている¹⁵⁾。この場合COPII小胞1個あたり、それぞれ48分子、120分子のSec23/24複合体を含むことになり、Sec23/24はBet1と1対1で結合することから⁸⁾、取り込まれるBet1分子の数の最大値もこの範囲内であると考えられ実験結果とよく一致する。同様の実験をGMP-PNP存在下で行ったところ、形成される輝点中に含まれるBet1分子の数がGTP存在下のときと比べて著しく低くなっていることが明らかとなった。つまり、Sar1によるGTP加水分解サイクルが回らないとCOPII小胞1個あたりに取り込まれる積み荷タンパク質の数が減少するということになり、試験管内完全再構成系による実験から示唆されたメカニズムを強く支持するものである。これまで輸送小胞の形成過程の様子は電子顕微鏡による固定されたスナップショットという静止した情報しか得られないという限界があったものの、上記のようなCOPII小胞形成の素過程をリアルタイムで可視化することにより、反応に関与する因子群のダイナミクスについての詳細な情報が得られることが期待できる。

6. 小胞体に残留するタンパク質の選別

COPII小胞の形成過程において、積み荷タンパク質がもつ輸送シグナルにCOPIIコートが直接、あるいは受容体を介して間接的に結合することによって輸送すべきタンパク質の分子選別が行われているという考え方は現在広く受け入れられている。しかし、小胞体にとどまって機能するタンパク質はどのようなメカニズムによって小胞体に残留するのであろうか。単に輸送シグナルをもっていないというだけでは、COPIIコートとSar1による積極的な積み出しを受けないだけで、効率は低いもののCOPII小胞に無作為に取り込まれてゴルジ体へと輸送されてしまうものが出てくる²⁵⁾。その場合、誤ってゴルジ体へと漏れ出てしまったタンパク質は、「動的逆送機構」とよばれるメカニズムによって小胞体へと戻されることが明らかになっている²⁶⁾。小胞体とゴルジ体との間では双方向に小胞輸送が行われており、ゴルジ体から小胞体への輸送はCOPIコートと低分子量GTPase Arf1によって形成されるCOPI小胞が担っている(図1)。小胞体タンパク質は直接、あるいは受容体を介してCOPIコートと結合するための輸送シグナルをもっており、誤ってゴルジ体へと漏れ出てしまったタンパク質はCOPI小胞に選択的に取り込まれて小胞体へと

送り返される。この時、糖鎖修飾を受ける小胞体タンパク質は、ゴルジ体へと漏れ出ることによってゴルジ体特異的な糖鎖修飾を受けるため、動的逆送機構によって小胞体に戻されたとしても漏れ出てしまった履歴がタンパク質上に残る。ところが、小胞体に局在するいくつかの膜タンパク質については、ゴルジ体における糖鎖修飾をほとんど受けないことが示されており²⁷⁾、そもそも小胞体から漏れ出ることがないものも存在していると考えられている。そのためには、小胞体タンパク質(非積み荷タンパク質)がCOPII小胞に取り込まれないように排除を受ける「静的残留機構」が存在している必要があるものの、そのメカニズムについては関与する因子も含めてまったく不明であった。

筆者らはこの静的残留機構のメカニズムを調べるため、前述の人工脂質平面膜上でのCOPII小胞形成反応において、積み荷タンパク質と非積み荷タンパク質をそれぞれ別々の蛍光色素で標識し、両者の挙動を同時に観察することによって解析を行った²⁴⁾。前述のように人工脂質平面膜の膜厚を厚くしておく、形成されたCOPII小胞が膜からくびり切られないため、COPII因子を添加してしばらく経つと積み荷タンパク質が膜上で集積してクラスターを形成する。このクラスター中の非積み荷タンパク質の密度を蛍光強度から見積もると、バックグラウンドと比べて70%程度に低下していることが分かった。このことから、積み荷タンパク質が形成するクラスター中から非積み荷タンパク質が排除を受けていることになり、少なくともある程度の静的残留機構が機能していることになる。COPIIコートのうち膜と直接結合して覆っているのはSar1-Sec23/24複合体であり¹³⁾、直径60nmのCOPII小胞の場合1個あたり48分子のSar1-Sec23/24複合体が覆っている。Sar1-Sec23/24複合体の結晶構造から1分子あたりの表面積が算出されており、48分子のSar1-Sec23/24複合体が直径60nmの球面を覆うと、その表面積の約80%が覆われる計算になり²⁸⁾、積み荷タンパク質が膜タンパク質の場合、覆われる面積はさらに広がる。つまり、積み荷タンパク質と結合したSar1-Sec23/24複合体が膜上でクラスターを形成することにより、形成されるCOPII小胞の表面がほぼ覆い尽くされ、結果的にSar1-Sec23/24複合体とアフィニティーのない非積み荷タンパク質は物理的に取り込まれるスペースがなくなるというのが静的残留機構の一つの説明となる。実際、積み荷タンパク質の取り込み効率の低いGMP-PNP存在下で同様の実験を行うと、非積み荷タンパク質が排除される効率が低くなることが確認されている²⁴⁾。このメカニズム以外にもCOPII小胞から非積み荷タンパク質を積極的に排除するための特別な分子装置が存在している可能性も残されているものの、少なくともCOPII小胞の形成に必要な最小限の因子のみでもある程度の静的残留機構が機能しているようである。

7. COPII 小胞形成において残されている課題

COPII 小胞による輸送反応については試験管内再構成系がいち早く構築され、反応に関与するミニマムコンポーネントの同定や、それらの構造生物学的解析も進んでいることから、小胞輸送経路の中では最もよく理解が進んでいるステップと言っていいだろう。しかし、未解明のまま残されている謎が多いのも事実で、そのうちのいくつかは他の小胞輸送経路と共通する課題でもある。

(1) COPII 小胞が形成される部位

免疫蛍光染色や蛍光タンパク質を用いた解析から、酵母においても高等真核生物においても COPII コートは小胞体膜上にドット状に局在している²⁹⁻³¹。また、免疫電子顕微鏡による解析でも小胞体膜上の特定の部位に COPII コートが集積していることが観察されている³²。これらのことから、COPII 小胞の形成は小胞体膜上のランダムな位置で起こるのではなく、小胞体出口部位 (ER exit site) とよばれる特定の部位でのみ行われると考えられている。この小胞体出口部位が消失してしまう変異株がメタノール資化性酵母から取得され、Sec16 をコードする遺伝子内に生じた変異が原因であることが明らかにされている³³。Sec16 は酵母からヒトに至るまでよく保存され、生育に必須の因子であるものの、試験管内における COPII 小胞の形成には必須ではない。しかし、COPII コートと直接結合することや³⁴、試験管内における COPII 小胞の形成効率を高めることなどから³⁵、この過程と密接に関わっていると考えられている。これまでのところ、Sec16 が小胞体膜上で集合して COPII コートの足場となることによって小胞体出口部位が形成されるというモデルが提出されているものの、小胞体膜上の何が Sec16 の足場となっているのか、小胞体膜上のこういった部位に形成されるのかといった問題については明らかになっていない。

(2) COPII 小胞の膜からの脱離

細胞膜からのエンドサイトーシスの際に形成されるクラスリン小胞は、膜からの脱離 (くびり切り) に高分子量 GTPase であるダイナミンが必須である。しかし、COPII 小胞の膜からの脱離にはダイナミン様分子の関与は知られておらず、出芽した COPII 小胞が小胞体膜から脱離するのに特別な因子は必要ないと長い間考えられていた。ところが、Sar1 の N 末端領域の両親媒性ヘリックス中に変異を導入すると、COPII 小胞の出芽は起こるものの、膜からの脱離が起こらないことが最近示された³⁶。このことから、COPII 小胞の脱離には Sar1 の N 末端領域の両親媒ヘリックスが深く関与しているようである。これは、両親媒ヘリックス中の極性残基が特定の側面に並んでいることか

ら、このドメインは膜を貫通するのではなく、脂質二重層の外葉のみに結合することにより、膜の曲率を局所的に変化させて COPII 小胞の膜からの脱離を促しているというモデルが提唱されている。さらに、高等真核生物においては、Sar1 の GTP 加水分解が COPII 小胞の小胞体膜からの脱離の効率を上げることが示されており³⁷、今後の詳細な解析が期待される。

(3) 巨大積み荷タンパク質の輸送

小腸粘膜細胞の小胞体ではリポタンパク質の一種であるカイロミクロンが直径 400~1200 nm 程度の巨大分子として合成される。また、高等真核細胞においてプロコラーゲンは長さ 300 nm 程度の巨大棒状分子として小胞体で合成される。これらの巨大分子は小胞体から小胞輸送経路に乗って細胞外へと分泌されるのだが、試験管内再構成系で形成させた COPII 小胞の直径は 50~70 nm であり、通常の COPII 小胞で輸送されるには明らかに大きすぎる。最近の報告から、試験管内において小胞体画分からカイロミクロンを取り込んだ巨大な構造体が形成されることが示されており、その構造体には COPII コートに加え、通常の積み荷タンパク質も含まれていることが明らかになっている³⁸。さらに、哺乳類細胞では Sar1A と Sar1B の少なくとも 2 種類の Sar1 が存在することが知られており、このうち Sar1B の変異によってカイロミクロンの分泌異常が起こり、カイロミクロン停滞病/アンダーソン病が誘発されることが報告されている^{39,40}。また、プロコラーゲンは小胞体出口部位から通常の積み荷タンパク質とは別に、Sar1 依存的に少なくとも Sec24 を含んだ構造体を介して積み出されることが示されている⁴¹。これらのことから、巨大分子の小胞体からの積み出しに何らかの形で COPII コートや Sar1 が関与しているようである。しかし、細胞内において COPII コートが結合した巨大な輸送体が観察された例はこれまでのところなく、今後のさらなる解析が待たれる。

(4) COPII コートと小胞体品質管理

小胞体はタンパク質合成の場であり、高次構造の形成に失敗したタンパク質は、小胞体関連分解とよばれるメカニズムによって分解を受ける。この小胞体関連分解に COPII 小胞の形成に関わる因子群が関与していることが以前より示唆されている。小胞体内腔で合成に失敗した可溶性タンパク質が小胞体関連分解を受けるには、COPII 小胞により一度ゴルジ体へと移行した後、再び COPII 小胞によって小胞体へと戻されることが必須であることが示されているものの^{42,43}、その理由については今のところ不明である。また、小胞体において合成に失敗した膜タンパク質は、小胞体膜上の特定のサブコンパートメントに隔離されたのちに

分解を受ける。この異常膜タンパク質の隔離にも COPII 小胞の形成に関わる因子群が関与することが示唆されているものの⁴⁴⁾、その詳細なメカニズムの解明には至っていない。

8. おわりに

以上述べてきたように、筆者らによる生化学的解析や、蛍光イメージングを用いたアプローチにより、COPII 小胞形成過程における低分子量 GTPase Sar1 の役割や、積み荷タンパク質選別のメカニズムについて徐々に明らかとなってきた。しかし、上記のような重要な課題も数多く残されている。また、上に挙げた未解決問題は COPII 小胞の形成段階に絞ったものであり、小胞体から脱離したあとの COPII 小胞についても多くの疑問が残されている。例えば、どの段階でどのようなメカニズムによって COPII コートが脱コートされるのかといった問題や、可溶性積み荷タンパク質を積み出すための膜貫通型受容体がゴルジ体においてどのようなメカニズムで積み荷タンパク質を解離するのかといった疑問については依然として答えられていない。今後は、これらの残された課題を中心に、小胞体からの選別輸送の分子メカニズムについて明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、筆者が研究員として理化学研究所中野生体膜研究室に在籍して、同研究室に蓄積された先行研究をもとに行ったものである。中野明彦先生をはじめ、生体膜研究室の皆様には心から感謝いたします。また、本研究の一部は大阪大学産業科学研究所の野地博行先生、田端和仁先生との共同研究として行ったものであり、この場を借りて感謝いたします。

文 献

- Nakano, A. & Muramatsu, M. (1989) *J. Cell Biol.*, **109**, 2677–2691.
- 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.
- Sato, K. & Nakano, A. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2076–2082.
- Barlowe, C. & Schekman, R. (1993) *Nature*, **365**, 347–349.
- Huang, M., Weissman, J.T., Beraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I.A., & Balch, W.E. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 937–948.
- Sato, M., Sato, K., & Nakano, A. (1996) *J. Cell Biol.*, **134**, 279–293.
- Barlowe, C. (2003) *Trends Cell Biol.*, **13**, 295–300.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., & Goldberg, J. (2003) *Cell*, **114**, 483–495.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003) *Cell*, **114**, 497–509.
- Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., & Hauri, H.P. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 330–334.
- Belden, W.J. & Barlowe, C. (2001) *Science*, **294**, 1528–1531.
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M., & Schekman, R. (1998) *Nature*, **391**, 187–190.
- Bi, X., Corpina, R.A., & Goldberg, J. (2002) *Nature*, **419**, 271–277.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., & Yeung, T. (1998) *Cell*, **93**, 263–275.
- Stagg, S.M., LaPointe, P., Razvi, A., Gurkan, C., Potter, C.S., Carragher, B., & Balch, W.E. (2008) *Cell*, **134**, 474–484.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., & Schekman, R. (1993) *Science*, **259**, 1466–1468.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 531–537.
- Sato, K. & Nakano, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 1330–1335.
- Sato, K. & Nakano, A. (2005) *Methods Enzymol.*, **404**, 83–94.
- Sato, K. & Nakano, A. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 167–174.
- Forster, R., Weiss, M., Zimmermann, T., Reynaud, E.G., Verissimo, F., Stephens, D.J., & Pepperkok, R. (2006) *Curr. Biol.*, **16**, 173–179.
- Presley, J.F., Ward, T.H., Pfeifer, A.C., Siggia, E.D., Phair, R. D., & Lippincott-Schwartz, J. (2002) *Nature*, **417**, 187–193.
- Sato, K. & Nakano, A. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3055–3063.
- Tabata, K.V., Sato, K., Ide, T., Nishizaka, T., Nakano, A., & Noji, H. (2009) *EMBO J.*, **28**, 3279–3289.
- Malkus, P., Jiang, F., & Schekman, R. (2002) *J. Cell Biol.*, **159**, 915–921.
- Pelham, H.R. (1996) *Cell Struct. Funct.*, **21**, 413–419.
- Masaki, R., Yamamoto, A., & Tashiro, Y. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 16939–16944.
- Fath, S., Mancias, J.D., Bi, X., & Goldberg, J. (2007) *Cell*, **129**, 1325–1336.
- Stephens, D.J., Lin-Marq, N., Pagano, A., Pepperkok, R., & Paccard, J.P. (2000) *J. Cell Sci.*, **113** (Pt 12), 2177–2185.
- Watson, P., Townley, A.K., Koka, P., Palmer, K.J., & Stephens, D.J. (2006) *Traffic*, **7**, 1678–1687.
- Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., & Riezman, H. (2009) *Traffic*, **10**, 186–200.
- Bannykh, S.I., Rowe, T., & Balch, W.E. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 19–35.
- Connerly, P.L., Esaki, M., Montegna, E.A., Strongin, D.E., Levi, S., Soderholm, J., & Glick, B.S. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1439–1447.
- Gimeno, R.E., Espenshade, P., & Kaiser, C.A. (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1815–1823.
- Supek, F., Madden, D.T., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 1029–1038.
- Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005) *Cell*, **122**, 605–617.
- Bielli, A., Haney, C.J., Gabreski, G., Watkins, S.C., Bannykh, S.I., & Aridor, M. (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 919–924.
- Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T., & Mansbach, C.M. 2nd (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 415–427.
- Jones, B., Jones, E.L., Bonney, S.A., Patel, H.N., Mensenkamp, A.R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., Meadows, N., Quattrone, A., Islam, S.A., Naoumova, R.P., Angelin, B., Infante, R., Levy, E., Roy, C.C., Freemont, P.S., Scott, J., & Shoulders, C.C. (2003) *Nat. Genet.*,

- 34, 29-31.
- 40) Fromme, J.C., Ravazzola, M., Hamamoto, S., Al-Balwi, M., Eyaid, W., Boyadjiev, S.A., Cosson, P., Schekman, R., & Orci, L. (2007) *Dev. Cell*, **13**, 623-634.
- 41) Stephens, D.J. & Pepperkok, R. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 1149-1160.
- 42) Caldwell, S.R., Hill, K.J., & Cooper, A.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23296-23303.
- 43) Vashist, S., Kim, W., Belden, W.J., Spear, E.D., Barlowe, C., & Ng, D.T. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 355-368.
- 44) Fu, L. & Sztul, E. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 157-163.
-