

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07386

研究課題名(和文)再構成アプローチから迫る細胞内膜テザリング・膜融合の分子機構

研究課題名(英文) Reconstitution of the molecular machinery of intracellular membrane tethering and fusion

研究代表者

三間 穰治 (Mima, Joji)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：30335301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトをはじめ全ての真核細胞は、時空間的に非常に厳密に制御された細胞内膜交通・小胞輸送により、細胞を構成する多種多様な物質を、細胞小器官オルガネラ群等へと精確に運搬・配置・分泌する。膜テザリングおよび膜融合は、膜交通・小胞輸送における主要な素反応であり、その場所選択性の決定に非常に重要な過程である。本研究課題では、Rab/SNARE再構成プロテオリボソーム実験系を駆使した生化学解析を精力的に展開し、ヒトRabタンパク質が駆動する膜テザリング反応および出芽酵母SNAREタンパク質が駆動する膜融合反応について、新たな分子レベルの仕組みを明らかにするとともに、新たな実験手法の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト細胞を含め全ての真核細胞は複雑な内膜系をもち、多種多様な物質を、各オルガネラや細胞外へと選択的に運搬している。この時空間的に高度に制御された細胞内物質輸送は、細胞内膜交通・小胞輸送と称され、正常な細胞機能に必要な不可欠である。さらに、膜交通の必須因子で、本課題で対象とするRabおよびSNAREタンパク質群は、近年、ガンや神経変性疾患など、様々な疾病・疾患の発症に関与することも報告されている。本課題では、世界初の独自開発したヒトRab再構成プロテオリボソーム解析系をはじめ、再構成アプローチを駆使することで、独創的な基礎研究の成果を生み出している。

研究成果の概要(英文)：Membrane tethering and fusion processes are a highly regulated event that occurs during the physical contact and merging between transport carriers and target membrane compartments, thereby ensuring the spatiotemporal specificity of intracellular membrane trafficking. Nevertheless, how essential protein components, such as SNARE-family proteins and Rab-family small GTPases, directly act upon the tethering and fusion events remains enigmatic. Here, we investigated the molecular basis of membrane tethering and fusion by comprehensively and quantitatively evaluating the intrinsic capacities of representative human Rab-family proteins and yeast SNARE-family proteins to physically tether or fuse two distinct membranes in a chemically defined reconstitution system. Comprehensive reconstitution experiments provided novel mechanistic insights into Rab-mediated membrane tethering and SNARE-mediated membrane fusion reactions.

研究分野：膜蛋白質化学

キーワード：膜交通 小胞輸送 膜融合 膜テザリング Rab SNARE 低分子量Gタンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトなどの高等動物から単細胞微生物の出芽酵母に至るまで、それらを構成する全ての真核細胞は、細胞小器官(オルガネラ)群をはじめ、多様な機能と膜形態をもつ複雑な細胞内膜系を持つ。そして、細胞内膜系は、真核細胞に普遍的で正常な細胞機能に必要な不可欠であり、各細胞内膜画分(各オルガネラ等)への蛋白質・脂質等の細胞内物質輸送は、時空間的に高度に制御されなければならない。本研究課題では、この「細胞内物質を“適切なタイミング”で“適切な場所”へ運搬・輸送する仕組み」、つまりは、「細胞内膜交通・小胞輸送」の細胞内コンパートメント特異性・選択性を司る分子機構の徹底的な解剖を目指す。特に、細胞内膜交通における目的地(各オルガネラ・細胞質膜・細胞外分泌)の選択性・特異性を規定する上で非常に重要であり、膜交通の最終段階といえる膜テザリング(膜繫留)・膜融合反応の駆動と制御の分子機構に焦点を当てる。細胞内膜交通・小胞輸送における膜テザリング~膜融合の過程に関与する中心的なタンパク質因子群やその作用機序は、基本的に全ての真核生物で保存されていると考えられ、SNAREファミリータンパク質、SNARE結合性シャペロンタンパク質(Sec1/Munc18ファミリーなど)、Rabファミリー低分子量GTPase、そしてRab結合性エフェクタータンパク質(テザリング因子・テザリング複合体など)が、膜テザリング~膜融合反応に必須のタンパク質因子として同定されてきた。現在まで国内外の研究室から遺伝学的・細胞生物学的・生化学的解析による研究成果が数多く報告され、様々な仮説・モデルも提唱されたが、SNAREやRabGTPaseの実際の分子機能・役割をはじめ、膜テザリング~膜融合過程の基本的な原理は数多くの議論が残ったままである。

### 2. 研究の目的

ヒトから酵母に至るまで、細胞小器官オルガネラ群を中心に複雑な内膜系をもつ全ての真核細胞において、時空間的に高度に制御された細胞内膜交通・小胞輸送(メンブレントラフィック)は、各オルガネラ・細胞質膜・細胞外への特異的・選択的な物質輸送(蛋白質・脂質・ホルモンなど)の中核を担い、正常な細胞機能に必要な不可欠である。本研究では、この細胞内膜交通に必須かつ根源的な素反応である膜テザリング・膜融合反応に焦点を当て、膜交通の特異性・選択性を決定するその分子機構の詳細な解剖に挑戦する。その為に、従来からの主力である生細胞や細胞から単離したオルガネラを材料とする研究ではなく、精製・純化した膜タンパク質因子群と人工脂質二重膜リポソームを用いた化学的に純粋な実験系である「再構成プロテオリポソーム系」を実験手法の中心とする。再構成系を駆使することにより、膜テザリング・膜融合反応における個々のタンパク質因子(SNAREファミリーやRabGTPaseファミリーなど)の具体的な分子機能、そして膜テザリング・膜融合の細胞内コンパートメント特異性・選択性を制御する分子基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では、精製・純化したタンパク質因子群(膜タンパク質を含む)と人工脂質二重膜リポソームを用いて「細胞内膜テザリング~膜融合反応」の過程を試験管内で再現する、再構成プロテオリポソーム系を実験アプローチの中核として縦横無尽に駆使する。

具体的な研究課題・トピックとして、(1)膜テザリング・膜ドッキング・膜融合反応を直接的に駆動する最小分子マシナリーの探索・解析、(2)膜テザリング・膜ドッキング・膜融合過程における膜交通の細胞内コンパートメント特異性・選択性決定の分子機構、これら2つの細胞内膜交通分野の根源的なテーマを探究する。主となる研究方法の概略は以下のとおりである。

(1)膜テザリング・膜ドッキング・膜融合タンパク質因子群のリコンビナント蛋白質大量発現・精製系の構築：30種類以上のヒトSNAREおよび60種類以上のヒトRabGTPaseの中から代表的なヒトSNAREとRabGTPaseを選択し、それらの大腸菌pETベクター系を使用した大量発現・精製系を確立する。SNAREについては、申請者が既に確立した出芽酵母由来のSNAREタンパク質発現・精製系のノウハウを基盤に効率的に展開することが可能である(Izawa et al, JBC, 2012; Furukawa & Mima, Sci Rep, 2014)。また、RabGTPaseについては、既に当研究室でエンドソーム系を中心に7種類のヒトRabGTPaseの発現・精製さらには機能解析に成功しており(Tamura & Mima, Biol Open, 2014)。既存のヒトRabGTPaseタンパク質発現・精製系を、ER-Golgiおよびエキソサイトーシス系を含めた他のヒトRabGTPaseファミリーに拡張する。

(2)ヒトSNARE/Rab再構成プロテオリポソーム膜テザリング・膜融合解析：再構成ヒトSNAREリポソームは、これまで酵母SNAREでも用いてノウハウが蓄積している、混合ミセル-透析法で調製し、また実際のオルガネラ膜・細胞質膜に近似した生理的な脂質組成を採用する。再構成SNAREリポソームの膜融合活性は、既に実験体制が確立している「リポソーム脂質混合アッセイ」により評価・解析する(Furukawa, 2014)。再構成ヒトRabリポソーム解析は、我々が開発したRab-His12・DOGS-NTA/Biotin-PEリポソーム系を利用し、「アビジン磁性ビーズアッセイ・リポソームTurbidityアッセイ・蛍光イメージング」、これら3種類のin vitroリポソーム膜テザリング解析法を駆使して研究を展開する(Tamura, 2014)。

### 4. 研究成果

本研究課題の研究期間においては、特にヒトRabファミリー低分子量Gタンパク質(small

GTPase) が駆動する細胞内膜テザリング反応の再構成実験により主な研究成果が得られた。Rab ファミリー低分子量 G タンパク質は、Ras (Rat sarcoma) スーパーファミリー (Ras, Rho, Rab, Arf、および Ran ファミリー低分子量 G タンパク質を含む) の中では最大のタンパク質ファミリーを構成し、ヒト細胞では 60 種類以上のアイソフォームが存在する。この Rab ファミリー G タンパク質は、その構造的特徴として、N 末端に 5~30 残基程度の保存性の低い天然変性領域 (ヒト Rab5a の場合は 19 残基)、つづいて Ras スーパーファミリーで高度に保存される 160~170 残基の球状の GTPase ドメイン (G ドメイン; ヒト Rab5a の場合は 162 残基)、そして C 末端側に HVR (HyperVariable Region) ドメインと総称される 20~50 残基程度の保存性の低い天然変性領域 (ヒト Rab5a の場合は 34 残基) をもち、これら 3 つの領域・ドメインから構成される比較的小さな単量体タンパク質である。さらに、Rab 低分子量 G タンパク質の細胞内での機能とも深く関わる特徴として、HVR ドメインの C 末端システイン残基が、イソプレニル (ゲラニルゲラニル)

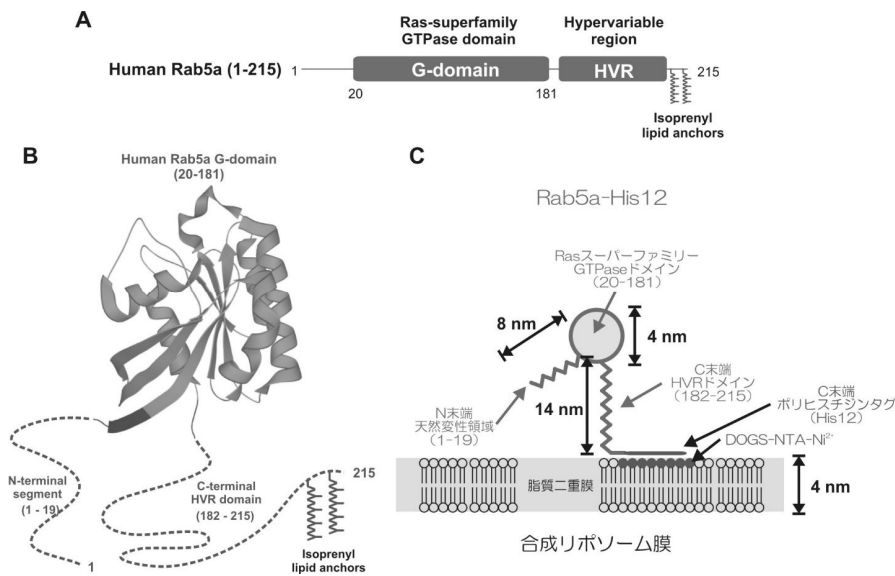


図1 ヒト Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の構造と膜結合様式

脂質基により翻訳後修飾される。この C 末端のイソプレニル脂質アンカーが、オルガネラ膜、細胞質膜、小胞膜などの脂質二重膜に挿入されることにより、Rab タンパク質は安定的に生体膜表面にアンカーされる。研究代表者らが世界で初めて構築したヒト Rab 再構成プロテオリポソーム解析系では、C 末端のイソプレニル脂質アンカーと両端 2 つの天然変性領域を含めた全長ネイティブ Rab 低分子量 G タンパク質の細胞内での脂質膜結合状態を人工的に模倣するため、合成リポソーム膜は Ni<sup>2+</sup>イオンがキレートされた脂質である DOGS-NTA を添加して調製し、一方、ヒ

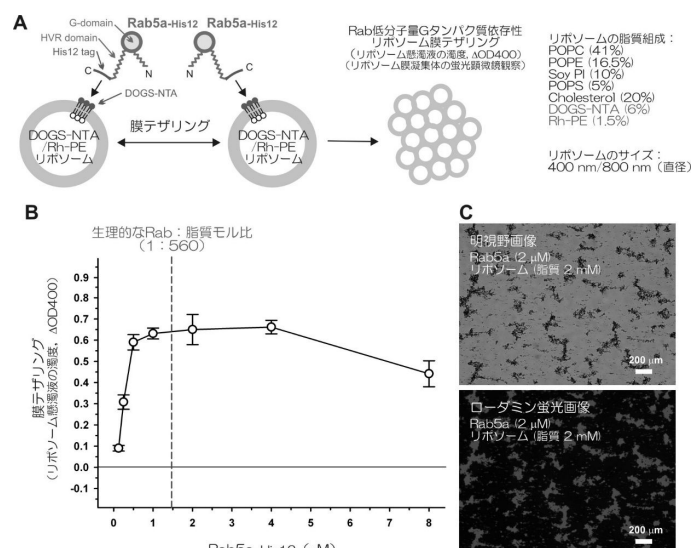


図2 ヒト Rab 再構成リポソーム解析系を活用した Rab 依存性膜テザリング活性の測定

ト Rab タンパク質は DOGS-NTA 脂質と特異的な高い親和性を示すポリヒスチジンタグ (His12) が C 末端に付加された組換えタンパク質 (Rab-His12) として精製した。合成リポソーム膜の脂質組成については、動物細胞などの生体膜を構成する主要な 5 種類の脂質であるホスファチジル

コリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、そしてコレステロールの全てを含め、加えてリボソームの粒子サイズを規定することで (本課題での解析では主に直径 400 ~ 800 nm)、様々なオルガネラ膜をはじめとする生理的な細胞内膜コンパートメントに近似した脂質二重膜の環境を再構築した。このように調製した Rab アンカー型再構成リボソーム膜を実験モデルとし、ヒト Rab ファミリー G タンパク質群の内在性膜テザリング活性を、「リボソーム濁度アッセイ」と「リボソーム膜凝集体の蛍光顕微鏡観察」の 2 種類の独立した生化学アッセイ法を用いて定量的に評価した。ヒト Rab ファミリー低分子量 G タンパク質では最初に、初期エンドソームや細胞質膜に局在しエンドサイトーシス経路に関与する Rab5a と、後期エンドソームやリソソームに局在しエンドサイトーシス経路およびリソソーム分解経路 (オートファジー経路を含む) に関与する Rab7a、これら 2 種類のヒト Rab タンパク質が単独で (つまりはテザリングタンパク質群などの他のタンパク質因子の非存在下で) 非常に効率的に膜テザリング反応を駆動することが見出された。さらには、広範な Rab/脂質モル比の検討をはじめ、再構成 Rab リボソーム膜テザリングアッセイの網羅的な展開により、前出の Rab5a や Rab7a と比較すれば低い活性ではあるが、エンドサイトーシス経路および分泌経路に関与する他のほぼすべてのヒト Rab ファミリー G タンパク質群も同様に固有の膜テザリング活性を保持することが明らかとなった。これら試験管内再構成によるアプローチから得られた実験結果によって、「Rab ファミリー低分子量 G タンパク質自身が膜と膜を物理的につなぐコアマシナリーであり、細胞内膜テザリング反応における真の膜テザーである」という細胞内膜交通・小胞輸送分野の新たな基本原理が提唱されるに至り、ヒト細胞をはじめ真核細胞内の膜を介した複雑で精緻な物質輸送の仕組みの理解が大きく前進した。最後に、本研究課題で主たる標的タンパク質分子としたヒト Rab ファミリー低分子量 G タンパク質のみならず、一般的に数多くの膜タンパク質が重要な生命現象や様々な疾患・疾病と深く関わることを考えると、本研究課題でその一端を成果発表した試験管内再構成アプローチあるいは再構成プロテオリボソーム解析技術は、生命科学の基礎研究、さらには創薬技術シーズの創出などの応用研究の発展に、今後ますます大きな貢献を果たしていくことが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taniguchi S, Toyoshima M, Takamatsu T, Mima J	4. 巻 29
2. 論文標題 Curvature-sensitive Trans-Assembly of Human Atg8-family Proteins in Autophagy-Related Membrane Tethering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Sci	6. 最初と最後の頁 1387-1400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/pro.3828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Segawa K, Tamura N, Mima J	4. 巻 294
2. 論文標題 Homotypic and heterotypic trans-assembly of human Rab-family small GTPases in reconstituted membrane tethering	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 7722-7739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.RA119.007947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mima J	4. 巻 1860
2. 論文標題 Reconstituted Proteoliposome Fusion Mediated by Yeast SNARE-Family Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 303-322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/978-1-4939-8760-3_20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoshita Motoki, Mima Joji	4. 巻 292
2. 論文標題 Human Rab small GTPase- and class V myosin-mediated membrane tethering in a chemically defined reconstitution system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18500 ~ 18517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.M117.811356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mima Joji	4. 巻 10
2. 論文標題 Reconstitution of membrane tethering mediated by Rab-family small GTPases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 543 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12551-017-0358-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 三間 穰治
2. 発表標題 ヒトRabファミリー低分子量Gタンパク質が駆動する細胞内膜テザリング反応の再構成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会, シンポジウム「イメージングと再構築による生体膜ダイナミクスの理解: 変形と融合と輸送と切断」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joji MIMA
2. 発表標題 Reconstitution of homotypic and heterotypic membrane tethering mediated by human Rab-family small GTPases
3. 学会等名 GORDON RESEARCH CONFERENCE on "Molecular Membrane Biology" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Joji Mima
2. 発表標題 Reconstituted membrane tethering mediated by human Rab-family small GTPases in a chemically defined system
3. 学会等名 Molecular Mechanisms of Membrane Trafficking, May 17-19, 2018, Seoul National University, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Joji MIMA
2. 発表標題 Rab GTPase- and class V myosin-dependent membrane tethering in a chemically defined system
3. 学会等名 GORDON RESEARCH CONFERENCE on “Molecular Membrane Biology” (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Joji MIMA
2. 発表標題 Rab-family GTPase- and class V myosin-mediated membrane tethering in a chemically defined reconstitution system
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Cell Logistics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----