



**酵母液胞オルガネラ膜融合の *in vitro* 完全再構成**

1. はじめに

真核細胞は、細胞周期や細胞外環境など生育状態に応じて、細胞内オルガネラ膜の形態をダイナミックに変化させている。このオルガネラ膜動態は、個々のオルガネラ生命機能とも密接に関係し、また本ミニレビューのトピックである「膜融合」は、「膜出芽・分裂」と共に「オルガネラ膜動態」に必須かつ根源的な生体反応といえる。細胞内「膜融合」の研究は、1970年代より Schekman らの酵母“sec”変異株スクリーニングに代表される遺伝学的解析、そして Rothman らの哺乳類ゴルジ体 *in vitro* 輸送アッセイなどのオルガネラ生化学的手法により大きく進展してきた<sup>1)</sup>。そしてこれまで、NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor),  $\alpha$ -SNAP (soluble NSF association protein), SNARE (SNAP receptor), SM (Sec1/Munc18) ファミリータンパク質など、「膜融合」に関わる多くのタンパク質因子が同定され<sup>1)</sup>、また近年ではこれらタンパク質因子に加え、ホ

スホイノシチド、ステロール、ジアシルグリセロール (DAG)、ホスファチジン酸 (PA) といった脂質因子も同定され、その役割が明らかになりつつある<sup>2)</sup>。本ミニレビューでは、「オルガネラ膜融合」の中でも Wickner らによって 1990年代から多くの成果を挙げてきた、「出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 液胞融合」を取り上げ<sup>3)</sup>、特に筆者と Wickner らが成功した「*in vitro* 完全再構成系」による最新の成果を中心に概説する<sup>4)</sup>。

2. 酵母液胞オルガネラ膜融合と SNARE 仮説

酵母液胞は動物細胞のリソソームに相当するオルガネラで、「膜融合」と「膜分裂」を繰り返し、その形態を制御している。Wickner らは、酵母液胞をモデルに「オルガネラ継承」を研究する中、酵母細胞より生化学的に単離精製した液胞オルガネラを用いて「*in vitro* 液胞膜融合アッセイ」を開発した<sup>5)</sup>。そして、特異的阻害剤の添加など、様々な反応条件下で膜融合アッセイを行い、液胞融合の必須因子を次々と同定してきた<sup>3)</sup>。タンパク質因子では、①液胞 SNARE (Vam3p, Vti1p, Vam7p, Nyv1p), ②SNARE シャペロン (Sec17p ( $\alpha$ -SNAP ホモログ), Sec18p (NSF ホモログ), HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting complex, SM タンパク質 Vps33p がサブユニットの一つ), ③Rab GTPase (Ypt7p), 脂質因子では、①エルゴステロール (ERG), ②DAG, ③ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI(3)P), そして④ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI(4,5)P<sub>2</sub>) などである (図1)。また、酵母1遺伝子破壊ライブラリーを利用した「液胞形態変化」の *in vivo* 網羅的スクリーニングでは、同定因子欠損酵母の多くで、液胞断片化が観察された<sup>6)</sup>。つまり、酵母液胞融合では、上記の多種多様な因子群が協同的に膜融合を引き

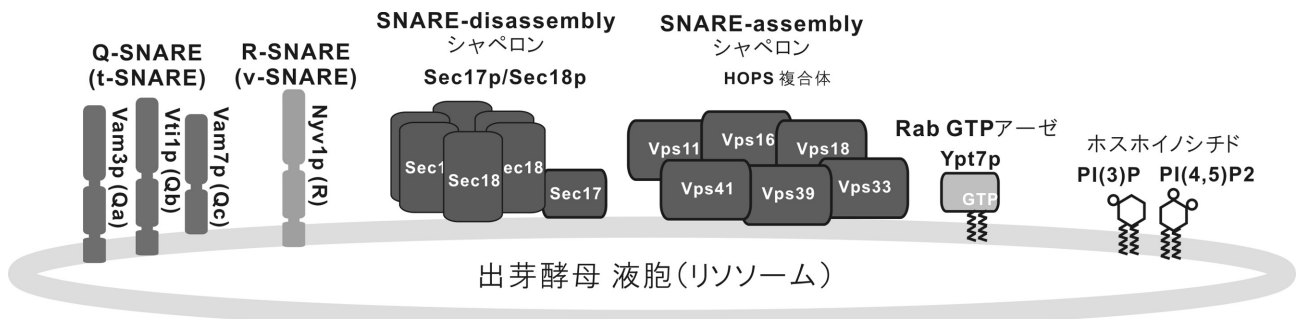


図1 酵母液胞オルガネラ膜融合に関与するタンパク質因子・脂質因子  
液胞局在の3Q-SNARE (Vam3p, Vti1p, Vam7p) および R-SNARE (Nyv1p), 液胞 SNARE と相互作用する SNARE シャペロン (Sec17p, Sec18p, HOPS 複合体), 酵母液胞 Rab GTP アーゼ (Ypt7p), そして酵母液胞膜に存在するホスホイノシチド (PI(3)P, PI(4,5)P<sub>2</sub>).

起こしていると考えられてきた。

酵母液胞融合をはじめ「単離オルガネラ」や「生きた細胞」を用いた研究に加えて、「人工脂質二重膜リポソーム」と「リコンビナント SNARE タンパク質」を使った「膜融合」の *in vitro* 完全再構成が、Rothman らによって 1998 年に初めて報告された<sup>7)</sup>。シナプス SNARE の精製リコンビナントタンパク質と合成脂質から再構成 SNARE プロテオリポソームを調製し、それらプロテオリポソームが、生理的温度下で他の膜融合因子なしに、自発的に膜融合することを示した<sup>7)</sup>。そしてこの成果は、「SNARE が選択的な細胞内膜融合に必須かつ十分である」とする「SNARE 仮説」の基盤ともなってきた<sup>8)</sup>。しかし一方で、この Rothman らの SNARE プロテオリポソーム再構成系には、①非生理的な高い SNARE 密度を使用している、②細胞内膜と異なる非生理的な脂質組成 (ホスファチジルコリン (PC)/ホスファチジルセリン (PS) など) を使用している、③他の膜融合因子を含んでいない点等、その実験条件について多くの問題点があり、結果の解釈にも様々な議論が続いてきた<sup>8)</sup>。

### 3. 液胞オルガネラ膜融合の *in vitro* “完全” 再構成

「再構成 SNARE プロテオリポソーム膜融合」は魅力ある新たな方法論であったが、そこから導かれた「SNARE 仮説」をはじめとする結論は、「単離オルガネラ」や「生きた細胞」で得られた知見と大きな隔たりがあった。そのような現状の中、筆者と Wickner らは、それまでの SNARE だけの再構成系から脱却し、SNARE シャペロンと ATP も存在する、より細胞内の生理的環境に近づく再構成系の構築を目指した<sup>9)</sup>。従来のシンプルな非生理的脂質組成 (PC (85%)/PS (15%)) では、SNARE シャペロン/ATP 存在下でも、液胞 SNARE プロテオリポソームの膜融合は起こらなかったが、実際のオルガネラ酵母液胞に似せた生理的脂質組成 (PC (45%)/ホスファチジルエタノールアミン (PE) (18%)/ホスファチジルイノシトール (PI) (18%)/PS (4%)/PA (2%)/ERG (8%)/カルジオリピン (CL) (2%)/DAG (1%)/PI (3)P (1%)/PI (4,5)P<sub>2</sub> (1%)) が劇的な変化をもたらし、SNARE, SNARE シャペロン (Sec17p/Sec18p/HOPS), そして ATP, これら全ての因子に依存し、かつ効率的で速いプロテオリポソーム膜融合を得た (図 2)。これらの結果は、SNARE とともに SNARE シャペロン群/ATP も「膜融合」のコアマシナリーであることを実証し、さらには生理的脂質組成が膜融合タンパク質因子群の機能発現に重要であることを明確に示した<sup>9)</sup>。

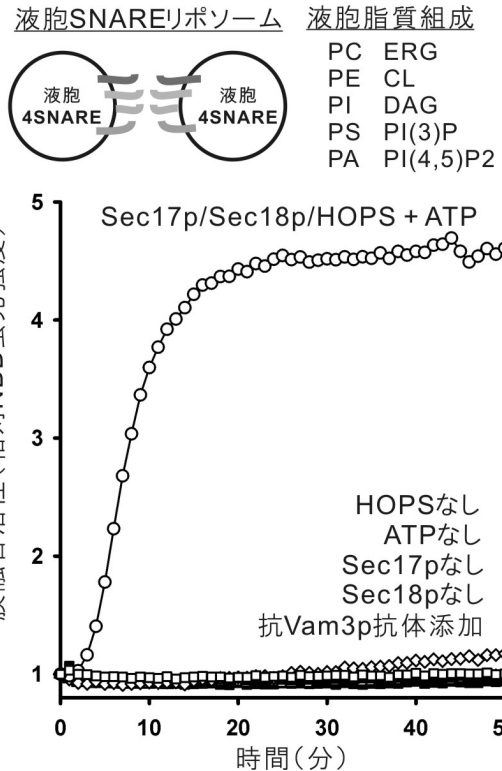


図 2 酵母液胞融合マシナリーの *in vitro* 完全再構成  
液胞 4-SNARE プロテオリポソーム間の膜融合は、各 SNARE シャペロン (Sec17p/Sec18p, HOPS 複合体), 生理的な液胞脂質組成, および ATP, これらの全てのコンポーネントに依存する。

次に筆者と Wickner は、この新たな液胞融合 *in vitro* 完全再構成系を使い、必須脂質因子の一つであるホスホイノシチドの「膜融合」での特異的機能を探った<sup>9,10)</sup>。複雑な脂質組成であっても人為的に自由自在に操作できる再構成プロテオリポソーム系の利点を活かし、ホスホイノシチドを中心に脂質組成が異なる様々な再構成プロテオリポソームを調製し、それらの膜融合速度を網羅的に解析した。その結果、①液胞 SNARE/SNARE シャペロン (Sec17p/Sec18p/HOPS) 依存性膜融合では、PI (3)P が最も顕著に膜融合速度を促進するホスホイノシチドであること (図 3A), そして②この PI (3)P の「膜融合」における機能の発現には、他の液胞バルク脂質群が必要とされること (図 3B), という二つの新たな知見を得た<sup>9,10)</sup>。一般的に PI (3)P をはじめホスホイノシチドは、膜表在性・可溶性タンパク質の脂質膜への特異的なターゲティングが主な機能とされているが、今回我々の「液胞融合」再構成系では、SNARE シャペロンなど可溶性タンパク質因子の脂質膜結合に対する

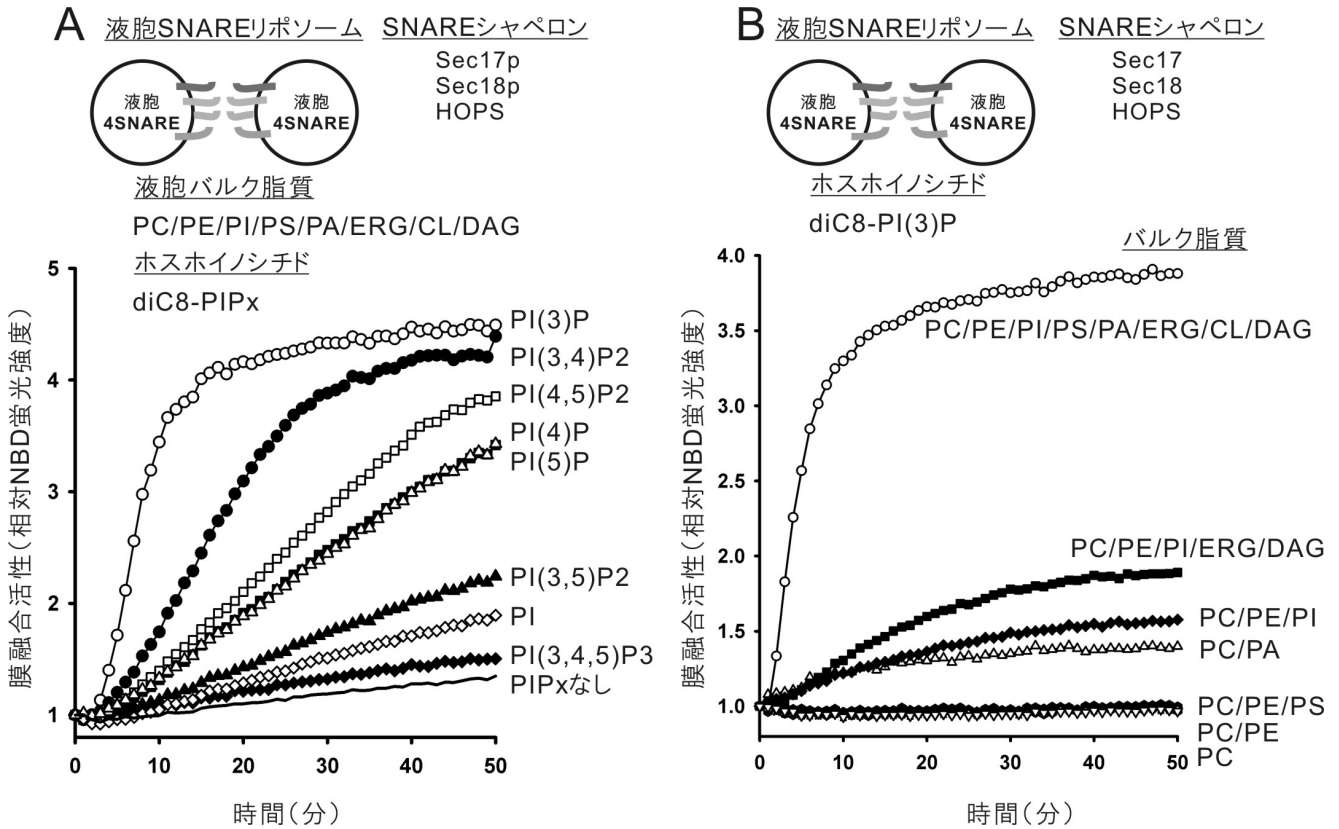


図3 液胞オルガネラ膜融合におけるホスホイノシチド機能

(A) PI(3)Pが、最も顕著に液胞4-SNAREプロテオリポソーム膜融合を促進するホスホイノシチドである。  
 (B) PI(3)Pのプロテオリポソーム膜融合に対する促進効果は、液胞バルク脂質組成(PC, PE, PI, PS, PA, ERG, CL, DAG)の存在下で最大となる。

PI(3)Pの効果は見られなかった<sup>9)</sup>。恐らくPI(3)Pは、プロテオリポソーム膜上でSNARE/SNAREシャペロンの機能的集積、そしてその後の膜融合「活性型」マイクロドメイン形成において中心的な役割を果たしていると予想される。そして、それらの仮説やモデルへの実験的介入は、今後の大きな研究プロジェクトとなっていっだろう。

4. 今後の展望

SNARE, SNARE シャペロン, 生理的脂質組成, ATPを含んだ「液胞オルガネラ膜融合の*in vitro* “完全”再構成系」は、「SNARE仮説」の修正を確固たるものとし、また酵母液胞融合だけでなく他のオルガネラ膜融合・膜動態の研究にも波及する新しい概念を与えるものであった。Wicknerらはその後、液胞Rab GTPase Ypt7pを加えた新しい液胞融合再構成系を発表<sup>11,12)</sup>、またZerialらも同時期にRab5 GTPase, Rab5エフェクター群、そしてエンドソームSNAREを含むエンドソーム膜融合の*in vitro* 完全

再構成に成功している<sup>13)</sup>。これら最新のRab-SNARE再構成系から、Rab GTPaseのオルガネラ膜動態への直接的な関与について、今後多くの新しい成果が挙がると期待される。そして中長期的には、現在の「膜融合」だけでなく、細胞内の他の膜動態、「膜出芽・分裂」、「膜変形」、「膜移動」に関与する分子も含んだ*in vitro* 完全再構成系が構築できれば、細胞内膜動態の全体像をより深く探ることが可能になるだろう。

- 1) Bonifacino, J.S. & Glick, B.S. (2004) *Cell*, 116, 153-166.
- 2) Wickner, W. & Schekman, R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 658-664.
- 3) Ostrowicz, C.W., Meiringer, C.T.A., & Ungermann, C. (2008) *Autophagy*, 4, 1-15.
- 4) Mima, J., Hickey, C.M., Xu, H., Jun, Y., & Wickner, W. (2008) *EMBO J.*, 27, 2031-2042.
- 5) Haas, A., Conradt, B., & Wickner, W. (1994) *J. Cell Biol.*, 126, 87-97.
- 6) Seeley, E.S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W., & Eitzen,

- G. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 782–794.
- 7) Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., & Rothman, J.E. (1998) *Cell*, **92**, 759–772.
  - 8) Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 631–643.
  - 9) Mima, J. & Wickner, W. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 16191–16196.
  - 10) Mima, J. & Wickner, W. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 27114–27122.
  - 11) Hickey, C.M., Stroupe, C., & Wickner, W. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 16118–16125.
  - 12) Stroupe, C., Hickey, C.M., Mima, J., Burfeind, A.S., & Wickner, W. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 17626–17633.
  - 13) Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2009) *Nature*, **459**, 1091–1097.

三間 穰治

(大阪大学蛋白質研究所,

大阪大学生命科学研究独立アプレントイスプログラム)

Yeast vacuole fusion reconstituted with purified proteins and chemically defined liposomes

Joji Mima (Institute for Protein Research, Osaka University; Osaka University Life Science Young Independent Researcher Support Program, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

## ERAD (小胞体関連分解) を制御するレクチン OS-9 と XTP3-B

### 1. はじめに

小胞体では多くの膜タンパク質や分泌タンパク質が生合成されている。タンパク質は、正しい高次構造をとって初めて機能することができるが、生合成の過程でしばしばフォールディングに失敗することが明らかになってきた。このような「不良品」タンパク質は、分泌されてしまうと生体や細胞の機能を障害するので、小胞体内に留めておいたのち細胞内分解する仕組みがあり、小胞体品質管理機構 (endoplasmic reticulum quality control, ERQC), あるいは分解系に関しては、小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) と呼ばれている<sup>1-3)</sup>。小胞体で生合成されてくるタンパク質の多くは N-結合型糖鎖をもった糖タンパク質であることから、小胞体関連分解に

は、小胞体シャペロンタンパク質とともに、糖鎖を認識するレクチンが重要な働きをしていることが知られている。近年、出芽酵母の ERAD において、Yos9p と呼ばれる MRH (mannose 6-phosphate receptor homology) ドメインをもったレクチンが、ERAD 基質認識の重要な担い手であることが解明されたが、哺乳類ホモログの機能は最近まで不明なままであった。2008 年になって、複数のグループから哺乳類ホモログである OS-9 (osteosarcoma amplified 9) および XTP3-B (XTP3-transactivated gene B protein) の機能が相次いで報告され、糖タンパク質の品質管理機構に関する新たな知見が得られつつある<sup>4-6)</sup>。

### 2. MRH ドメインをもつレクチン

糖鎖を認識して結合するタンパク質をレクチンと呼ぶ。細胞表面や細胞外マトリックスには糖タンパク質が多数存在しており、これらを認識するレクチンにも多くの種類がある。細胞内にもレクチンが存在し、これらはタンパク質の品質管理や細胞内輸送に関わっている。N-結合型糖鎖に付加されたマンノース 6-リン酸 (mannose 6-phosphate, M6P) は、リソソームに輸送されるタンパク質のタグ (標識) として機能することがよく知られている。M6P 受容体は、このタグを認識するレクチンで、P タイプレクチンとも呼ばれる。M6P 受容体レクチンドメインの結晶構造が解析され、糖鎖認識の分子メカニズムが明らかになると共に、このレクチンドメインとホモロジーをもつタンパク質が他にも存在することがわかり、「MRH ドメインをもつレクチン」として分類することが提唱された<sup>7)</sup>。ヒトのゲノムには、上述の M6P 受容体 (カチオン依存性およびカチオン非依存性) の他に、GlcNAc リン酸転移酵素  $\gamma$  サブユニット、小胞体グルコシダーゼ II  $\beta$  サブユニット、そしてほとんど機能が解明されていなかった OS-9 と、後に XTP3-B/Erlectin と名付けられた EST クローンの、合計六つの遺伝子が存在する。なお、OS-9 は一つ、XTP3-B は二つの MRH ドメインをもっている。

### 3. ERAD における Yos9p の機能

MRH ドメインをもつレクチンが ERAD に重要な機能をもつことは、まず出芽酵母で発見された。酵母変異株ライブラリーを用いて、ERAD で分解されるモデル基質を発現させ、基質の分解が阻害される変異体をスクリーニングした結果、Yos9p がクローニングされた<sup>8)</sup>。Yos9p という名前は、出芽酵母 (yeast) の OS-9 ホモログとして名付けられたもので、OS-9 同様、MRH ドメインをもっている