



細胞内物流システムを制御するカルシウム結合タンパク質に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 准教授 柴田 秀樹

はじめに

真核細胞は、脂質二重層膜で区切られた細胞内にさらに脂質二重層膜で囲われた内膜系オルガネラを有し、細胞機能を分担させている。種々のオルガネラが固有の役割を果たすためには、各々のオルガネラで機能すべきタンパク質が正確に選別輸送されることが必須であり、真核生物はこの物流システムを巧妙に制御する機構を持っている。

また、真核生物は、カルシウムイオン (Ca^{2+}) を細胞内セカンドメッセンジャーとして活用する術を発達させてきた。代表的な Ca^{2+} センサーであるカルモデュリンは、 Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand を四つ有し、酵母からヒトまで保存されている。筆者らが研究を進めてきた五つの EF-hand 構造の繰り返しを有する penta-EF-hand (PEF) タンパク質に関しては、酵母に 1 種存在するが、ヒトを含む哺乳類にはカルパインの大小サブユニットや sorcin など複数のグループに分類できるまでに進化している。ここでは、進化的に最も保存されている PEF タンパク質である ALG-2 (*PDCD6* 遺伝子産物) の生理作用に関する筆者らの研究成果を、細胞内物流システムとの関連に焦点を当てて紹介する。

1. ALG-2 の標的タンパク質の同定と ALG-2 結合モチーフに関する研究

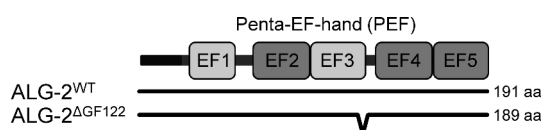
哺乳類 ALG-2 は、N 末端に約 20 アミノ酸の疎水性領域と PEF 領域を持つ (図 1)。ヒトおよびマウスでは、選択的スプライシングによって 2 アミノ酸の違いが生じるアイソフォームの存在が報告されている。ここでは、特に断りがない場合、ALG-2 の表記は 191 アミノ酸からなる長いアイソフォームを指すこととし、区別する場合には、長いアイソフォームを

ALG-2^{WT}, 短いアイソフォームをその欠落している 2 アミノ酸から ALG-2^{ΔGF122} と表記する。ALG-2 の Ca^{2+} 結合能は 1 番目と 3 番目の EF-hand (EF1 と EF3) が担っている。PEF タンパク質は共通して EF5 を介して 2 量体を形成するが、筆者らは ALG-2 がホモ 2 量体あるいは PEF タンパク質である peflin とヘテロ 2 量体を形成することを報告した。さらに、ALG-2 の Ca^{2+} 依存的相互作用タンパク質、すなわち標的タンパク質を酵母 Two-Hybrid 法などを用いて同定してきた (図 1)。

現在は、これら ALG-2 標的タンパク質の多くは細胞内物流システムを制御する因子として認識されているが、当時は、それらの生理機能はほとんど不明であった。そこで、まず筆者らは最初に同定された ALG-2 標的タンパク質である ALIX の ALG-2 結合領域を決定した。ヒト ALIX は 868 アミノ酸からなり C 末端側に Pro に富んだ領域を持つが、さまざまな欠損変異体を用いた解析から Pro-X-Tyr (X は任意のアミノ酸) の 4 回の繰り返しからなる 12 アミノ酸の領域が ALG-2 との結合に十分であることが示された。つづいて、この領域と類似した配列を持つタンパク質をデータベースから検索し、PLSCR3 (phospholipid scramblase 3) を候補として得た。興味深いことに、ALIX には ALG-2^{WT} のみが結合し ALG-2^{ΔGF122} は結合しないのであるが、PLSCR3 には両方のアイソフォームが結合した。データベース検索でヒットした PLSCR3 の ALIX 様 ALG-2 結合領域 (ABS-1 とする) には両アイソフォームが結合する可能性が考えられたが、ABS-1 の欠損変異体 PLSCR3 は依然として ALG-2^{WT} および ALG-2^{ΔGF122} との結合能を有していた。そこで、さらに欠損変異体を作製し解析したところ、両 ALG-2 アイソフォームとの結合能を有する新たな領域 ABS-2 を見いだした。結果的に、PLSCR3 には、ALG-2^{WT} が特異的に結合する ALIX 様モチーフ (ABS-1) と両 ALG-2 アイソフォームが結合する非 ALIX 様モチーフ (ABS-2) が存在することが明らかとなった。PLSCR3 はその名の由来が示す scramblase 活性を有するかについては現在のところ懐疑的で ALG-2 との相互作用の生理的意義も未解明ではあるが、ALG-2 が標的タンパク質を認識する分子メカニズムを解明するうえで、このタンパク質に着目できたことは幸運であった。ALG-2 の発現量ががん細胞によって異なるとの知見が複数あるが、ALG-2^{WT} と ALG-2^{ΔGF122} の発現割合の解析には至っていない。ALG-2 の生理機能を理解するためには、それぞれのアイソフォームの発現量の定量と標的タンパク質の発現割合を知ることは重要であろう。

2. ALG-2 と MVB 経路に関する研究

ALIX の N 末端領域は C 末端の Pro に富んだ領域に比べ、酵母からヒトまで保存されているが、その機能は不明であった。筆者らは、この領域がタンパク質間相互作用を担っていると想定し、酵母 Two-Hybrid 法によるスクリーニングを行っ



標的タンパク質	報告されている生理機能	結合特異性	
		ALG-2 ^{WT}	ALG-2 ^{ΔGF122}
ALIX	*MVB経路、細胞質分裂	+	-
TSG101	*MVB経路、細胞質分裂	+	-
Annexin A7	*リン脂質結合、*小胞融合 Ca ²⁺ チャネル	+	-
Annexin A11	*リン脂質結合、細胞質分裂	+	-
PLSCR3	*ミトコンドリアの脂質輸送	+	+
Sec31A	*COPII小胞の形成	+	+

*物流システムに関連する機能

図 1 ALG-2 の構造模式図と Ca^{2+} 依存的相互作用タンパク質

た。その結果、出芽酵母 Snf7/Vps32 のホモログと考えられるタンパク質をコードするクローンを得た。出芽酵母 Snf7/Vps32 と ALIX ホモログである Bro1/Vps31 は、class E Vps (Vacuolar protein sorting) タンパク質に分類されていた。Class E Vps タンパク質は、エンドソーム膜上でモノユビキチン化された積荷タンパク質を認識し、さらに膜をエンドソーム内腔側に陥入させ小胞を出芽させることでエンドソームの内側へ隔離する、つまりエンドソームの内部小胞化と物質選別を担っている。内部に多数の小胞を持つエンドソームは、その形態学的特徴から MVB (multivesicular body) とも呼ばれ、積荷タンパク質が選択的に内部小胞に積載される輸送過程を MVB 経路という。MVB はリソソームと融合すると、その内部小胞はリソソーム内腔で分解されるが、細胞膜と融合すると、内部小胞はエクソソームとして細胞外に分泌される。筆者らは、新たに同定したヒト Snf7/Vps32 ホモログ (紆余曲折を経て CHMP4 と命名) が、ALIX とともにエンドソームに動員されることを見いだした。さらに CHMP4 と共同して機能する CHMP6 など MVB 経路に関わる分子を複数同定した (図2)。現在は、MVB 経路の中核となる複合体は ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれ、CHMP4 と CHMP6 は ESCRT-III を構成している。ESCRT-III はエンドソームの内側へ出芽しつつある小胞をエンドソームの限界膜から切り切る活性を持っている。

さて、ALG-2 に話を戻したい。筆者らは、ALG-2 が ESCRT-I 構成タンパク質である TSG101 とともに Ca^{2+} 依存的に結合することを見いだした (図2)。また、ALG-2 と ALIX の ALG-2 結合領域ペプチドとの共結晶の構造解析結果から、ALG-2 が 2 量体を形成することで 2 種の標的タンパク質を橋渡しする Ca^{2+} 依存的アダプターとして機能しているモデルを提唱した。実際に、培養細胞を用いた筆者らの *in vitro* 実験系においては、TSG101 と ALIX には Ca^{2+} 結合モチーフがないにもかかわらず、両者の相互作用は Ca^{2+} 依存的であった。さらに ALG-2 の発現抑制細胞を用いた解析により、TSG101 と

ALIX の相互作用を ALG-2 が橋渡ししていることを証明した。ESCRT はエンドソーム膜に限らず、レトロウィルスの出芽や細胞質分裂など、脂質二重層膜を細胞質から遠位に出芽させ切り切る場面で利用されている。ALG-2 が仲介する Ca^{2+} 依存的な ALIX と ESCRT-I の相互作用が、物流システムのどの局面で機能しているか、今後も詳細な解析を進めたい。

3. ALG-2 と分泌経路に関する研究

ALG-2 の細胞内局在を、特異抗体を用いた間接蛍光抗体法、細胞分画による生化学的手法および蛍光タンパク質との融合タンパク質の生細胞イメージング技法を用いて多角的に解析した。細胞内 ALG-2 のほぼ半量は核内に存在するが、細胞質における量は Ca^{2+} 条件によって変動した。すなわち、生化学的には Ca^{2+} 存在下においてオルガネラ膜画分の ALG-2 の割合が増加し、生細胞観察においては細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇時に核周囲で蛍光タンパク質を融合した ALG-2 は顕著に集積した。この集積部位は、ALG-2 の標的タンパク質である Sec31A が豊富に存在する小胞体の COPII 小胞の出芽部位 ERES (endoplasmic reticulum exit site) であった。COPII は小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う輸送小胞である (図3)。Sec31A は COPII の外殻を構成するタンパク質であり細胞質と ERES を循環しているが、被覆構成タンパク質の ERES での滞在時間の延長が小胞形成を導く要因の一つとされている。この COPII 小胞形成モデルに対する ALG-2 の役割を明らかにする目的で、緑色蛍光タンパク質と融合した野生型 Sec31A および ALG-2 結合領域を欠いた変異体 Sec31A を恒常的に発現する細胞株を樹立し、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) を用いてこれら融合タンパク質の ERES における滞在時間を計測した。その結果、ALG-2 結合領域の欠損変異体 Sec31A の ERES における滞在時間は有意に短く、また ALG-2 の発現を RNA 干渉法により抑制させた細胞においても野生型 Sec31A の滞在時間の短縮が計測された (図3)。これらの結果は、ALG-2 が Sec31A の ERES の安定な滞在に必要なことを示している。また、ALG-2 の発現抑制によって

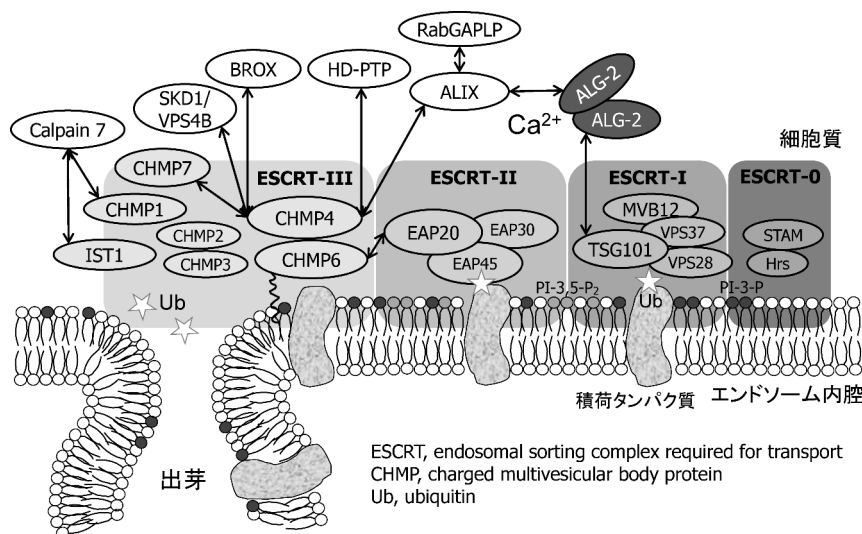


図2 ALG-2 と ESCRT 関連タンパク質の相互作用ネットワーク

エンドソーム膜に動員された ESCRT は、モノユビキチン化された積荷タンパク質を認識し、エンドソームの内腔へ小胞を出芽させる (MVB 経路)。矢印は、筆者らが報告した相互作用ネットワークを示す。ALG-2 は、 Ca^{2+} 依存的に ALIX と ESCRT-I を構成する TSG101 の相互作用を仲介する。ESCRT 関連タンパク質の一部は、レトロウィルスの細胞膜からの出芽と細胞質分裂に必須である。

Sec31A 陽性の ERES の数が増加し、それらは細胞質全体に散在した。Ca²⁺ シグナルが ALG-2 を介して、ERES の空間配置を制御している可能性が考えられる。

おわりに

筆者らは ALG-2 に着目しその生理機能を解析することで、Ca²⁺ シグナルが MVB 経路をはじめとする ESCRT の作用部位と COPII が出芽する ERES において細胞内物流システムの調整をしている可能性を見いだした。ALG-2 を介する Ca²⁺ シグナル伝達の分子機構には依然として解明すべき課題が多いが、筆者らは最近、ERES において ALG-2 が Sec31A と annexin A11 の会合を橋渡しすることで、annexin A11 が Ca²⁺ 依存的に ERES に動員される現象を見いだしている。Annexin は Ca²⁺ 依存的に酸性リン脂質に結合するタンパク質であり ERES の脂質構成を調節している可能性が考えられる。さらには、ALG-2 と annexin A11 という 2 種のカルシウム結合タンパク質が同時に ERES に動員されることは興味深い。今後は、カルシウム結合タンパク質間の相互作用ネットワークにも着目し、それらの相互作用様式や Ca²⁺ シグナルによる局在変化などを丹念に解析することで、Ca²⁺ シグナル伝達機構の全容解明の一助としたい。

本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻分子細胞制御学研究分野にて行われたものです。本研究を行う機会を与えていただき、常に温かくご指導ご鞭撻賜りました名古屋大学教授・牧 正敏先生に心より感謝申し上げます。また、多大なご助言とご支援を賜りました同准教授・人見清隆先生に深く御礼申し上げます。本研究成果は、粘り強く実験を行った分子細胞制御学研究分野の学生諸氏の努力の結晶であり、ご協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。学生時代の恩師である神戸大学教授・小野功貴先生、同准教授・向井秀幸先生には、生化学の基礎から研究者としての心得まで多くのことを教わり、その後も温かい激励を賜りました。心より感謝申し上げます。英国での annexin 研究の機会を与えていただきましたロンドン大学教授・Stephen E. Moss 先生に深く御礼申し上げます。蛍光タンパク質を用いたイメージング解析において、共同研究者として多大なご協力を賜りました福島県立医科大学教授・和田郁夫先生に深謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長の小林哲夫先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

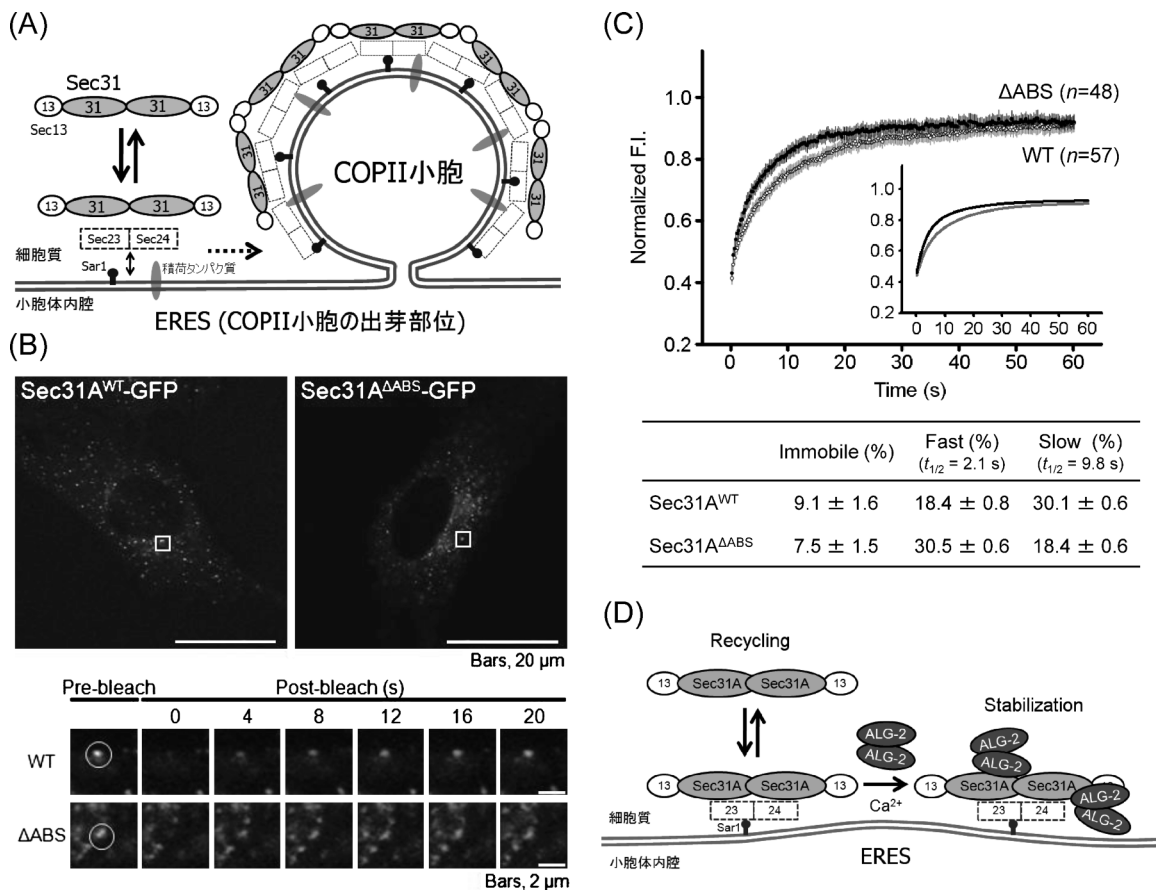


図3 FRAPによるALG-2結合領域の欠損がSec31AのERES滞在時間に与える影響の解析

(A) 輸送小胞 COPII の出芽を制御するタンパク質。Sec31A は Sec13 とヘテロ 4 量体として存在し、細胞質と ERES を循環している。(B) FRAP の実験例。野生型 Sec31A (Sec31A^{WT}) あるいは ALG-2 結合領域を欠損した変異体 Sec31A (Sec31A^{ΔABS}) を融合させた緑色蛍光タンパク質を恒常的に発現する細胞を樹立した。蛍光タンパク質が集積している斑点 (ERES) を含む領域 (下段の白枠の丸い領域) に強いレーザー光を照射し褪色させた。上段の白枠の四角の領域のタイムラプス画像の一部を下段に示す。蛍光の回復は褪色した分子が細胞質の蛍光を発する分子と入れ替わったことを示している。(C) FRAP の解析結果。蛍光回復度の平均値をプロットした。Bar は 95% 信頼区間を示す。Sec31A^{ΔABS}-GFP の蛍光は Sec31A^{WT}-GFP の蛍光に比べて速く回復する。挿入図は、二つの結合成分を想定したフィッティング曲線。表に、ERES に常在する成分 (Immobile)、結合親和性の低い成分 (Fast)、結合親和性の高い成分 (Slow) の割合を示す。(D) ALG-2 の作用モデル。ALG-2 によって Sec31A は ERES に安定に局在する。