

膜タンパク質の細胞内選別輸送の分子機構 Molecular Mechanisms of Intracellular Sorting and Transport of Membrane Proteins

中野 明彦 (Akihiko Nakano)
東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

細胞内で膜タンパク質が機能すべき場所に正しく局在するためには、オルガネラにおける正確な選別輸送が不可欠である。その分子機構を解明するために、生化学的、分子遺伝学的手法とライブイメージングを組み合わせて、これまで理解できなかった新しいメカニズムを明らかにした。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

生物学／生物科学／細胞生物学／生体膜

1. 研究開始当初の背景・動機

タンパク質のさまざまなオルガネラへの局在化に、輸送装置としての膜タンパク質が重要である。膜タンパク質同士がどのようにして相互を認識し、どのようにして機能に必須な局在を維持しているかを知る必要がある。

2. 研究の目的

メンブレントラフィック-小胞輸送で結ばれるダイナミックな膜の流れの中で、ある特定の場所で機能すべき膜タンパク質がいかんしてそこに局在するかを、徹底的に分子の言葉で解明することを目的とする。

3. 研究の方法

最先端の生化学・分子遺伝学的手法に加えて、生細胞内での分子動態解析 (ライブイメージング) など、新しい方法論の開発・適用も行った。

4. 研究の主な成果

1) Rer1p 選別レセプターに関する研究

ゴルジ体膜タンパク質 Rer1p は、ゴルジ体に誤って輸送されてきた一群の小胞体膜タンパク質の膜貫通領域 (TMD) を認識し、COPI 小胞を介して小胞体へと送り返す分子選別装置である。積み荷として Sec71p に注目し、その TMD が小胞体膜へのターゲティングおよび局在化に必要十分であり、Rer1p に直接認識されることを明らかにした。また、この認識には TMD における極性残基の空間的な位置が重要であることを示した。酵母鉄イオン輸送体は Fet3p/Ftr1p というヘテロ 2 量体からなり、そのいずれかが欠失しても細胞膜に正しく発現しない。この現象は小胞体における品質管理機構によるものであるが、Fet3p が小胞体に留まるのは、静的残留ではなくゴルジ体に存在する逆送レ

セプター Rer1p に依存したリサイクリングによるものであることを明らかにした。

2) レクチン型選別レセプターに関する研究

小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送における積み荷レセプターの候補として、レクチン様膜タンパク質 Emp46/47p に注目した。C 末端領域に COPI, COPII 結合モチーフがあり、これらに依存して小胞体-ゴルジ体間をリサイクルしていること、順行輸送が機能に重要であることを明らかにした。また、Emp46/47p の欠損株では一群の糖タンパク質の分泌損傷がみられ、これらが糖タンパク質レセプターとして機能している可能性を示唆した。次に、Emp46/47p が小胞体においてオリゴマーを形成すること、またこのオリゴマー形成が小胞体からの COPII 小胞の出芽に必須であることを示した。Emp46p は Emp47p とヘテロオリゴマーを作ることによって初めてゴルジ体に進むことができる。またこのヘテロオリゴマーは、小胞体内および COPII 小胞内では維持されるが、ゴルジ体に到達すると解離することがわかった。

3) 輸送小胞への積み荷選別の完全再構成系

COPII 小胞形成を、積み荷膜タンパク質とリン脂質からなるプロテオリポソーム、および Sar1 GTPase と COPII の精製因子のみを用いて試験管内で完全に再構成することに成功した。この系と FRET を組み合わせて、COPII コートと積み荷タンパク質のリアルタイムでの結合、解離の様子をモニターする実験系を構築した。この実験系で解析を行った結果、この反応の鍵分子である低分子量 GTPase Sar1p は、GTP 加水分解により輸送されるタンパク質の選別を行っているということを示した。さらにこの系を発展させ、蛍光標識した積み荷膜タンパク質を人工平面膜に組み込み、エバネッセント顕微鏡下で 1 分子観察する実験系を構築し、輸送小胞の形成過程を世界で初めて可視化することに成功した。

[4. 研究の主な成果 (続き)]

4) 膜タンパク質選別における脂質およびユビキチンの役割

エルゴステロール合成に欠損を示す酵母 *erg6* 変異株では、トリプトファン輸送体 Tat2p の誤輸送が2つのオルガネラで起こっていた。Tat2p はゴルジ体から細胞膜ではなくてエンドソームへ運ばれ、さらにそこで内腔側へ取り込まれて限界膜から消失した。これら2つの誤輸送は、ユビキチンリガーゼの機能の低下によって矯正された。この結果から、ユビキチンによる翻訳後修飾が Tat2p の輸送シグナルとして機能しており、その選別にステロール脂質が密接に関与していることが明らかになった。また、細胞膜 ATPase である Pma1p の細胞表面への輸送にはゴルジ体の内腔の酸性化が必須であるが、この過程にもユビキチン化が関与していることを明らかにした。

5) 膜タンパク質選別過程のリアルタイム可視化

ゴルジ体の層板を形成する膜区画：槽 (cisterna) 間のタンパク質輸送が、小胞輸送によって起こるのかあるいは槽の成熟によって起こるのかという問題に、高速高感度共焦点レーザー顕微鏡を用いた新しい生細胞イメージングの方法論によって挑戦した (図)。単にゴルジ槽の成熟が起こるだけでなく、その過程で非常にダイナミックな膜の選別・分離が起こることを明瞭に示した。さらにその分子機構を、さまざまな酵母の変異株を用いることにより解析した。COPI α サブユニットの変異である *rer1-1* 株では、槽成熟は正常の3分の1程度に遅くなるが完全には止まらないことから、COPI 小胞による機構とさらにそれ以外の機構が存在することを明らかにした。同じく高速高感度共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ゴルジ体からポストゴルジ網、さらには細胞膜への輸送を観察する系を構築した。低分子量 GTPase Ypt31p が、Sec7p と共局在しながらゆっくり動く過程と、嬢細胞の先端に向かって高速で移動する過程の、2種類の過程に関与することを示した。同様の解析を、層板構造を取る高等植物のゴルジ体とトランスゴルジ網についても行った。

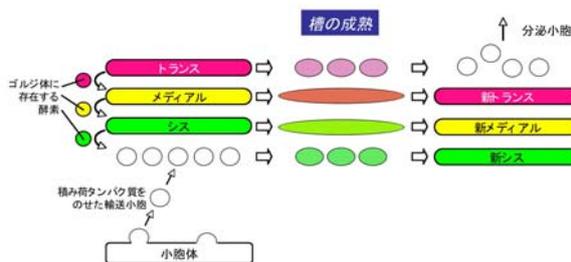


図 証明されたゴルジ体の槽成熟
Matsuura-Tokita *et al.* *Nature* 2006

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

全て精製したタンパク質と脂質のみで輸送小胞形成の完全再構成系を構築し、世界で初めて積み荷タンパク質に依存した小胞形成の生化学的なアッセイを確立した。加えてそこに FRET や1分子解析などの「見る」方法論を適応することによって、Sar1 による GTP 加水分解の意義を、Sar1 発見以来 20 年後にして自ら解明することができた。一方、生細胞のゴルジ体の中で起こっている膜タンパク質の選別現象を、自ら開発した顕微鏡によってリアルタイムに解析し、ゴルジ体発見以来 100 年にわたる謎を解いた。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

Kumi Matsuura-Tokita, Masaki Takeuchi, Akira Ichihara, Kenta Mikuriya, and **Akihiko Nakano** (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**:1007-1010.

Ken Sato and **Akihiko Nakano** (2005). Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:167-174.

Ken Sato and **Akihiko Nakano** (2004). Reconstitution of coat protein complex II (COPII) vesicle formation from cargo-reconstituted proteoliposomes reveals the potential role of GTP hydrolysis by Sar1p in protein sorting. *J. Biol. Chem.* **279**:1330-1335.

Kyohei Umebayashi and **Akihiko Nakano** (2003). Ergosterol synthesis is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**: 1117-1131.

Ken Sato, **Miyuki Sato**, and **Akihiko Nakano** (2003). Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* **14**:3605-3616.

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/H/P/index.html>

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/wako/membrane/>