

浦野 泰臣

(同志社大学生命医科学部医生命システム学科)

Intracellular transport of low-density lipoprotein-derived cholesterol

Yasuomi Urano (Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan)

エンベロープウイルスの出芽と細胞質分裂

1. はじめに

細胞膜に存在する増殖因子受容体などの膜タンパク質は、リガンド結合によって活性化された後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。これらの膜タン

パク質はいったんエンドソームに蓄積され、そこで選別を受け最終的にリソソームにて分解される。この選別過程で膜タンパク質はエンドソームの膜とともに内腔に取り込まれ、MVB (multivesicular bodies) と呼ばれるオルガネラが形成される (図1)。2001年、Emrらのグループによる酵母を用いた解析によって、これまで class E VPS (vacuolar protein sorting) と呼ばれていた18種類の遺伝子群がMVB形成に直接関与していることが明らかとなった^{1,2)}。生化学的な解析により、これら因子群は後にESCRT (endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれる複合体群を形成することが明らかになった^{1,2)}。ESCRT経路の発見とほぼ同時期に、レトロウイルスがこの経路を粒子形成に利用していることが報告された³⁾。レトロウイルスは感染後期過程で娘ウイルスを産生する際、Gagウイルスタンパク質が細胞膜内側でアッセムブリーし膜を通過することによって自身のエンベロープを獲得する。このウイルス粒子出芽過程でのESCRT因子の利用は、膜が細胞質の内側から外側へと湾曲し膜狭窄部位の内側にある因子によって切り離されるという膜ダイナミクスにおいて、MVB小胞形

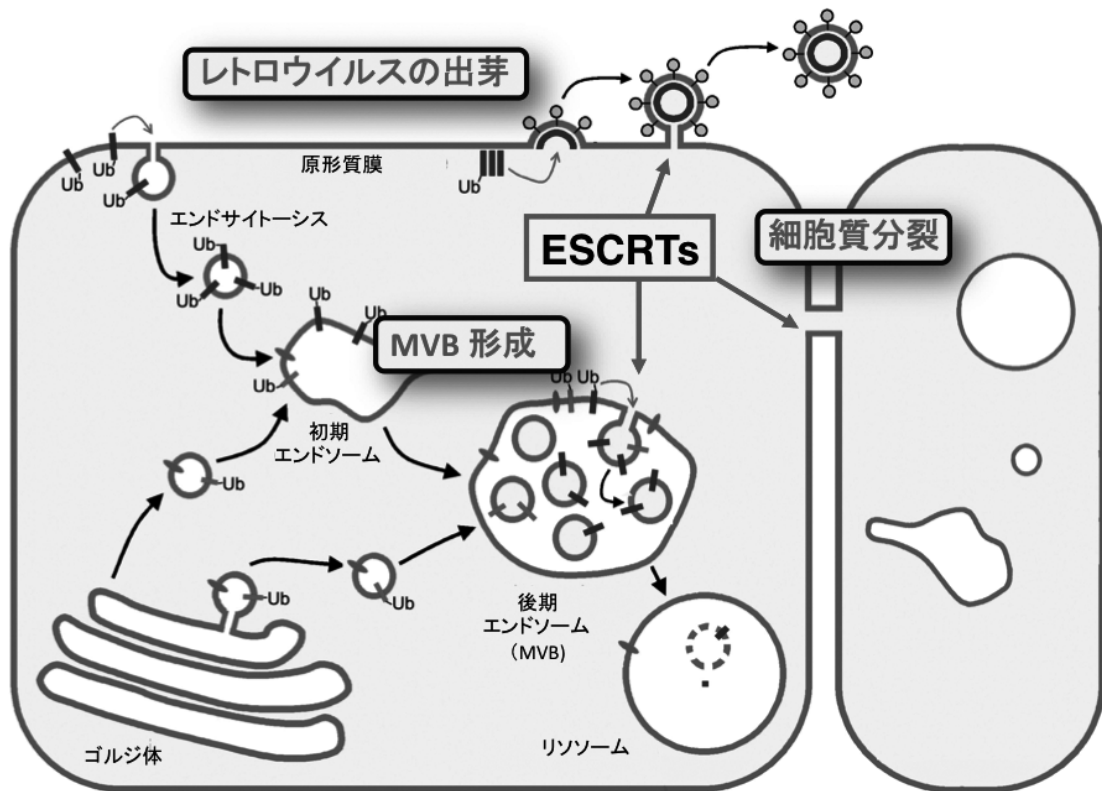


図1 ESCRT因子が関与する三つの生体膜切り離しの現象

成過程のそれと相同の現象と考えられている⁴⁾ (図1)。

最近、著者らのグループは、新たな ESCRT 調節因子を同定することを目的とし、ESCRT 結合因子の解析を行った。その結果、複数の細胞質分裂関連因子が ESCRT 結合因子として同定された⁵⁾。また、ESCRT 経路は細胞質分裂終期の娘細胞同士を切り離す膜分裂にも関与していることが明らかになった^{5,6)}。これは、細胞分裂終期の膜の切り離しは、MVB 小胞形成やウイルスの出芽時の膜の切り離しと、分子レベルにおいて相同の現象であるということを示している。

2. ESCRT と細胞質分裂

レトロウイルスの一種である HIV (ヒト免疫不全ウイルス) の Gag タンパク質 C 末端領域には P(T/S)AP と YPXL という出芽に必須なペプチドモチーフが存在する。この領域はレイトドメインと呼ばれ、ESCRT-I と ALIX (ALG-2-interacting protein X) という 2 種類の ESCRT 因子がパラレルに結合しウイルス粒子形成に必須な役割を持つ⁴⁾。MVB 形成においても Gag に相当する ESCRT をリク

ルートする細胞側の因子として HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) や TOM1L1 (target of Myb 1 like 1) が同定されている。これら分子にも P(T/S)AP レイトドメインが存在しており、このモチーフを介した ESCRT-I のリクルートが行われる¹⁾ (図2)。最近、著者らのグループは ESCRT-I と ALIX に結合する因子を検索したところ、細胞質分裂に関わる因子を複数同定した⁵⁾。そのうちのひとつである CEP55 (centrosomal protein 55 kDa) は、細胞分裂終期にミッドボディと呼ばれる微小管からなる娘細胞同士をつなぐ架橋構造の中心部に局在し、細胞質分裂に関与していることがすでに報告されているものであった⁷⁾。CEP55 は N 末端と C 末端に長いコイルドコイル構造を持っており、中心部位のヒンジ領域を介して ESCRT-I と ALIX のプロリンリッチ領域に結合する。CEP55 をノックダウンした場合や、CEP55 に結合しない ESCRT-I と ALIX 変異体はミッドボディに局在できないことから、この結合が ESCRT 因子のミッドボディへの局在に重要であることがわかる^{5,6)}。また、ESCRT-I と ALIX のノックダウンにより細胞質分裂が著しく阻害され、結果と

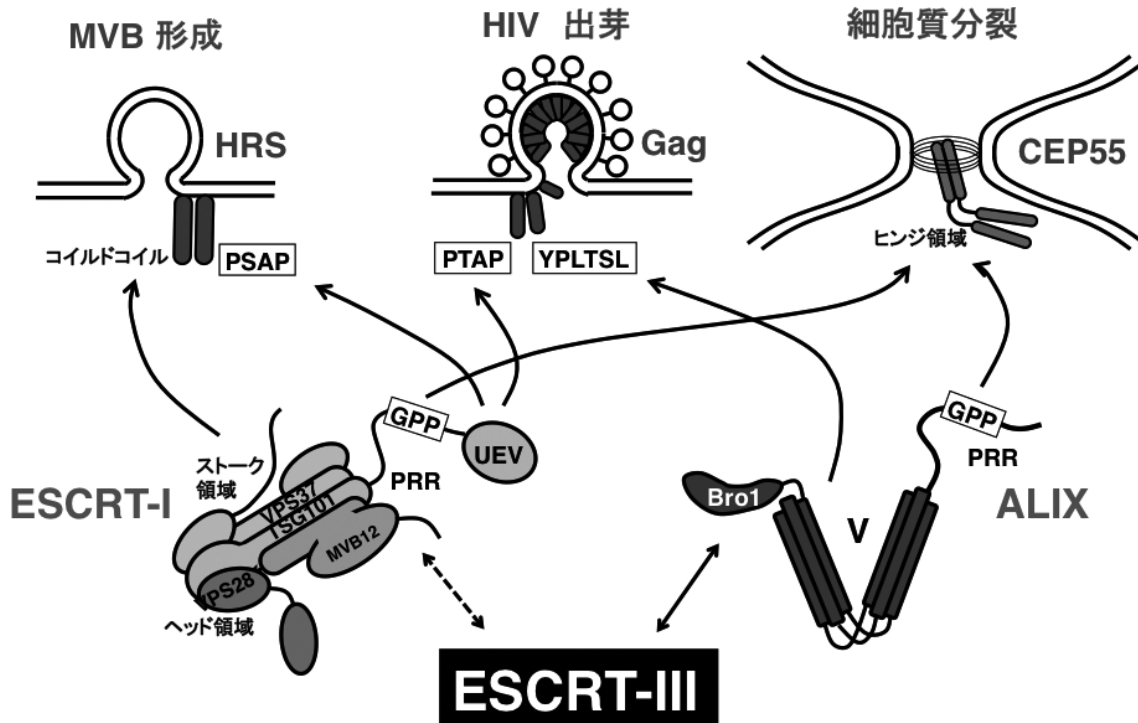


図2 ESCRT リクルーターとその下流の経路

MVB 小胞形成には HRS、レトロウイルス出芽には Gag、そして細胞質分裂には CEP55 がリクルーターとしての役割を持つ。それぞれがレイトドメインやヒンジ領域を介して ESCRT-I、ALIX をリクルートし、最終的に ESCRT-III がリクルートされる。

して多核細胞が誘導される^{5,6)}。siRNA 抵抗性野生型タンパク質の入れ戻しにより、機能不全が回復されるのに対し、CEP55 結合不全点変異体では機能不全のままであることから、これら ESCRT 因子の細胞質分裂での機能には CEP55 への結合が必須であることが明らかとなった⁵⁾。さらに、CEP55 のノックダウンによりレトロウイルスの出芽や MVB 形成に影響が見られないことから、CEP55 は ESCRT-I と ALIX の上流で作用し、細胞質分裂で特異的に働いていると考えられる^{5,6)} (図 2)。

このように ESCRT 経路には、エンドソーム/細胞膜での小胞形成に限らず、これらとは全く異なった生物学的プロセスである細胞質分裂後期の膜切り離しにも関わることから、膜切り離しに普遍的に関与するモジュラー機構としての役割があるといえる。最近、*Sulfolobus solfataricus* という好熱好酸性古細菌の一種にも ESCRT 因子が保存されており、細胞質分裂に関わっていることが報告された⁸⁾。この生物には、高等生物のエンドソーム細胞内膜小胞輸送系が存在しない。この事実から ESCRT 本来の機能は細胞質分裂にあったのではないかと推測することができる。また、この生物にはアクチン細胞骨格に相当する分子が見つからない⁸⁾。これは、この生物は ESCRT のみで細胞質分裂を行っている可能性を示唆するものである。哺乳類での細胞質分裂にはアクチン/ミオシンを介した収縮環形成が重要な役割を担っていることは周知の事実であるが、ESCRT を介した膜切り離しのメカニズムは、収縮環形成のそれとは全く異なった機構で制御されているのかもしれない。

3. ESCRT を介した膜切り離しの分子メカニズム

ESCRT を介した膜切り離しでは、ESCRT-I と ALIX が膜狭窄部位にリクルートされた後、最終的に ESCRT-III と VPS4 がリクルートされる^{1,4)}。哺乳類の ESCRT-III は別名 CHMP (charged MVB proteins) ファミリーと呼ばれており、現在 13 種類の遺伝子が同定されている。CHMP ファミリーは一部の例外を除き 200~250 個のアミノ酸から成る比較的小さな分子群で、N 末端に塩基性領域、C 末端に酸性領域を持つという共通した特徴がある^{1,4)}。VPS4 は AAA-ATPase ファミリーに属する分子であり、哺乳類では VPS4A と VPS4B の 2 種類の遺伝子が同定されている。また VPS4 は LIP5/VTA1 と共にヘテロ十八量体複合体のリング状高次構造を形成し、N 末端領域にある MIT ドメインを介して CHMP ファミリーと結合する^{1,4)}。

精製した酵母由来の CHMP2 と CHMP3 を GUV (giant

unilamellar vesicles) という合成リボソームと反応させると、リボソーム内に多数の小胞が形成され MVB 様構造が再構築される⁹⁾。この結果は、CHMP ファミリーのみで小胞形成が誘導されることを示している。また、哺乳類培養細胞に CHMP4 を強発現させると、細胞膜が内側から外に押し出され、結果としてチューブ状の構造物が細胞外に形成される¹⁰⁾。このとき膜の内側において、チューブ形成部位を中心に、直径 5-6 nm のフィラメント状に集合した CHMP4 分子が、直径 100 nm 程度の多重リング様構造を形成していることが走査型電子顕微鏡にて観察された¹⁰⁾。これは、CHMP ファミリーが膜変形時に、膜内側でリング状にアッセンブリーすることを示している。

Emr らによる酵母を用いた解析によると、ESCRT-I に結合した ESCRT-II 複合体が、まず Vps20p (ヒトの場合 CHMP6 に相当) をリクルートし、Snf7p (CHMP4A-C) の多量体形成が始まる¹¹⁻¹³⁾。続いて、VPS2p (CHMP2A/B) と Vps24p (CHMP3) がリクルートされ、最終的に VPS4 複合体によって認識され複合体が解離する¹¹⁻¹³⁾。その他の CHMP ファミリーである Did2p (CHMP1A/B) と Vps60p (CHMP5) は、その欠損が MVB 経路に対して大きな影響を与えないことから、互いに相補的な役割を持つか、あるいは、調節因子としての機能があるのではないかと考えられている¹¹⁾。哺乳類の場合では、今まではドミナントネガティブ変異体の過剰発現を中心とした解析に限られ、それぞれの CHMP ファミリーが酵母のそれと同様の働きを示すのかどうかは不明であった。最近、著者らのグループが 13 種類全てのヒト CHMP ファミリーのノックダウンによる機能スクリーニングを行ったところ、どの CHMP ファミリーをノックダウンした場合においても、程度の差こそあれ、細胞質分裂に影響を与えることが確認された。一方、レトロウイルスの出芽の場合では、全ての CHMP ファミリーのノックダウンで影響が見られるわけではなく、CHMP2 及び CHMP4 をノックダウンした場合のみに顕著な阻害効果が確認された (未発表データ)。これらの結果は、哺乳類の場合、CHMP ファミリーは細胞質分裂には非相補的な機能を持っているが、レトロウイルスの出芽には、一部の CHMP ファミリーのみが使われていることを示している。これは、ESCRT 本来の機能が細胞質分裂にあり高等生物が進化する上で、その一部分をエンドソーム系などの小胞形成へ利用するように進化してきたという仮説を裏付けているのかもしれない。

最近、CHMP ファミリーは、N 末端と C 末端が分子内で結合し折りたたまれ閉じた状態の構造と、開いた状態の

2種類の構造を取り得ることが明らかとなった¹⁴⁾。この構造変化を伴う分子内のスイッチシステムが膜構造の変化に深く関与していると考えられている(図3)。GUVを用いた *in vitro* の実験系では、内部小胞形成にVPS4は必須ではないということがわかっており⁹⁾、これは、VPS4のATPase活性が直接膜の変形に関与していないことを示している。VPS4が属するAAA-ATPaseスーパーファミリーは、基質タンパク質の分解や複合体脱集合に関与する、分子シャペロン様の役割を担っていることがわかっている。おそらく、VPS4複合体には、CHMPファミリーの脱集合と構造変化に伴うエネルギーの付与という間接的な役割があると推測される(図3)。

4. おわりに

ESCRTは、MVB小胞形成やエンベロープウイルスの出

芽に限らず、細胞質分裂終期の娘細胞同士の生体膜切り離しという全く異なった生命現象にも関与することが明らかとなった。最近、エンドサイトーシス時のクラスリン小胞形成過程に関与するダイナミンスーパーファミリーが、ミトコンドリアの分裂や、植物細胞分裂時にみられる細胞板形成など、より広範囲な生物学的現象において、膜狭窄部位の外側からの膜切り離しに共通に作用していることが報告された¹⁵⁾。ESCRT因子も、未だ解明されていない他の多様な膜狭窄部位の内側からの膜切り離しのプロセスに普遍的に関与しているのかもしれない。

CHMPファミリーが関与する膜切り離しの分子メカニズムは、主にEmrらのグループによって提唱されたモデルが中心となっており、最近、これを裏付ける実験結果が続々と報告されている。また、現在では、個々のESCRT複合体の結晶構造の大部分が明らかになっており、具体的

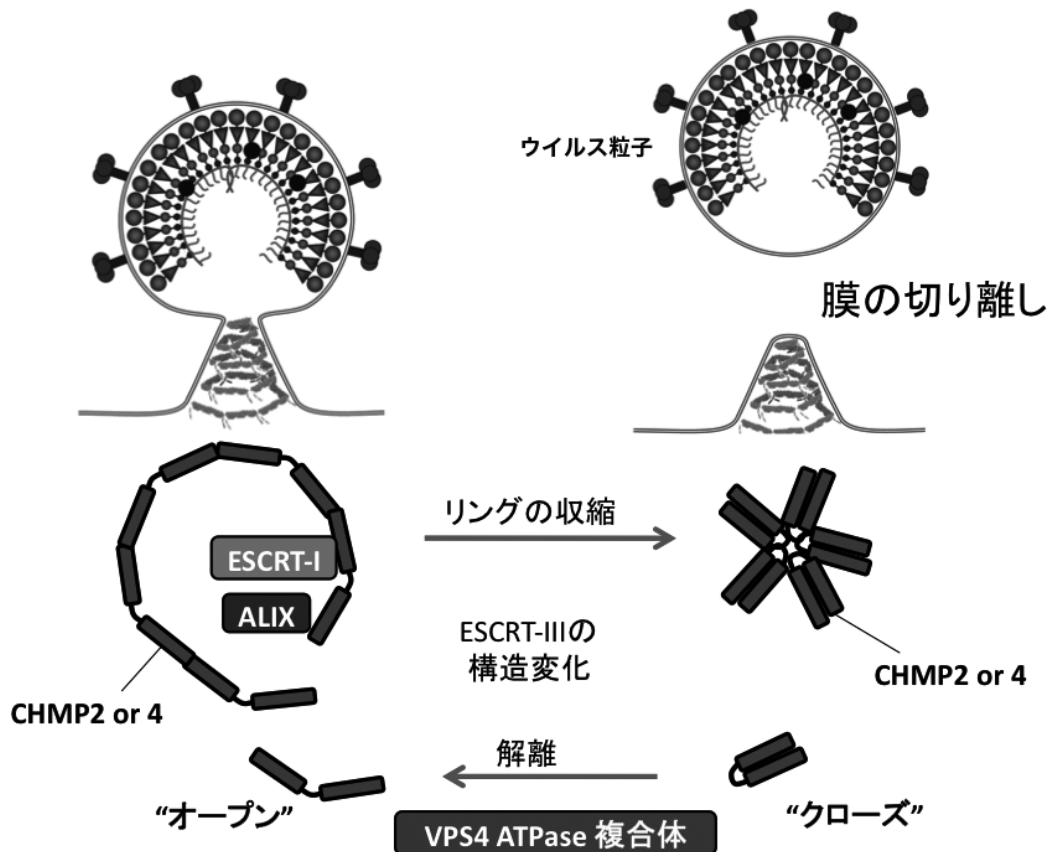


図3 ウイルス出芽時におけるESCRT-IIIを介した膜切り離しのモデル

ESCRT-I及びALIXによってリクルートされたCHMP2とCHMP4が膜狭窄形成部位を中心に円形に集合する。その後、なんらかの刺激によりESCRT-IIIの構造変化が誘導され、膜の切り離しが行われると考えられる。最終的に、ESCRT-IIIはVPS4 ATPaseによって解離しリサイクルされる。

にどのように膜を切り離しているのか、その分子メカニズムを示す上での判断材料として活用されている。しかしながら、最も重要な部分である CHMP ファミリーのアッセンブリー様式の構造解析は不十分であり、今後の解析が必要である。また、個々のパーツに目を向けるとまだ矛盾する点が数多く残されていることも事実である。特に哺乳類の ESCRT 経路では、それぞれの現象に特異的なサブセットによって因子が使い分けられているということが徐々に明らかになり、今後、注目していきたい点である。

- 1) Saksena, S., Sun, J., Chu, T., & Emr, S.D. (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 561-573.
- 2) Katzmann, D.J., Babst, M., & Emr, S.D. (2001) *Cell*, **106**, 145-155.
- 3) Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., & Sundquist, W.I. (2001) *Cell*, **107**, 55-65.
- 4) Morita, E. & Sundquist, W.I. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 395-425.
- 5) Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S. P., Rodesch, C.K., & Sundquist, W.I. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4215-4227.
- 6) Carlton, J.G. & Martin-Serrano, J. (2007) *Science*, **316**, 1908-1912.
- 7) Fabbro, M., Zhou, B.B., Takahashi, M., Sarcevic, B., Lal, P., Graham, M.E., Gabrielli, B.G., Robinson, P.J., Nigg, E.A., Ono, Y., & Khanna, K.K. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 477-488.
- 8) Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., & Bell, S.D. (2008) *Science*, **322**, 1710-1713.
- 9) Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., & Hurley, J. H. (2009) *Nature*, **458**, 172-177.
- 10) Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., & Heuser, J.E. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 389-402.
- 11) Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., & Emr, S.D. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 271-282.
- 12) Teis, D., Saksena, S., & Emr, S.D. (2008) *Dev. Cell*, **15**, 578-589.
- 13) Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., & Emr, S. D. (2009) *Cell*, **136**, 97-109.
- 14) Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.M., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P., & Sundquist, W.I. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 754-762.
- 15) Praefcke, G.J. & McMahon, H.T. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 133-147.

森田 英嗣

(大阪大学微生物病研究所細胞制御分野)

Envelope virus budding and cytokinesis

Eiji Morita (Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

相互作用するストレスホルモン（グルココルチコイド）と BDNF 機能

1. はじめに

脳由来神経栄養因子 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) は、TrkB (tropomyosin receptor kinase B) 受容体とともに脳に強く発現している。BDNF の機能は、中枢ニューロンの分化、生存維持、さらにはシナプス可塑性など実に多岐におよぶ¹⁾。うつ病では記憶・学習能力の低下などが認められ、BDNF との関係が示唆されている。

HPA 内分泌系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, 視床下部-下垂体-副腎皮質) の機能亢進がうつ病患者で確認されている^{2,3)}。副腎皮質より放出されるグルココルチコイドは、糖代謝増加や抗炎症作用発揮など、生体がストレス下にある場合に重要である。グルココルチコイドは中枢神経系を介して自身の血中濃度を下げる (ネガティブフィードバック機構)。ところが、過度のストレスが持続し、ネガティブフィードバック機構が破綻すると、HPA 系機能亢進によるグルココルチコイド過分泌が生じる。それにより脳がなんらかのダメージを受け、うつ病が発症する可能性がある。グルココルチコイド投与後では BDNF の発現量が減少することなどが報告されている^{4,5)}。しかし、BDNF 機能との関連は明らかではない。

2. BDNF による神経伝達物質放出を抑制するグルココルチコイド

多様な BDNF 機能のなかでも、神経伝達物質放出作用は重要である^{6,7)}。我々も BDNF が大脳皮質ニューロンから急速に興奮性伝達物質であるグルタミン酸の放出を引き起こす現象を見出した。TrkB が活性化されると、MAPK (mitogen-activated protein kinase), ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K), およびホスホリパーゼ C γ (PLC γ) 経路などの細胞内シグナルが活性化する。我々は、