

細胞内蛋白質輸送に関与する COP 被覆小胞の形成機構と機能

久下 理・久下小百合

細胞内蛋白質輸送の多くは、生体膜から出芽を介して形成される輸送小胞により媒介される。ゴルジ体膜での輸送小胞の形成には、GTP、アシル CoA, ならびに細胞質に存在する2種類の蛋白質（コートマーと ARF）が必要であり、その2種類の蛋白質に覆われた輸送小胞が形成される。この輸送小胞は、COP 被覆小胞と名づけられ、ゴルジ層板間の蛋白質輸送に加え、小胞体とゴルジ体間の両方向の蛋白質輸送にも関与することが示唆されている。

Key words 【蛋白質輸送】【小胞輸送】【被覆小胞】

はじめに 独自の機能を有する細胞内の各オルガネラや形質膜がどのような機構で形成・維持されているのかを明らかにすることは、現代細胞生物学の重要な研究テーマのひとつである。各オルガネラの機能は、そのオルガネラに特異的に存在する蛋白質が多くの部分を担っている。したがって、新たに合成された蛋白質がどのような機構でその機能を発現する固有の場所に輸送され、局在化されるのかを解明することがオルガネラの形成・維持機構を明らかにするうえで必須のことと思われる。各オルガネラへの蛋白質輸送は、3つに分類される機構で行なわれる。1つは、ゲートッド輸送 (gated transport) とよばれるもので核への輸送がこの機構で行なわれる。この場合、核膜孔複合体が、核輸送シグナルを有する蛋白質を選択的に通過させる門として機能する。2つ目は、トランスメンブラン輸送 (transmembrane transport) とよばれる機構で、動物細胞では小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシゾーム

への輸送がこの機構で行なわれる。これらのオルガネラへの輸送シグナルを有する蛋白質は、各オルガネラ膜に固有に存在する蛋白質輸送担体 (protein translocators) を介してオルガネラ膜を通過あるいは貫通する。3つ目は、小胞輸送 (vesicular transport) とよばれる機構である。小胞輸送による蛋白質輸送は、輸送される蛋白質がドナーコンパートメントから出芽する輸送小胞に取り込まれ、続いてその輸送小胞がアクセプターコンパートメントと融合することにより行なわれる (図 1)。新生分泌蛋白質は、小胞体 (ER) 内腔に放出されたのちに、シスゴルジネットワーク (CGN)、ゴルジスタック、およびトランスゴルジネットワーク (TGN) を順次経由して細胞外へ分泌されるが、このいわゆる分泌経路 (図 2) における蛋白質輸送は小胞輸送により行なわれる。ゴルジ体、形質膜、リソソーム、および分泌顆粒に局在する可溶性蛋白質と膜蛋白質も輸送小胞によりこの分泌経路とその支流を経て輸送され、

Osamu Kuge, 国立予防衛生研究所細胞化学部 (〒162 東京都新宿区戸山 1-23-1) [Department of Biochemistry and Cell Biology, National Institute of Health, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan]

Sayuri Kuge, 佐々木研究所生化学部 (〒101 東京都千代田区神田駿河台 2-2) [Department of Biochemistry, Sasaki Institute, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan]

COP-coated Vesicles in Intracellular Protein Transport

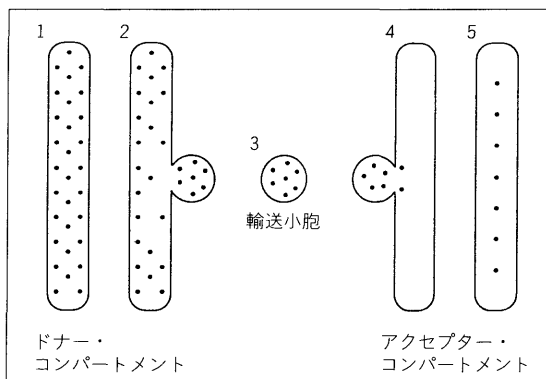


図 1 小胞輸送の基本反応

ドナー・コンパートメントからアクセプター・コンパートメントへ蛋白質が輸送される機構を模式的に示す。輸送される蛋白質(黒丸)を有するドナー・コンパートメント(1)からその蛋白質を取り込んだ小胞の出芽が始まる(2)。輸送小胞が形成され(3)、その小胞は、細胞質を移行してアクセプター・コンパートメントと融合する(4)。蛋白質の輸送が完了する(5)。

それらの蛋白質が有するシグナル配列により固有のコンパートメントに局在化するものと考えられている。小胞体に存在する蛋白質が、分泌経路を経て細胞表面や

細胞外に輸送されないのも、小胞体への局在化シグナルが働いているゆえと思われる。先にも述べたように小胞輸送では、輸送小胞の出芽と融合が基本反応となる。したがって、この出芽と融合の機構を明らかにすることが、小胞輸送の機構を理解するための最も基本的課題と思われる。また、特定の蛋白質が選択的に輸送小胞に取り込まれる可能性、ならびに融合が輸送小胞と正しい標的膜との間で特異的に起こることを考え合わせると、蛋白質の選別(sorting)と局在化という問題もこの出芽と融合の機構にかかわってくる。本稿ではゴルジ体膜から出芽する輸送小胞として同定され、COP被覆小胞と名づけられた輸送小胞の形成機構と機能に関する知見をまとめてみたい。

I. ゴルジ体で形成される被覆小胞(COP被覆小胞)の同定・分離

Rothmanらは、ゴルジ層板間における蛋白質輸送を無細胞系において測定する方法をチャイニーズ・ハムスター卵巣(CHO)細胞由来のCHO-K1細胞株とその

変異株である15B細胞株を用いて確立した¹⁾。以下簡単にその方法について述べる。材料には、水痘性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus; VSV)に感染した15B株より調製したゴルジ体画分(ドナー・ゴルジ)と、非感染のCHO-K1株から調製したゴルジ体画分(アクセプター・ゴルジ)を用いる。15B株は、ゴルジ体中間部に存在するN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)転移酵素Iを欠損している。したがって、VSVに感染した15B株では、VSV由来の糖蛋白質(VSV-G蛋白質)は、ゴルジ中間部での通常の修飾であるGlcNAcの転移を受けずに分泌経路を経て細胞表面に輸送されていく。アクセプター・ゴルジとドナー・ゴルジをATP、細胞質画分の蛋白質、ならびにUDP-[³H]GlcNAcとともに保温すると、VSV-G蛋白質に[³H]GlcNAcが転移される。この[³H]GlcNAcの転移は、VSV-G蛋白質が、15B株由来のゴルジ体からCHO-K1株由来のゴルジ体へ輸送

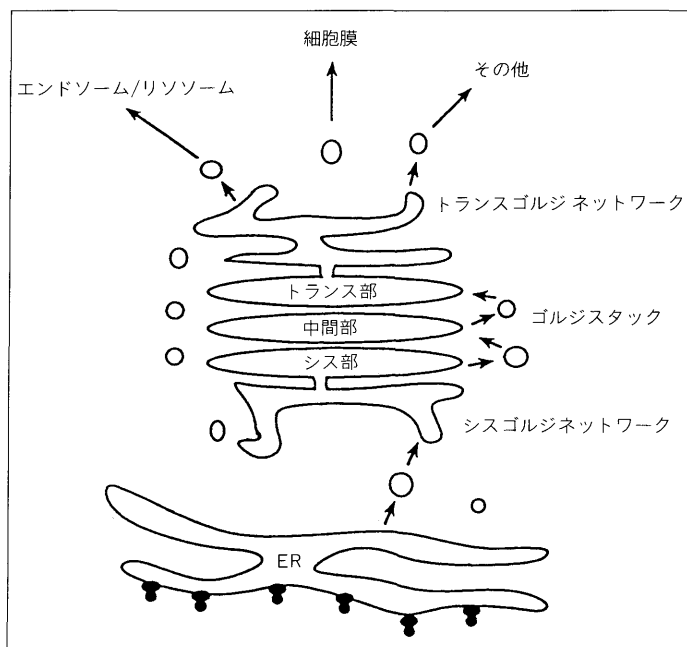


図 2 分泌経路の概要

細胞膜、リソソーム、分泌顆粒、ゴルジ体に存在する膜蛋白質と可溶性蛋白質の多くは、小胞体で合成されたのちに輸送小胞を介してそれら固有の場所に輸送される。

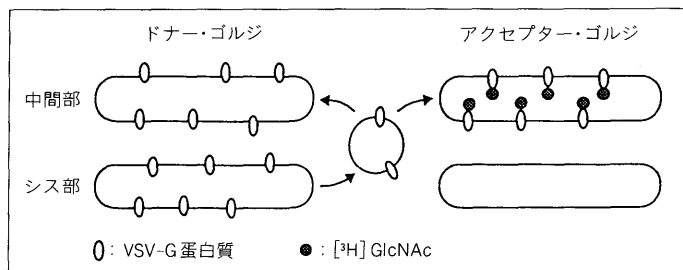


図3 ゴルジ層板間の蛋白質輸送反応を測定する方法の模式図

VSVに感染した15B株から調製したドナー・ゴルジと非感染のCHO-K1株から調製したアクセプター・ゴルジをATP、細胞質画分の蛋白質、ならびにUDP-[^3H]GlcNAcとともに保温すると、VSV-G蛋白質に[^3H]GlcNAcが転移する。ドナー・ゴルジは[^3H]GlcNAcの転移を触媒する酵素を欠損しているため、この反応は、VSV-G蛋白質がドナー・ゴルジからアクセプター・ゴルジに輸送されてはじめて起こる反応と考えられる。したがって、VSV-G蛋白質に結合した[^3H]GlcNAcの放射活性を測定することにより、どの程度輸送が起こったかを調べることができる。もちろんこの反応系では、ドナー・ゴルジ層板間での輸送も生じるものと思われる。

された結果生じたものと思われる(図3)。そこで、反応終了後VSV-G蛋白質を抗体を用いて沈降させ、その放射活性を調べることにより、輸送反応を測定することができる。さらにRothmanらは、この無細胞系反応を生化学的手法、および電子顕微鏡を用いた形態学的手法により解析し、図4に示されるような蛋白質輸送のモデルを提唱した²⁾。このモデルによると、蛋白質輸送は、脂質二重膜とそれを覆う蛋白質(コート蛋白質)により構成される被覆小胞のドナーコンパートメント膜からの発芽、ピンチングオフ、ターゲッティング、脱コート、ならびにアクセプターコンパートメント膜との融合という一連のステップを経て行なわれる。単離したゴルジ体と細胞質蛋白質をATP存在下に保温すると、これらの一連の反応が進行し、小胞に取り込まれた可溶性蛋白質と膜蛋白質がゴルジ層板間を移行してゆくものと考えられている。この反応系にGTPの非加水分解性類似物であるGTP γ Sを加えると脱コートが阻害され、被覆小胞が蓄積してくる^{2,3)}。そしてそのGTP γ Sの効果を利用してゴルジ体由来の被覆小胞が分離された^{4,5)}。得られた被覆小胞は、蛋白質輸送に関与する被覆小胞として従来から知られていたクラスリン被覆小胞とはコート蛋白質が異なることが示された⁶⁾。クラスリン被覆小胞は、クラスリンおよびクラスリンアダプター複合体とよばれる蛋白質をコート蛋白質として有し、TGNと後期エンドソームおよび分泌顆粒間、さらに細胞質膜と初期エンドソーム間の輸送に

関与することが知られている。ゴルジ体由来の被覆小胞は、それぞれ α 、 β 、 β' 、 γ 、 δ -COP (coat protein) と名づけられた見かけの分子量160K、110K、110K、98K、61Kの蛋白質といくつかの種類の低分子量蛋白質により被覆されていることが示唆された^{5,7)}。これらの低分子量蛋白質には、ADP-ribosylation factor (ARF)が含まれていることも明らかにされた⁸⁾。ARFは、コレラ毒素による蛋白質のADP-リボシル化に必要なコファクターとして発見された蛋白質であり、GTPase活性を有することが知られていたが、その生理的機能は明らかにされていなかった(ARFの役割については後で述べる)。現在、このようにして見いださ

れた非クラスリン被覆小胞は、COP被覆小胞とよばれている。

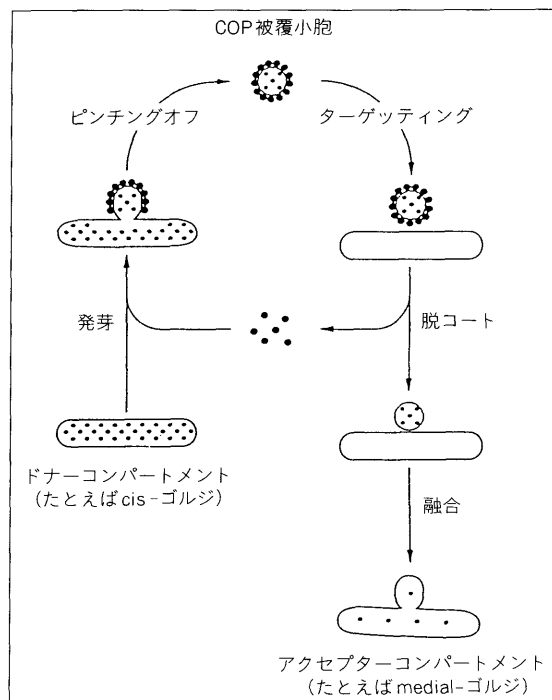


図4 COP被覆小胞を介した蛋白質輸送機構のモデル(文献2より引用改変)

この一連の反応により輸送される蛋白質(小さな黒丸)がコンパートメント間を移行していくものと考えられている。大きな黒丸はコート蛋白質を示す。

II. コートマー：コート蛋白質複合体

β -COP はゴルジ体膜と COP 被覆小胞に存在するが、さらに細胞質画分にもコートマーと名づけられた 650 ～700K の蛋白質複合体として存在する⁹⁾。コートマーは、ウシ脳より最初に精製され、その蛋白質組成が、COP 被覆小胞の主要蛋白質と非常に類似していることが明らかにされた。 α -, β -, β' -, γ -, δ -COP と同じ分子量の蛋白質、および 36K, 35K, 20K の蛋白質からコートマーは構成されている^{7,9)}。20K 蛋白質はその分子量が ARF と類似しているものの ARF とは異なる蛋白質であり¹⁰⁾、35K 蛋白質は 36K 蛋白質の分解産物であることもの実験により明らかにされた¹¹⁾。コートマーの 2 種類の 110K 蛋白質、および 98K, 36K, 20K 蛋白質に対する抗体が調製され、これらの抗体はそれぞれ COP 被覆小胞に存在する同じ分子量の蛋白質、すなわち β -, β' -, γ -, ϵ -, ζ -COP を認識することが示された^{7,10-13)}。また、2 種類の 110K 蛋白質、および 98K 蛋白質に関しては COP 被覆小胞、ならびにコートマーから精製した蛋白質の部分アミノ酸配列が互いにそれぞれ一致することも明らかにされた。これらの知見に加え、 $[^{35}\text{S}]$ 標識したコートマーを用いた筆者らの実験によりコートマーの各サブユニットは COP 被覆小胞の各コート蛋白質 (COPs) と同一蛋白質であることが証明された¹¹⁾。筆者らは、まず最初に、 $[^{35}\text{S}]$ コートマーを調製するために、簡単なコートマーの精製法を開発した。 ϵ -COP の cDNA を利用し、6 個のヒスチジン残基が N 末端近傍に付加された組換え体 ϵ -COP を CHO-K1 細胞において発現したところ、大部分のコートマーが組換え体 ϵ -COP を有し、その 6 個のヒスチジン残基と Ni^{2+} のアフィニティを利用して部分精製できることが示された。そこで、組換え体 ϵ -COP を発現している CHO-K1 細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニン存在下に培養し、その細胞質画分から Mono Q イオン交換クロマトグラフィー、および Ni^{2+} アフィニティクロマトグラフィーを用いた 2 つのステップで $[^{35}\text{S}]$ コートマーを精製した (図 5)。得られた $[^{35}\text{S}]$ コートマーとゴルジ膜を用いて COP 被覆小胞を無細胞系で調製したところ、すべての $[^{35}\text{S}]$ コートマーサブユニットが COP 被覆小胞に組み込まれた。さらにこのとき、COP 被覆小胞上の $[^{35}\text{S}]$ コートマーの各サブユニット蛋白質の比率は、被覆小胞

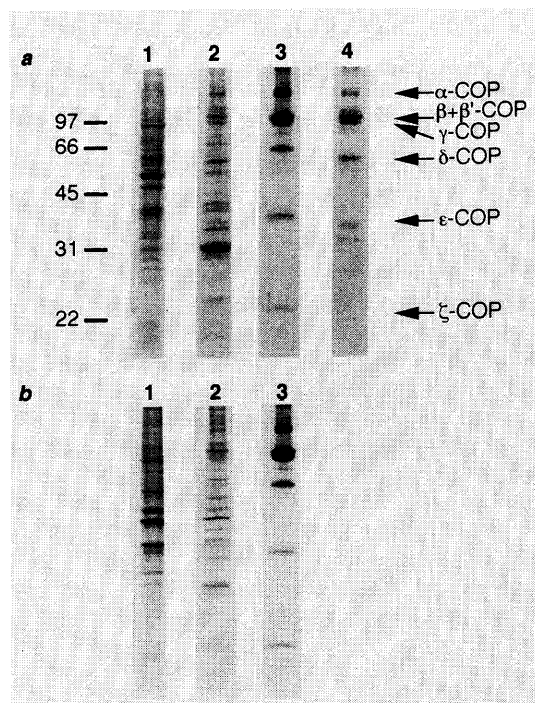


図 5 $[^{35}\text{S}]$ コートマーの精製

(a) 精製過程の蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後クマーシーブルーで染色した。レーン 1: 組換え体 ϵ -COP も発現している CHO 細胞の細胞質画分, レーン 2: mono Q カラムクロマトグラフィーにおけるコートマー画分, レーン 3: レーン 2 の蛋白質から Ni^{2+} カラムクロマトグラフィーにより精製したコートマー, レーン 4: ウシ脳細胞質画分から従来の方法で精製したコートマー。(b) (a) のオートラジオグラム。

の調製を無標識のコートマー存在下と非存在下に行なっても同じであり、 ζ -COP を除き、遊離の $[^{35}\text{S}]$ コートマーのサブユニットの比率とほぼ同様であった (表 1)。これらの結果から、コートマーの各サブユニットは COP 被覆小胞の各コート蛋白質 (COPs) と同一蛋白質であることが明白となり、コートマーは、サブユニットの交換を行わずに 1 つの単位としてまると COP 被覆小胞に組み込まれることが示唆された。したがって、COP 被覆小胞の形成には、細胞質に存在するコートマーがゴルジ膜へ結合することが必要であると推察された。

III. コートマーのゴルジ膜への結合

ゴルジ膜と細胞質画分を保温すると、細胞質に存在

表 1 コートマー・サブユニットの比率

	α -COP	β -+ β' -COP	γ -COP	δ -COP	ξ -COP	ϵ -COP
1: 精製 [35 S] コートマー	1	3.1	1.5	2.5	3.0	2.6
2: ゴルジ膜に結合した [35 S] コートマー	1	2.6	1.3	2.4	2.6	2.8
3: 被覆小胞に取り込まれた [35 S] コートマー (無標識のコートマーを枯渇した細胞質画分を用いて被覆小胞を調製した)	1	2.5	1.6	3.5	3.9	5.9
4: 被覆小胞に取り込まれた [35 S] コートマー (無標識のコートマーを含む細胞質画分を用いて被覆小胞を調製した)	1	2.6	1.7	3.3	3.9	5.8

注) すべてのサブユニットのメチオニン含量が明らかにされていないので、各段階におけるコートマーのサブユニット量 (phosphorimager で測定した [35 S] の量を各サブユニットの分子量で割った) を α -COP の量を用いて標準化した。したがって、表示した値は正確なモル比ではない。

するコートマーがゴルジ膜に結合する¹⁴⁻¹⁶⁾。この結合は、GTP γ S の添加により著しく増加し、コートマー以外に低分子量の細胞質性蛋白質を必要とする。この低分子量蛋白質の要求性はミリストイル化された ARF (mARF) の添加により補われることから、コートマーのゴルジ膜への結合には mARF が必要であることが示された。さらに、精製したコートマーと mARF を用い、コートマーのゴルジ膜への結合に必要な細胞質性因子はコートマー自身と mARF のみであること、またその結合は飽和性の結合で、ゴルジ膜のプロテアーゼ処理により検出できなくなることが明らかにされた^{15,16)}。一方、mARF 自身もゴルジ膜に結合し、その結合は、GTP γ S の添加で増加し、飽和性の結合で、膜のプロテアーゼ処理により阻害されることも示された¹⁷⁾。これらの結果に加え、GTP γ S 存在下に mARF と前処理したゴルジ膜にコートマーが効率よく結合することから、コートマーの結合には膜に結合した mARF が関与するものと思われた。mARF 自身がコートマーの受容体として働いているのか、あるいはほかにコートマーの受容体が存在するののかという問題は未解決であり、また mARF の受容体に関してもその同定・精製が今後の課題である。

IV. COP 被覆小胞の発芽と形成

Orci らは、ゴルジ体膜をコートマー、mARF、GTR γ S、ATP、およびパルミトイル CoA とともに保温すると、COP 被覆小胞が形成されることを、電子顕微鏡を用いて形態学的に明らかにした¹⁸⁾。また、この反応系に細胞質画分を添加しても形成される COP 被覆小胞の顕著な増加は観察されない。この結果から、COP

被覆小胞の形成に必要な細胞質性蛋白質はコートマーと mARF のみであることが示唆された。さらに、ゴルジ体膜および精製したコートマーと mARF を用い以下のことが示された¹⁹⁾。

(1) 細胞質画分の代わりにこれらの精製した蛋白質を用いると、COP 被覆小胞の蓄積に GTP γ S のみならず GTP も有効に作用する。これはおそらく、mARF に結合した GTP の加水分解を促進する細胞質性の脱コートに関与する因子が反応系から除かれたことによるものと思われる。

(2) コートマーと GTP 結合型 mARF が COP 被覆小胞の発芽のステップに必要で、次のステップであるゴルジ膜からの小胞の分裂 (fission) にアシル CoA が必要である。また、このいずれのステップにも ATP は必須でない。

アシル CoA の役割は明らかにされていないが、小胞の分裂に関与する蛋白質がアシル化により活性化されるのかもしれない。

(3) GTP の存在下に精製蛋白質により形成・蓄積された COP 被覆小胞は、機能的に活性を保っている。すなわち、このようにして得た COP 被覆小胞をいったん単離し、ゴルジ膜および細胞質画分とともに保温すると、小胞に取り込まれた蛋白質がゴルジ体へ移行する。

これらの結果から考えられた COP 被覆小胞の形成機構のモデルを図 6 に示す。

V. ξ -COP

ここで、筆者らが cDNA クローニングを行なった ξ -COP に関して述べてみたい¹⁰⁾。筆者らは、ウシ肝臓の

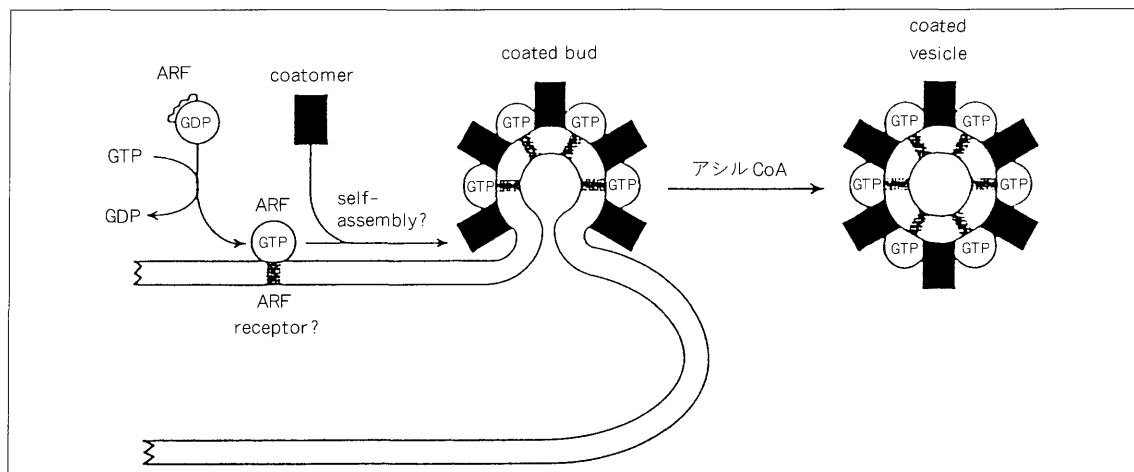


図 6 COP 被覆小胞形成のモデル (文献 19 より引用改変)

細胞質に存在するミリスチル化 ARF (mARF) に結合した GDP が GTP に交換されたのちに、受容体を介して mARF が膜に結合する。コートマーが膜に結合した mARF (およびほかの膜蛋白質) を認識し、おそらくセルフアセンブリーによりコーティッドバッドが形成される。続いて COP 被覆小胞が膜から分裂 (fission) するが、このステップはアシル CoA を必要とし、また ATP により促進される。

ξ -COP の部分アミノ酸配列を決定し、その配列を利用して ξ -COP cDNA をウシ肝臓 cDNA ライブラリーから分離した。得られた cDNA の塩基配列より、 ξ -COP は 177 個のアミノ酸からなる分子量約 20K の蛋白質であることが推定された。ホモロジー検索の結果、 ξ -COP は、AP17 ならびに AP19 と名づけられたクラスリンアダプター複合体のサブユニットにアミノ酸配列上で類似性を有することが明らかとなった。クラスリンアダプター複合体は、クラスリン重鎖と軽鎖を膜に結合させるアダプターとして働いており、細胞質膜に存在する AP2 と TGN に存在する AP1 とが知られている。AP17 と AP19 は、それぞれ AP2 と AP1 のサブユニットである。 ξ -COP とこれらの蛋白質の間に類似性が存在することから、COP 被覆小胞とクラスリン被覆小胞の形成機構と機能が互いに類似している可能性が考えられた。この可能性は、以下に述べる事実からも支持されている。① COP 被覆小胞とクラスリン被覆小胞のコート蛋白質は、分子量が互いに類似した複数のコート蛋白質から構成されている⁵⁾。② β -COP と AP2 のサブユニットである β -アダプチンの間にもアミノ酸配列上で類似性が見られる¹²⁾。③ コートマーならびに AP1 のゴルジ膜への結合に mARF が関与している²⁰⁾。

大腸菌で発現した ξ -COP を抗原に用いて ξ -COP に対する抗体を調製したところ、その抗体は、コートマーのゴルジ膜への結合と COP 被覆小胞の形成を阻害し

た¹⁰⁾。したがって、 ξ -COP は COP 被覆小胞の形成に必要なコートマーのサブユニットの 1 つであると考えられる。興味深いことに、 ξ -COP は、ほかのコートマーサブユニットとは異なり、コートマーに組み込まれたものと遊離のものが細胞質に存在する。ひとつの可能性として、 ξ -COP を有するコートマーのみが活性をもち、 ξ -COP がコートマーの活性を調節していることも考えられる。

VI. 小胞輸送におけるコート蛋白質(コートマーと ARF) の役割

Rothman らは、ゴルジ層板間の蛋白質輸送に必要な最小限と思われる細胞質性蛋白質を、先に述べた [^3H] GlcNAc の VSV-G 蛋白質への転移を指標にした測定と系統だった細胞質蛋白質の分画により、精製あるいは部分精製した。その結果、おどろいたことに、それらの因子のなかに、コートマーと ARF が含まれないことが示された²¹⁾。しかしながら、それら因子のみで起こる VSV-G 蛋白質への [^3H] GlcNAc の転移は、輸送小胞を介せずにゴルジ層板が直接融合した結果によることが示唆された²¹⁾。さらに、それら必要最小限な因子に加え、コートマーと ARF および RF (releasing factor) と名づけられた部分精製蛋白質を加えると VSV-G 蛋白質への [^3H] GlcNAc の転移が輸送小胞を介し

てなされることも示唆された²¹⁾。この結果から、コートマーと ARF は、ゴルジ層板間の非特異的な融合を防ぐために、輸送小胞の形成が完了したのちにはじめて融合を開始させるという働きを有していることが示唆された。さらに、COP 被覆小胞がアクセプターコンパートメントと融合するためには、コート蛋白質が COP 被覆小胞から取り除かれる必要があり (図 4 参照), この脱コートに ARF に結合した GTP の加水分解が必要であることも変異型の ARF を用いて示唆された²²⁾。野生型の ARF は GTPase 活性を有しているが、用いられた変異 ARF は、GTP 結合能を有するものの GTPase 活性を有さない。この変異 ARF 存在下におけるゴルジ層板間の蛋白質輸送を無細胞系で調べると、輸送が阻害されるとともに COP 被覆小胞が蓄積することが示された。先に述べたように、COP 被覆小胞の形成に GTP 結合型の ARF が必要なことから、ARF は、被覆小胞の形成と脱コートという 2 つのステップで重要な役割を演じているものと思われる。

VII. 抗 β -COP 抗体を用いた COP 被覆小胞の機能解析

Balch らは、セミインタクト細胞を用いて、ER から cis-ゴルジへの蛋白質輸送を測定する方法を開発し、その輸送反応に対する抗 β -COP 抗体の影響を調べた²³⁾。その結果、6 個の異なる抗 β -COP 抗体が蛋白質輸送を阻害することが明らかとなり、COP 被覆小胞はゴルジ層板間の蛋白質輸送のみではなく、ER から cis-ゴルジへの蛋白質輸送にも関与することが示唆された。

Kreis らは、生細胞を用いて抗 β -COP 抗体の蛋白質輸送に対する影響を調べた²⁴⁾。温度感受性の水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus; VSV) である ts-O45 VSV を Vero 細胞に感染させ、細胞をウイルスにとって非許容温度である 39.5°C、あるいは細胞機能を低下させる 15°C または 20°C で培養すると、ウイルスの糖蛋白質 (ts-O45-G) がそれぞれ分泌経路の中間コンパートメントである ER、CGN、および TGN に蓄積する。さらに細胞を 31°C に戻して培養すると、これらのコンパートメントに蓄積した ts-O45-G は細胞表面に輸送される。この現象を利用し、抗 β -COP 抗体の蛋白質輸送に対する影響がマイクロインジェクションにより調べられた²⁴⁾。その結果、抗 β -COP 抗体は ts-

O45-G の ER および CGN から細胞表面への輸送を阻害することが明らかにされた。さらに、抗 β -COP 抗体により輸送を阻害された ts-O45-G は cis-ゴルジで受ける糖鎖の修飾を受けておらず、抗 β -COP 抗体が ER から cis-ゴルジへの蛋白質輸送を阻害することも明らかにされた。この結果は、COP 被覆小胞の蛋白質輸送への関与を動物細胞を用いて *in vivo* において初めて示唆したものである。また、抗 β -COP 抗体は、TGN から細胞表面への輸送は阻害せず、ER から TGN への輸送機構と TGN から細胞表面への輸送機構が異なることも示唆された。

VIII. コートマー変異株

Krieger らは、細胞表面膜に存在する低密度リポ蛋白質 (LDL) 受容体を介した LDL の取り込みが低下した変異株を CHO-K1 細胞株から数種類分離した²⁵⁾。それらの変異株のなかで、1d1F と名づけられた変異株は、 ϵ -COP に変異を有することが示唆された²⁶⁾。1d1F 株は、温度感受性の変異株で、高温では LDL の取り込みが低下するとともに蛋白質の分泌が著しく低下する。Krieger らは、1d1F 株の高温における致死性を相補する cDNA クローンを分離し、その塩基配列から得られた cDNA が ϵ -COP をコードすることを明らかにした。さらに、 ϵ -COP cDNA を導入した 1d1F 株は、蛋白質の分泌に異常を示さないことも示された。この結果からも、COP 被覆小胞が蛋白質輸送に関与することが強く示唆された。

分泌経路に関与する遺伝子が、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において多数同定されている。その遺伝子の 1 つである SEC21 は、ER からゴルジ体への蛋白質輸送に関与しており、高等動物細胞の γ -COP ホモログをコードすることが示された。さらに、酵母にもコートマーが存在し、Sec21 蛋白質は、そのサブユニットの 1 つであることも明らかにされた^{13,27)}。続いて、酵母の β -COP と β' -COP をコードする遺伝子 (SEC26 と SEC27) が同定・分離され、これらの遺伝子は、細胞増殖と ER からゴルジ体への蛋白質輸送に必須の遺伝子であることが示された²⁸⁾。また、酵母には 2 種類の ARF 遺伝子 (ARF1 と ARF2) が存在し、これらの遺伝子は、蛋白質輸送に関与し、2 つの遺伝子を同時に破壊すると致死性となることも明らかにされている²⁹⁾。さらに

最近、酵母の α -COP 変異株も分離された (α -COP 変異株については後述)。

IX. ゴルジ体から ER への蛋白質逆輸送における COP 被覆小胞の役割

ER への蛋白質局在化シグナルとして 2 つのアミノ酸配列が知られている。1 つは、ER 内腔の可溶性蛋白質の C 末端に存在する Lys-Asp-Glu-Leu という配列で、もう 1 つは、ER 膜に存在するいわゆるタイプ I の膜蛋白質(膜を 1 回貫通し、その N 末端と C 末端をそれぞれ ER 内腔と細胞質側に露出している蛋白質)の C 末端から 3 番目と 4 番目、あるいは、3 番目と 5 番目にリジンが存在するという配列(ジリジンモチーフ)である^{30,31)}。ジリジンモチーフは、アデノウイルス由来の蛋白質である E3/19K において最初に見いだされ、ジリジンモチーフを欠失した変異 E3/19K 蛋白質は ER に留まらずに細胞表面に輸送されることが示されている³²⁾。また、本来細胞質膜に存在する膜蛋白質の細胞質側ドメインをジリジンモチーフを含む配列に置換した蛋白質(以下ジリジン融合蛋白質)は、ER に留まることも知られている^{30,31)}。さらに、ジリジン融合蛋白質は、実は ER にずっと留まっているのではなく、ゴルジ体へ移行するものの速やかに ER に逆輸送されることによって見かけ上 ER に留まっているということが明らかにされている³³⁾。最近、コートマーがジリジンモチーフを含むペプチドに *in vitro* において特異的に結合することが報告された³⁴⁾。さらに、酵母の α -COP、 β' -COP、および γ -COP 変異株がジリジン融合蛋白質の ER への逆輸送に損傷を有すること、ならびに、 α -COP と β' -COP 変異株のコートマーは、ジリジンモチーフに *in vitro* において結合できないことも報告された³⁵⁾。これらの結果から、COP 被覆小胞がゴルジ体から ER への蛋白質逆輸送に関与することが明らかと思われる。

以上に述べた結果から、COP 被覆小胞は、進化的によく保存されており、ER からゴルジ体、ゴルジ層板間、およびゴルジ体から ER への蛋白質輸送に必須な輸送小胞であることが明らかとなった。

おわりに 最近、クラスリン被覆小胞と COP 被覆小胞とも異なる 3 番目の被覆小胞(COP II 被覆小胞)が、酵

母を用いて同定された³⁶⁾。COPII 被覆小胞は、Sar1, Sec13, Sec23, Sec24, Sec31 と名づけられた蛋白質により被覆されており、ER からゴルジ体への蛋白質輸送に関与する³⁷⁾。動物細胞の Sar1, Sec13, および Sec23 ホモログも同定されており、Sar1 蛋白質が ER からゴルジ体への蛋白質輸送に関与することは、動物細胞を用いても明らかにされている³⁸⁾。今後、COP と COPII 被覆小胞が、ER からゴルジ体への蛋白質輸送においてそれぞれどのような役割を担っているのかを明らかにすることが重要な課題と思われる。また、輸送小胞のターゲティングと融合に関する知見も蓄積してきている³⁹⁾。SNARE ならびに Rab/Ypt とよばれるファミリーに属する蛋白質と NSF および SNAP と名づけられた蛋白質が輸送小胞のターゲティングと融合に関与することが示唆されている。これらの蛋白質、および COP と COPII 被覆小胞の機能が、近い将来、総合的に解明されるものと思われる。

文 献

- 1) Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A., Rothman, J. E. : *Cell*, **39**, 405-416 (1984)
- 2) Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., Rothman, J. E. : *Cell*, **56**, 357-368 (1989)
- 3) Melancon, P., Glick, B. S., Malhotra, V., Weidman, P. J., Serafini, T., Gleason, M. L., Orci, L., Rothman, J. E. : *Cell*, **51**, 1053-1062 (1987)
- 4) Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C., Rothman, J. E. : *Cell*, **58**, 329-336 (1989)
- 5) Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J. E., Wieland, F. T. : *Nature*, **349**, 215-220 (1991)
- 6) Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., Rothman, J. E. : *Cell*, **46**, 171-184 (1986)
- 7) Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., Herrmann, D., Lottspeich, F., Orci, L., Wieland, F. T. : *EMBO J.*, **12**, 2841-2845 (1993)
- 8) Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, A., Rothman, J. E. : *Cell*, **67**, 239-253 (1991)
- 9) Waters, M. G., Serafini, T., Rothman, J. E. : *Nature*, **349**, 248-251 (1991)
- 10) Kuge, O., Hara-Kuge, S., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Tanigawa, G., Wieland, F. T., Rothman, J. E. : *J. Cell Biol.*, **123**, 1727-1734 (1993)
- 11) Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Wieland, F. T., Rothman, J. E. : *J. Cell Biol.*, **124**, 883-892 (1994)

- 12) Duden, R., Griffith, G., Frank, R., Argos, P., Kreis, T. E. : *Cell*, **64**, 649-665 (1991)
- 13) Stenbeck, G., Schreiner, R., Herrmann, D., Auerbach, S., Lottspeich, F., Rothman, J. E., Wieland, F. T. : *FEBS Lett.*, **314**, 195-198 (1993)
- 14) Donaldson, J. G., Kahn, R. A., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R. D. : *Science*, **254**, 1197-1199 (1991)
- 15) Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A., Klausner, R. D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6408-6412 (1992)
- 16) Palmer, D. J., Helms, J. B., Beckers, C. J., Orci, L., Rothman, J. E. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 12083-12089 (1993)
- 17) Helms, J. B., Palmer, D. J., Rothman, J. E. : *J. Cell Biol.*, **121**, 751-760 (1993)
- 18) Orci, L., Palmer, D. J., Amherdt, M., Rothman, J. E. : *Nature*, **364**, 732-734 (1993)
- 19) Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z., Rothman, J. E. : *Cell*, **75**, 1015-1025 (1993)
- 20) Stamnes, M. A., Rothman, J. E. : *Cell*, **73**, 999-1005 (1993)
- 21) Elazar, Z., Orci, L., Ostermann, J., Amherdt, M., Tanigawa, G., Rothman, J. E. : *J. Cell Biol.*, **124**, 415-424 (1994)
- 22) Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B., Rothman, J. E. : *J. Cell Biol.*, **123**, 1365-1371 (1993)
- 23) Peter, F., Plutner, H., Zhu, H., Kreis, T. E., Balch, W. E. : *J. Cell Biol.*, **122**, 1155-1167 (1993)
- 24) Pepperkok, R., Scheel, J., Horstmann, H., Hauri, H. P., Griffiths, G., Kreis, T. E. : *Cell*, **74**, 71-82 (1993)
- 25) Hobbie, L., Fisher, A. S., Lee, S., Flint, A., Krieger, M. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 20958-20970 (1994)
- 26) Guo, Q., Vasile, E., Krieger, M. : *J. Cell Biol.*, **125**, 1213-1224 (1994)
- 27) Hosobuchi, M., Kreis, T. E., Sheckman, R. : *Nature*, **360**, 603-605 (1992)
- 28) Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B., Schekman, R. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 24486-24495 (1994)
- 29) Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D., Kahn, R. A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1238-1242 (1990)
- 30) Nilsson, T., Jackson, M., Peterson, P. A. : *Cell*, **58**, 707-718 (1989)
- 31) Jackson, M., Nilsson, T., Peterson, P. A. : *EMBO J.*, **9**, 3153-3162 (1990)
- 32) Pääbo, S., Baht, B. M., Wold, W. S. M., Peterson, P. A. : *Cell*, **50**, 311-317 (1987)
- 33) Jackson, M., Nilsson, T., Peterson, P. A. : *J. Cell Biol.*, **121**, 317-333 (1993)
- 34) Cosson, P., Letourneur, F. : *Science*, **263**, 1629-1631 (1994)
- 35) Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., Cosson, P. : *Cell*, **79**, 1199-1207 (1994)
- 36) Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. : *Cell*, **77**, 895-907 (1994)
- 37) Barlowe, C. : *FEBS Lett.*, **369**, 93-96 (1995)
- 38) Kuge, O., Dascher, C., Orci, L., Rowe, T., Amherdt, M., Plutner, H., Ravazzola, M., Tanigawa, G., Rothman, J. E., Balch, W. E. : *J. Cell Biol.*, **125**, 51-65 (1994)
- 39) Rothman J. E. : *Nature*, **372**, 55-63 (1994)

公 募

医薬品開発研究員

職 種：ドラッグデザイン研究者
 資 格：①薬・理工学系出身者（大学院修了以上），②ドラッグデザイン経験者，③長期海外勤務（米国）可能者
 年 齢：35歳まで
 勤務地：中央研究所（茨城県北相馬郡守谷町）
 連絡先：〒153 東京都目黒区三田1-6-21
 伊藤ハム(株)人事課 Tel.03-3710-6171

お知らせ

生理学研究所研究会 シナプスの形成・維持・可塑性

と き：1995年12月14日～15日
 場 所：生理学研究所
 神経回路の発生・可塑性におけるシナプス形成機構に関する講演を予定
 問合せ先：群馬大学医学部 白尾智明
 Tel.0272-20-8052 FAX 0272-35-8669
 E-mail：tshirao@sb.gunma-u.ac.jp