

再構成プロテオリポソームとオルガネラ膜融合

三間 穰治

生命科学分野、特に生化学の研究者にとっての究極的な目標の一つは、各人がターゲットとしている生命現象について、①その素反応に必要とされる構成因子（タンパク質、脂質、核酸、糖など）をすべて精製・純化し、②それらすべての精製因子群を試験管内で人工的に混ぜ合わせて本来の生細胞内における生理活性・生命機能を化学的に純粋な実験系で再現・再構築し、③さらには実験系内の精製因子群の種類や量などを自由自在に操作して解析を行い、分子メカニズムの詳細に迫る、というものであろう。この究極の生化学的研究ともいえる実験手法は「試験管内完全再構成系 (*in vitro* reconstitution with chemically-purified components)」とも称され、膜タンパク質の精製をはじめとして技術的に非常に困難でチャレンジングな場合が多いが、従来の遺伝学・細胞生物学・分子生物学・構造生物学的研究には真似できないユニークな成果やブレイクスルーが期待できる。

ここではその一例として、膜タンパク質と人工脂質二重膜リポソームを用いた試験管内完全再構成である「再構成プロテオリポソーム系」を駆使することで1990年代末から分子メカニズムに迫るキッカケを与える研究成果を産み出した「細胞内オルガネラ膜融合」研究を紹介したい。

細胞質膜 (plasma membrane) で囲まれ、その内部に小胞体ER、ゴルジ体、トランスゴルジ網、エンドソーム、リソソーム・液胞など多種多様な細胞小器官オルガネラ膜を有する真核細胞において、「オルガネラ膜融合」は、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスに代表される時空間的に高度に制御された細胞内膜交通ネットワーク (メンブレントラフィック) に不可欠かつ根源的な生体反応である^{1,2)}。1980年代から現在までに、小胞膜 (ベシクル) 輸送による分泌に異常を示す酵母 *sec* 変異株スクリーニングなどの遺伝学・細胞生物学的研究手法や、酵母や動物細胞から単離・精製したオルガネラを利用した生化学的オルガネラ融合アッセイなどによって「細胞内オルガネラ膜融合」反応の駆動に関わる分子群が数多く同定されてきた。なかでもSNAREタンパク質 (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) は酵母に25種類、ヒトに36種類存在するなど真核生物に高度に保存されたタンパク質ファミリーであり、各SNAREタンパク質はそれぞれ特異的な細胞小器官オルガネラ膜に局在することから、細胞内の選択的

な膜融合を引き起こす中心的なタンパク質因子として考えられてきた^{1,2)}。しかし、生きた細胞や単離したオルガネラを試料とする従来の実験手法だけでは、単なる因子の同定を越えた、具体的なSNAREの分子機能の解明は困難であった。

そうした状況のなか、Rothmanらは1998年、シナプス神経伝達における膜融合 (神経伝達物質を充填した分泌小胞とシナプス前膜との膜融合) に関与するSNAREタンパク質と人工脂質二重膜リポソームから、初めて再構成SNAREプロテオリポソームを調製した。そしてこの再構成SNAREプロテオリポソームが自発的に膜融合する実験結果を得て、SNAREタンパク質が細胞内の特異的・選択的な膜融合に十分な最小マシナリーであることを提唱した³⁾。しかしこのRothmanらの実験については、①非生理的なほど高いSNAREタンパク質密度をもつプロテオリポソームを用いている、②本来のオルガネラ膜とまったく異なる脂質組成を使用している、③SNAREタンパク質以外の膜融合タンパク質因子群が含まれていない、など多くの問題点が指摘され、結果の解釈に対して長く議論が続いている。

他方、上述の、初めてオルガネラ膜融合の試験管内完全再構成系が報告された成果から十余年を経た近年、Rothmanらも含めた複数の研究グループから、本来の細胞内膜融合マシナリーの理解を目指した、SNARE以外の膜融合タンパク質因子群も含む“進化した完全再構成系”が報告され始めた^{4,5)}。たとえばシナプス伝達系のSNAREシャペロンMunc18とカルシウム結合センサーSynaptotagminや、通常の細胞内膜交通で働くRab GTPアーゼやテザリング (繫留) 複合体などである^{4,5)}。今後はさらに多様な膜融合因子の機能を再現する再構成プロテオリポソーム系へと進化し、複雑ではあるが厳密に制御された細胞内膜融合マシナリーの全貌の理解に向けて、大きく進展するだろう。

- 1) Bonifacino, J. *et al.*: *Cell*, **116**, 153 (2004).
- 2) 大野, 吉森: メンブレントラフィックの奔流, 共立出版 (2009).
- 3) Weber, T. *et al.*: *Cell*, **92**, 759 (1998).
- 4) Wickner, W.: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **26**, 115 (2010).
- 5) Rizo, J. and Südhof, T. C.: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **28**, 279 (2012).