

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770117  
 研究課題名（和文）エンドソーム・リソソーム系オルガネラ膜融合マシナリーの試験管内完全再構成  
 研究課題名（英文）In vitro reconstitution of endosomal/lysosomal membrane fusion machinery with purified proteins and defined lipids  
 研究代表者  
 三間 穰治 (MIMA JOJI)  
 大阪大学・たんぱく質研究所・准教授  
 研究者番号：30335301

研究成果の概要（和文）：細胞小器官オルガネラ群を始め、複雑な内膜系を持つ真核細胞において、細胞内オルガネラ膜融合は必須かつ根源的な生体反応である。我々は、この膜融合マシナリーを分子レベルで詳細に理解するため、SNARE など精製膜蛋白質群と人工脂質二重膜リポソームから構築する試験管内完全再構成系を手法とし研究を展開した。そして、出芽酵母エンドソーム・リソソーム膜系において、膜融合の特異性・選択性が、Qabc-SNARE 複合体の適切な形成により決定されている事を初めて見出した。

研究成果の概要（英文）：Here, we reported the fusion specificity of reconstituted proteoliposomes bearing purified SNARE proteins in yeast vacuoles and other organelles, to study whether and how SNAREs mediate the compartmental specificity of intracellular membrane fusion. We found that not only vacuolar R-SNARE, but also the non-cognate endosomal and ER-Golgi R-SNAREs caused efficient fusion with vacuolar Qabc-SNAREs. In contrast, their fusion is blocked completely by replacing the vacuolar Qc-SNARE with the non-cognate endosomal counterparts. Our current study establishes that an appropriate assembly of 3Q-SNAREs is crucial for mediating fusion specificity, whereas R-SNARE itself has little contribution to fusion specificity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：膜蛋白質化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官、細胞内膜交通、細胞内膜融合、プロテオリポソーム、試験管内再構成、SNARE タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内オルガネラ膜融合は、真核細胞内において、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、オルガネラ形態、ホルモン分泌、シナプス神経伝達、そしてオートファジーを含めた多くの重要な生命現象に直接関与する、生命機能に必須の反応である。そしてまた、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* からヒトに至る、全ての真核生物において保存される、根源的な生体反応の一つともいえる

(Bonifacino & Glick (2004) Cell; Wickner & Schekman (2008) Nat Struct Mol Biol)。

1970年代から現在まで、国内外の精力的な研究により、小胞輸送やオルガネラ形態に異常を示す変異株スクリーニングなどの「細胞生物学・遺伝学的手法」、あるいは細胞から単離したオルガネラを用いた「生化学的アッセイ」を用いて、オルガネラ膜融合に関与する様々な分子が同定されてきた。しかし、メンブレントラフィック分野において中心で

あった、「生きた細胞」や「単離オルガネラ」を用いた、これら従来の研究では、多様な膜タンパク質群と脂質群から構成される、複雑なオルガネラ膜融合マシナリーの詳細を解き明かすことは困難であり、技術的に大きな壁にあたっているのが現状であった。

そのような現状の中、我々は出芽酵母液胞オルガネラ（動物細胞のリソソームに相当）をモデルに、その「オルガネラ膜融合」の「試験管内“完全”再構成系」を、「全て精製された膜タンパク質因子群」と「人工脂質二重膜リポソーム」から構築することに成功した (Mima et al (2008) EMBO J)。この新しい試験管内“完全”再構成系のアプローチにより、SNARE タンパク質と共に、SNARE シャペロン複合体が液胞オルガネラ膜融合に必要不可欠であることを実証した。加えて、SNARE シャペロンの効率的な機能発現に、ホスホイノシチドを含む生理的な脂質組成が必須であることも初めて明らかにすることが出来た (Mima & Wickner (2009) PNAS; Mima & Wickner (2009) JBC)。

## 2. 研究の目的

酵母液胞をモデルとした、「オルガネラ膜融合の試験管内“完全”再構成系」を実験材料・手法の基盤とし、以下2つの研究プロジェクトを行うことを目的とした。これら2つの研究プロジェクトを推進することにより、オルガネラ膜ダイナミクス・メンブレントラフィック研究分野で概念的・技術的の両面における大きなインパクトを与える研究成果を目指す。

(1) オルガネラ膜融合の細胞内コンパートメント特異性に対する、SNARE・SNARE シャペロン・ホスホイノシチドのそれぞれの寄与は？

現在の再構成プロテオリポソームでは、SNARE タンパク質として、液胞融合に関与する4つのSNAREのみから構成されている。しかしながら、実際の細胞内においては、個々のオルガネラは「小胞輸送」や「オルガネラ間の直接的な膜融合」などを介してお互いに相互作用している。本プロジェクトでは、これまでの液胞 SNARE (Vam3p, Vtilp, Vam7p, Nyv1p) のみならず、エンドソーム SNARE (Pep12p, Vtilp, Tlg1p, Syn8p, Snc2p, Tlg2p) をも含む、より生理的細胞内環境に近づく、SNARE 再構成プロテオリポソーム系の構築を試みる。そして、それらの機能解析 (リポソーム膜融合アッセイ、リポソーム膜ドッキングアッセイ、タンパク質間相互作用解析、タンパク質-脂質間相互作用解析など) により、「エンドソーム・リソソーム (液胞) 系膜融合におけるコンパートメント特異性決定」の分子基盤を明らかにする。

具体的なプロセスとしては、第一段階とし

て、「SNARE 単独レベル」での細胞内コンパートメント特異性に焦点を当てた研究から開始する。その後、SNARE レベルで得られた結果を基盤に、さらにエンドソーム・リソソーム (液胞) 系 SNARE シャペロン群 (Sec17p/Sec18p, HOPS 複合体, CORVET 複合体, Vps45p など) とホスホイノシチド (PI (3)P, PI (3, 5)P2, PI (4, 5)P2) を加えた、より生理的で複雑な再構成プロテオリポソーム膜融合の実験系へと順次展開する。

(2) エンドソーム・リソソーム系膜融合におけるテザリング (繫留) 複合体の役割は？

これまでの研究により (Wickner & Schekman (2008) Nat Struct Mol Biol)、テザリング (繫留) 複合体は、細胞内オルガネラ膜融合において、オルガネラ間の第一接触 (ファーストコンタクト) に関与すると考えられ、細胞内コンパートメント特異性決定にも重要な役割を果たすと予想されている。本プロジェクトでは、リソソーム (液胞) 局在の HOPS 複合体、後期エンドソーム局在の CORVET 複合体、これら二つテザリング (繫留) 複合体をターゲットに (Ostrowicz et al (2008) Autophagy)、それらの分子機能を解剖する。具体的には、個々の HOPS/CORVET サブユニット、サブ複合体の精製を試み、それらの再構成プロテオリポソーム融合への効果を解析することで、両テザリング (繫留) 複合体の「エンドソーム・リソソーム (液胞) 系膜融合」過程における特異的役割を探索する。

## 3. 研究の方法

SNARE/SNARE シャペロン/ホスホイノシチドを含む生理的な脂質組成に依存する「オルガネラ膜融合の試験管内完全再構成系」

(Mima et al (2008) EMBO J; Mima & Wickner (2009) PNAS; Mima & Wickner (2009) JBC) が、本研究計画における以下の2つの研究プロジェクトについて、実験材料・手法の中心・基盤になる。

(1) 実験材料 (膜蛋白質、脂質、プロテオリポソーム)。現在までの酵母液胞モデル再構成プロテオリポソーム融合系を構成する膜タンパク質群、①酵母液胞 SNARE タンパク質 (Vam3p, Vtilp, Vam7p, Nyv1p)、②SNARE シャペロン Sec17p/Sec18p、③SNARE シャペロン HOPS 複合体、これらについては大腸菌あるいは出芽酵母を宿主とした大量発現・精製方法が、既に確立されており、それらの発現コンストラクト・精製方法を用いる予定である (Stroupe et al (2006) EMBO J; Starai et al (2008) Mol Biol Cell; Mima et al (2008) EMBO J)。

人工脂質二重膜リポソームを構成する脂質 (PC, PE, PI, PS, PA, ERG, CL, DAG, PIPx, Rh-PE, NBD-PE) については、各種ホスホイ

ノシチドを含めて、Avanti Polar Lipids 社あるいはEchelon Biosciences 社の合成脂質を使用する。再構成プロテオリポソーム調製法は、膜蛋白質（液胞 SNARE タンパク質）/脂質（液胞膜に類似した脂質組成）/界面活性剤から構成される混合ミセルの作成、透析法による界面活性剤の除去、そして最終ステップとして Histodenz 濃度勾配遠心法により再構成 SNARE プロテオリポソームの精製を行う (Mima et al (2008) EMBO J; Weber et al (1998) Cell; Scott et al (2003) Methods in Enzymology)。調製した SNARE 再構成プロテオリポソームの性状解析には、蛋白研所内の DLS 粒子径測定装置および電子顕微鏡施設の利用が可能である。

(2) プロテオリポソーム膜融合アッセイ。再構成プロテオリポソーム膜融合の測定・評価には、プロテオリポソームに含まれる二種類の蛍光脂質 (NBD-PE, Rh-PE) の FRET 原理を利用した膜脂質混合アッセイ法を用いる

(Struck et al (1981) Biochemistry; Weber et al (1998) Cell)。NBD-PE と Rh-PE を含む Donor リポソームの NBD 蛍光は、近傍の Rh 基による FRET 効果で消光されているが、蛍光脂質を含まない Acceptor リポソームとの膜融合が引き起こされた場合、①Donor リポソーム膜と Acceptor リポソーム膜の脂質分子の混合、②リポソーム膜上の NBD-PE—Rh-PE 間の距離が増大、③Rh 基による FRET 効果が消滅、そして最終的に④NBD 蛍光が増大し、リアルタイムで定量的に膜融合を測定する。このプロテオリポソーム膜融合アッセイは高感度かつ再現性が確立された方法であり (Mima et al (2008) EMBO J)、本研究課題のターゲットとなる多様な膜タンパク質因子・脂質因子の機能解析における中核となる方法である。

#### 4. 研究成果

(1) リコンビナント SNARE タンパク質の大量発現系の構築および精製 (図 1)。

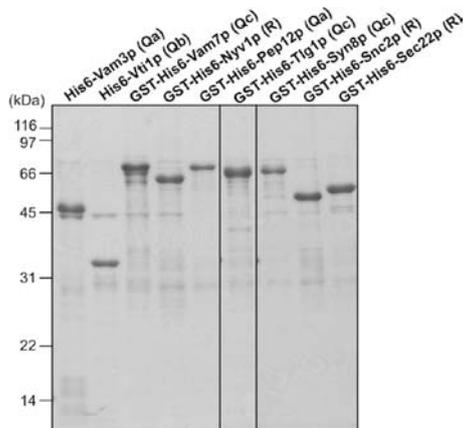


図 1 精製SNAREタンパク質

出芽酵母由来の Qa-, Qb-, Qc-, および R-SNARE タンパク質 9 種類について、大腸菌株 Rosetta2(DE3)を宿主とし、pET-LIC 系ベクターを用いることにより、精製タンパク質の大量調製に成功した。

(2) 再構成 SNARE プロテオリポソームの調製 (図 2)。

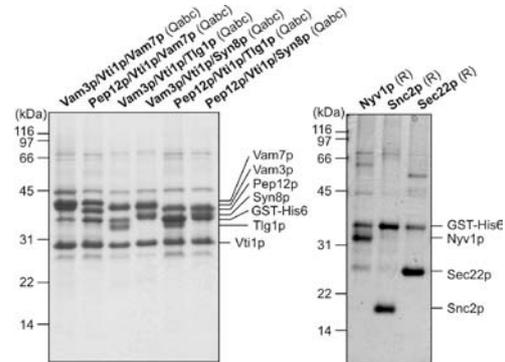


図 2 再構成SNAREプロテオリポソーム

精製 SNARE タンパク質群、合成脂質群、および界面活性剤 beta-OG から構成される混合ミセルから、透析法により調製した。

(3) SNARE 依存性再構成リポソーム膜融合の特異性解析 (図 3)。

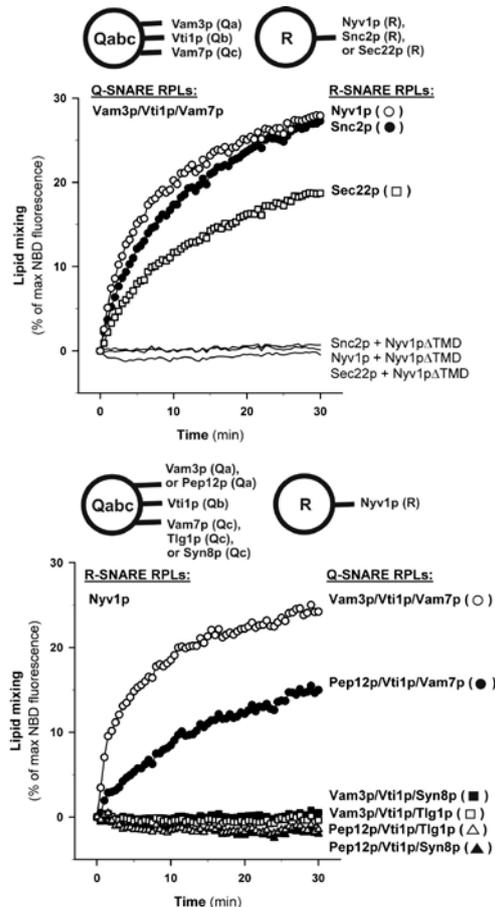


図 3 再構成リポソーム膜融合のSNARE特異性

出芽酵母液胞（リソソーム）局在の3Q-SNAREタンパク質（Vam3p, Vti1p, Vam7p）を含む再構成SNAREプロテオリポソームは、その生理的なパートナーR-SNAREであるNyv1p再構成リポソームのみならず、非特異的にエンドソームSnc2pおよびER-Golgi Sec22pリポソームとも効率的な膜融合を引き起こした。一方で、液胞（リソソーム）3Q-SNAREタンパク質の中のQc-SNARE Vam7pを、エンドソーム局在Qc-SNAREであるTlg1pあるいはSyn8pに代えた3Q-SNAREプロテオリポソームは、完全に膜融合活性を失った。つまりは、膜融合の特異性決定は、R-SNAREではなく3Q-SNAREにコードされている事を示す結果となった。

(4) テザリング因子PEG存在下におけるエンドソームSNARE依存的リポソーム膜融合(図4)。

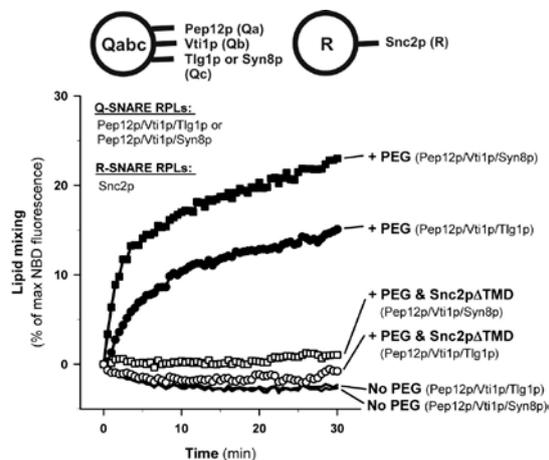


図4 エンドソームSNARE依存的リポソーム膜融合

液胞（リソソーム）3Q-SNAREリポソームが、非選択的に、液胞R-SNARE Nyv1pリポソームのみならず非生理的パートナーR-SNAREであるSnc2p/Sec22pリポソームと効率的に膜融合を起こすのに対し、エンドソーム3Q-SNAREリポソームは膜融合活性を全く示さなかった。しかしながら、人工的にリポソーム膜の凝集を起こさせる合成テザリング因子であるPEG（ポリエチレングリコール）を添加した場合、R-SNARE Snc2pリポソームと非常に高速な膜融合を起こした。つまりは、エンドソーム3Q-SNAREタンパク質は、膜融合活性に必須である一方、単独ではリポソーム膜凝集・テザリング・ドッキングを誘導することが出来ず、そのためPEG非存在下で活性を示さないことが明らかとなった。

(5) GSTプルダウンアッセイによるエンドソーム・液胞（リソソーム）局在QabcR-SNARE複合体形成の解析(図5)。

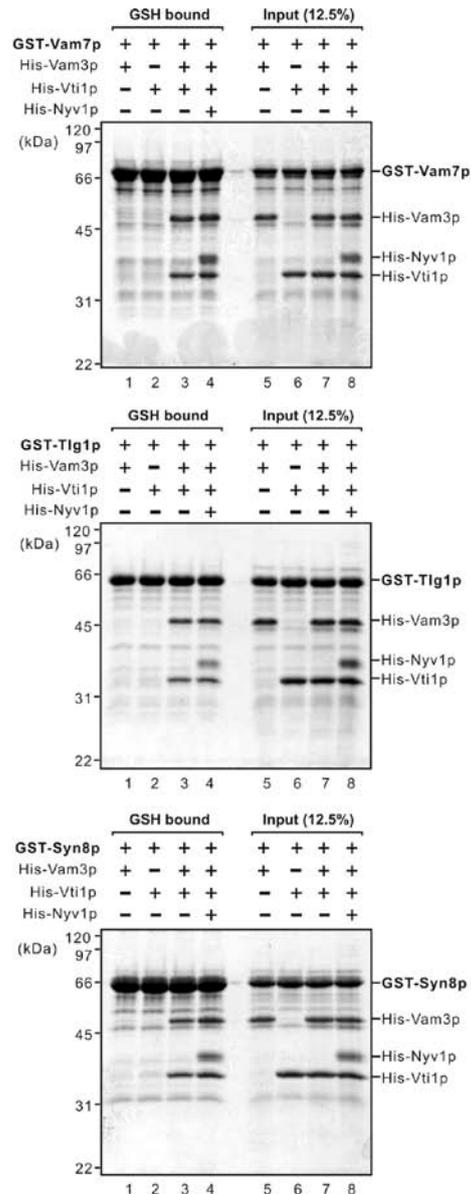


図5 エンドソーム・液胞系SNARE複合体形成

再構成SNAREプロテオリポソーム膜融合アッセイにより、液胞3Q-SNAREリポソームがQc-SNARE Vam7pだけをエンドソームQc-SNAREのTlg1pあるいはSyn8pに代えただけで、その膜融合活性を失う結果が得られた。そこで、Qc-SNARE依存的な膜融合活性の変化が、単純なタンパク質間相互作用、具体的には溶液中におけるcis-QabcR-SNARE複合体形成の不活化に起因するのかを、GSTプルダウンアッセイにより検証した。その結果、図5に示すように、GST-Vam7pによる結果と同様に、エンドソーム局在Qc-SNARE Tlg1pあるいはSyn8pについても、他の液胞SNAREサブファミリーと安定なcis-QabcR-SNARE複合体を形成することが明らかとなった。このこと

は、cis-SNARE 複合体形成の能力が必ずしも、その 3Q-SNARE および R-SNARE の組合せにおいて、実際に膜融合を引き起こすとは限らないことを示すものである。さらには、膜融合の過程に必須である、二つの異なる膜を橋渡しする trans-QabcR-SNARE 複合体の形成は、同一膜上で形成される cis-SNARE 複合体と大きく異なることを示唆している。恐らく、SNARE タンパク質に加えて、テザリング因子や Sec1/Munc18 (SM) タンパク質ファミリーをはじめとする SNARE シャペロン群が、効率的な trans-SNARE 複合体形成に大きく関与していることが、これらの再構成プロテオリポソーム系実験により明確に示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Bennett TL, Kraft SM, Reaves BJ, Mima J, O'Brien KM, Starai VJ. LegC3, an effector protein from Legionella pneumophila, inhibits homotypic vacuole fusion in vivo and in vitro. PLoS One.8, e56798, 査読有 (2013)

DOI: 10.1371/journal.pone.0056798

② Izawa R, Onoue T, Furukawa N, Mima J. Distinct contributions of vacuolar Qabc- and R-SNARE proteins to membrane fusion specificity. J. Biol. Chem. 287, 3445-3453, 査読有 (2012)

DOI: 10.1074/jbc.M111.307439

[学会発表] (計 4 件)

① 三間穰治. 細胞内膜融合マシナリー：再構成 SNARE プロテオリポソーム系によるアプローチ. 第 3 回神経科学と構造生物学の融合研究会. 大阪. (2012.10.4)

② Joji Mima. Distinct Contributions of Yeast Q- and R-SNAREs to the Specificity of Reconstituted Membrane Fusion. Gordon Research Conference Molecular Membrane Biology, Andover, NH, USA. (2011.7.13)

③ 三間穰治. Endolysosomal Membrane Fusion Reconstituted with the Yeast SNAREs, SM Proteins, and Chemically Defined Liposomes. 第 30 回内藤コンファレンス「生体膜ダイナミクスと脂質生物学 [II]」. 札幌. (2011.6.30)

④ 三間穰治. 酵母液胞オルガネラ膜融合の in vitro 完全再構成. 第 11 回日本蛋白質科学会年会. 大阪. (2011.6.7)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三間 穰治 (MIMA JOJI)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：30335301