

ARF-like GTPase による膜オルガネラ動態の制御

紺谷 園二

1. はじめに

RAS に代表される低分子量 G タンパク質はヒトでは 100 種類以上のメンバーが存在することが明らかになっており、巨大なスーパーファミリーを形成する。それらは相同性から、RAS, RHO/RAC, RAB, ARF/ARL, RAN のサブファミリーに大別され、それぞれ 20~60 種類の構成メンバーからなる。それらの中には、ゲノムデータベースから配列情報を元に同定されたため、いまだ機能が不明な分子も多く存在する。ARF および RAB ファミリーは、細胞内のメンブレントラフィックを制御する低分子量 G タンパク質群であるが、ARF-like (ARL) GTPase は ARF と相同性のある分子として同定された一群の低分子量 G タンパク質である。当初の予想に反し、多くの ARL GTPase は既存の ARF とは全く異なる局面で機能を発揮していることが最近明らかになってきた。そこで本稿ではいくつかの ARL GTPase に関して、最近の知見を紹介したい。

2. 低分子量 G タンパク質 ARF/ARL ファミリー

ARF/ARL ファミリーに属する低分子量 G タンパク質は、ヒトでは現在 29 種類のメンバーが存在する (図 1)。このうち、SAR および ARF サブファミリーに関してはこれまでに精力的に解析が進められており、グアニンヌクレオチド交換反応に伴う構造変換を介して、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送、細胞膜からのエンドサイトーシスなどに重要な役割を果たしていることが示されている。例えば ARF1 は GDP 結合型では細胞質に存在するが、GTP 結合型になるとゴルジ体の膜に局在し、被覆タンパク質などを膜にリクルートすることで、ゴルジ体からの輸送小胞の出芽を制御している。また、SAR や ARF1~ARF6 の活性化因子 (guanine-nucleotide exchange factors : GEFs) や不活

性化因子 (GTPase-activating proteins : GAPs) も数多く同定され、膜輸送における役割やターゲット膜への局在化の分子機構に関する理解が進んでいる¹⁾。

ARF のオルガネラ膜局在化には、他の低分子量 G タンパク質には見られない特徴的な N 末端領域が重要である。ARF の N 末端 10~25 アミノ酸は両親媒性の α ヘリックス構造をしており、通常 2 番目のグリシンがミリストイル化修飾されている。ARF が GDP 結合型から GTP 結合型へ構造転換すると、その N 末端部位が外側に露出した状態になり、オルガネラ膜との相互作用が促進すると考えられている。

一方、ARL に関してはその膜局在化機構に関して不明な点が多い。いくつかの ARL では、ARF に良く保存された N 末端のミリストイル化部位が存在していない。例えば後述する ARL8 に関しては、N 末端はアセチル化修飾を受けており、興味深いことにそのアセチル化修飾が ARL8 の膜局在化に関与することが示唆されている²⁾。また、ARL の活性制御因子 (GEFs や GAPs) についてはほとんど同定されておらず、そのグアニンヌクレオチド結合状態がどのように制御されているかについては未解明である。

3. リソソームなどの酸性オルガネラの機能と ARL8

ARL8 は多細胞生物種間で高度に保存された ARL GTPase であり、哺乳動物では非常に良く似た ARL8A と ARL8B の 2 種類が存在し、線虫やハエでは 1 種類のみ存在する。前述の N 末端のアセチル化修飾に加え、ARL8 のユニークな点としては、その細胞内局在が挙げられる。ARL8 は非常に多くの低分子量 G タンパク質群の中で、主にリソソームに局在することが示された初めての低分子量 G タンパク質である²⁾。リソソームは多数の加水分解酵素に富み、後期エンドソーム、ファゴソーム、オートファゴソームと直接融合することで、それらに含有される物質を分解する機能を担っており、その機能異常はリソソーム病などの疾患の原因となっている³⁾。リソソームによる正常な物質分解は、リソソームと他の膜オルガネラとの融合が、時空間的に適切に行われることが重要であるが、その分子メカニズムに関してはあまり良くわかっていない。以下に述べるように最近の研究から、ARL8 がリソソームと

東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Regulation of membrane dynamics by ARF-like GTPases
Kenji Kontani (Department of Physiological Chemistry,
 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of
 Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

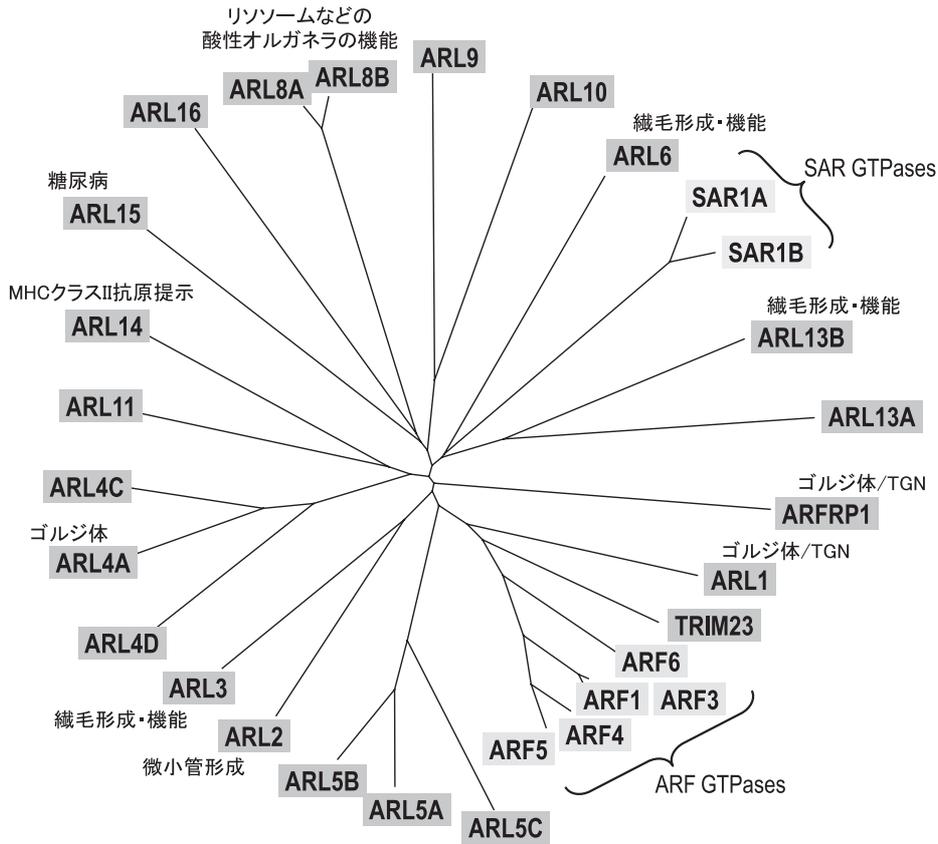


図1 ヒト ARF/ARL 低分子量 G タンパク質ファミリー
 ヒトにおける ARF/ARL 低分子量 G タンパク質ファミリーには 29 種類のメンバーが存在する。このうち、SAR サブファミリー (SAR1A, SAR1B), ARF サブファミリー (ARF1~ARF6) に関しては、小胞体・ゴルジ間の小胞輸送などにおける機能解析が進んでいるが、ARL サブファミリー (ARL1~ARL16) の機能に関してはいまだ不明な点が多い (関連するキーワードを併記)。

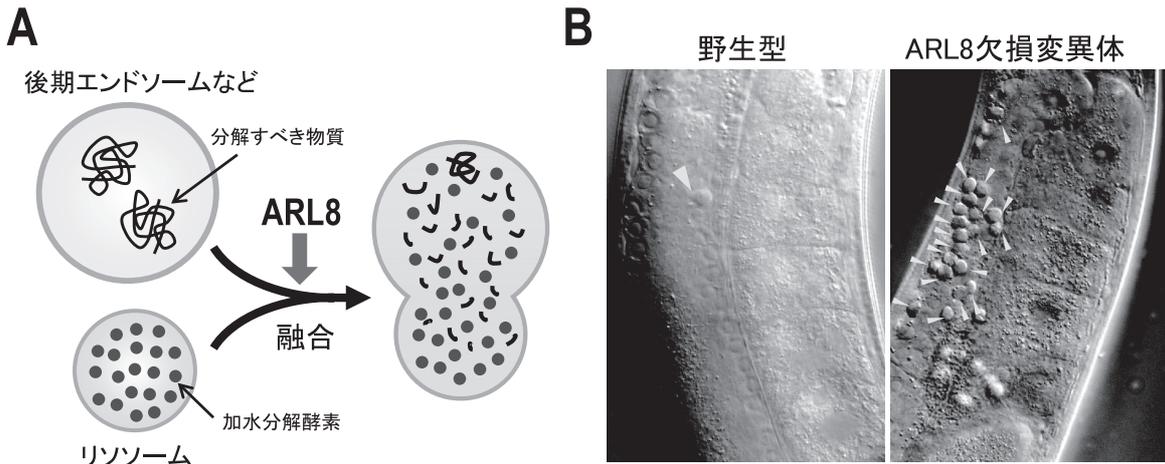


図2 リソソームによる物質分解に介在する ARL8
 (A) リソソームは、分解すべき物質を含む後期エンドソームなどの膜オルガネラと融合し、各種の加水分解酵素を作用させることで、物質分解を担う。
 (B) 野生型および ARL8 欠損変異体の線虫生殖腺の様子。線虫の生殖腺においてアポトーシスを生じた生殖細胞は、周囲に存在する鞘細胞 (sheath cell) にファゴサイトーシスによって取り込まれ、分解除去される。ARL8 欠損変異体では、ファゴソームとリソソームの融合が進行せず、アポトーシス細胞を含んだファゴソーム (矢頭) が多数蓄積する。

様々な膜オルガネラとの融合に重要であることが明らかになってきた (図2)。

我々は ARL8 の生理的役割を明らかにする目的で、線虫 *C. elegans* の ARL8 欠損変異体 (*arl-8* 変異体) を作製し、その表現型解析を行った。線虫体腔部に存在するマクロファージ様細胞 coelomocyte は、エンドサイトーシスが盛んで、膜オルガネラも大きく発達して観察が容易なため、線虫を用いたメンブレントラフィックの研究に有用な実験系となっている。各種のオルガネラマーカーを用いた解析やタイムラプスイメージングにより、*arl-8* 変異体の coelomocyte では、エンドサイトーシスに取り込まれた物質は後期エンドソームまで到達するが、後期エンドソームとリソソームの融合がほとんど観察されないことが明らかとなった。また *arl-8* 変異体の生殖腺においては、貪食が活発な鞘細胞 (sheath cell) 内に、アポトーシスした生殖細胞を含むファゴソームが多数蓄積していた。一般に外来物質を取り込んだファゴソームには、細胞内の様々なコンポーネントがリクルートされて成熟が進み、最終的にリソソームと融合することで、内容物が分解される⁴⁾。*arl-8* 変異体のファゴソームには、成熟後期段階のマーカーである低分子量 G タンパク質 Rab7 がリクルートされていたが、ファゴソームとリソソームの融合はほとんど観察されず、アポトーシス細胞の分解が非常に遅延していることが明らかとなった。以上の結果から、ARL8 は後期エンドソームやファゴソームとリソソームの融合に関与し、リソソームへの物質輸送に重要な低分子量 G タンパク質であると考えられた^{5,6)}。

ARL8 がどのような機構でこの過程に寄与しているかはいまだ解明されていないが、最近、ARL8 の活性化型 (GTP 結合型) と、HOPS 複合体の構成因子 VPS41 が相互作用することが明らかとなった^{6,7)}。HOPS 複合体はヘテロ六量体のタンパク質複合体であり、酵母を用いた研究から、低分子量 G タンパク質 Rab7 によって液胞膜にリクルートされ、液胞膜の融合過程において tethering factor (つなぎ止め因子) として機能すると考えられている。ARL8 がリソソームや成熟後期段階のファゴソームに局在することを考えると、ARL8 と VPS41 の相互作用を介して HOPS 複合体が膜にリクルートされ、ファゴソームとリソソームの融合が促進されるのかもしれない。一方 HeLa 細胞では、ARL8 をノックダウンするとリソソームの融合が亢進するという一見逆の方向性を示唆する報告もあり⁸⁾、今後、リソソームの融合における ARL8 の寄与に関してより詳細に検討する必要がある。

リソソームはキネシンやダイニンモーターを利用して微小管上を活発に移動しているが、ARL8 はリソソームの微小管プラス端方向への移動にも関与することが示唆されている⁹⁾。さらに線虫 *arl-8* 変異体を用いた解析から、ARL8

がシナプス小胞前駆体の微小管上の移動に関与することも報告されており¹⁰⁾、ARL8 はリソソームを含む様々な酸性オルガネラの機能動態に関与する可能性がある。

4. 繊毛の形成・機能に関与する ARL GTPase

細胞膜から小さく突出した構造体である繊毛は、運動性の繊毛と非運動性の繊毛 (一次繊毛) に大別され、ヒトでは多くの体細胞に一次繊毛が存在する (図3)。運動性の繊毛が細胞外液の流れを発生させる機能を担っていることは良く知られているが、一次繊毛の機能は長らく不明であった。しかし近年、一次繊毛が外界環境の“センサー”として、Sonic hedgehog などのシグナルや、機械的刺激の受容に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。さらに、嚢胞腎や網膜色素変性症などの疾患が、繊毛の形成・機能に関与する因子群の異常に起因することも示されており (繊毛の異常に起因する疾患は総称して繊毛性疾患と呼ばれている)、繊毛研究は近年非常に活発化している^{11,12)}。

ARL GTPase ファミリーの中で、現在までに ARL3, ARL6, ARL13b が繊毛の形成や機能に関与することが示されており、ARL6 および ARL13b に関しては、それぞれ繊毛性疾患のバルデー・ビードル症候群 (Bardet-Biedl syndrome: BBS)、ジュベール症候群 (Joubert syndrome) の原因遺伝子であることが報告されている¹³⁾。

我々はバルデー・ビードル症候群で同定された ARL6 の遺伝子変異が、ARL6 の G タンパク質としての特性に与え

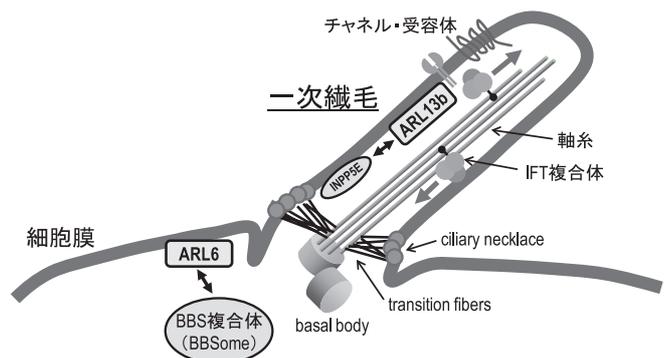


図3 一次繊毛の模式図

一次繊毛は細胞膜から小さく突出した構造体であり、その内部には軸糸と呼ばれる微小管構造が存在する。IFT 複合体は、数多くの構成因子からなるタンパク質複合体であり、キネシンやダイニンモーターを介して繊毛内における物質輸送を担っている。繊毛の根元付近には ciliary neck や transition fibers と呼ばれる構造体が存在し、一種のバリアー機能を担っていると考えられている。繊毛に局在する ARL13b の機能については不明な点が多いが、最近 inositol polyphosphate 5-phosphatase (INPP5E) の繊毛への輸送に関与することが報告された。また ARL6 は BBS 複合体 (BBSome) と相互作用し、繊毛への膜タンパク質の輸送に関与すると考えられている。

る影響を検討した。その結果、ミスセンス変異の一つである T31R 変異によって、ARL6 の GTP 結合能が非常に低下することが明らかとなった¹⁴⁾。この変異は ARL6 の GDP 結合能には影響を与えなかったことから、T31R 変異によって ARL6 が GDP 型で維持され、GTP 結合型（活性化型）に変換されないことが、疾患の原因となっていると考えられた。最近の研究から、ARL6 の機能として、一次繊毛への膜タンパク質の輸送に関与する可能性が考えられている。ある種の受容体やチャネルの一次繊毛への輸送には、バルデー・ビードル症候群の原因遺伝子産物から構成される BBSome と呼ばれる巨大タンパク質複合体が関与すると考えられており、ARL6 の GTP 結合型が、BBSome の構成因子の一つである BBS1 と結合することから、ARL6 によって BBSome が何らかの膜構造にリクルートされ、一次繊毛への膜タンパク質の輸送が制御されるモデルが提唱されている¹⁵⁾。

ARL13b はゼブラフィッシュやマウスにおいて、形態形成に異常を示す変異体の責任遺伝子として同定された^{16,17)}。それらの変異体においては、様々な部位における一次繊毛の形成異常が観察されており、ARL13b の機能低下に伴う繊毛を介したシグナル伝達の乱れが、形態形成の異常を引き起こすと考えられている。我々の研究グループも、ARL13b が繊毛に濃縮して存在すること、線虫 ARL13b 欠損変異体が繊毛形成異常の表現型を示すこと、繊毛内における物質輸送システム (intraflagella transport) に異常が生じることを明らかにしており^{18,19)}、前述のように ARL13b が繊毛性疾患ジュベール症候群の原因遺伝子であることも考え合わせると、多くの動物種で ARL13b は繊毛の形成・機能に重要であると考えられる。最近、繊毛局在性のタンパク質である inositol polyphosphate 5-phosphatase (INPP5E) が、GTP 結合型の ARL13b と結合し、一次繊毛へと輸送されることを示唆する知見が報告され、ARL13b が細胞体から一次繊毛への物質輸送過程において機能する可能性も考えられている²⁰⁾。

5. おわりに

ARL GTPase ファミリーの中には今回紹介した以外にも、微小管形成 (ARL2)、MHC クラス II 抗原提示 (ARL14)、糖尿病 (ARL15) との関連が示唆されているメンバーも存在し、ARL GTPase は予想以上に多様な局面で機能しているように思われる。今後も思いがけない局面で、ARL GTPase の役割がクローズアップされる可能性がある。一方、大部分の ARL GTPase に関しては、その G タンパク質としての活性制御がどのように行われ、その G サイク

ルがどのような機能的意味を持っているかはほとんどわかっていない。今後、ARL GTPase の活性制御因子やエフェクター群などの同定が進み、ARL GTPase が介在する多様な生理応答の制御メカニズムが明らかになってくることに期待したい。

- 1) Donaldson, J.G. & Jackson, C.L. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 362-375.
- 2) Hofmann, I. & Munro, S. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 1494-1503.
- 3) Luzio, J.P., Pryor, P.R., & Bright, N.A. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 622-632.
- 4) Kinchen, J.M. & Ravichandran, K.S. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 781-795.
- 5) Nakae, I., Fujino, T., Kobayashi, T., Sasaki, A., Kikko, Y., Fukuyama, M., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Kontani, K., & Katada, T. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 2434-2442.
- 6) Sasaki, A., Nakae, I., Nagasawa, M., Hashimoto, K., Abe, F., Saito, K., Fukuyama, M., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Katada, T., & Kontani, K. (2013) *Mol. Biol. Cell*, 24, 1584-1592.
- 7) Garg, S., Sharma, M., Ung, C., Tuli, A., Barral, D.C., Hava, D.L., Veerapen, N., Besra, G.S., Hacohen, N., & Brenner, M.B. (2011) *Immunity*, 35, 182-193.
- 8) Korolchuk, V.I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F.H., Roberts, E.A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F.M., O'Kane, C.J., Deretic, V., & Rubinsztein, D.C. (2011) *Nat. Cell Biol.*, 13, 453-460.
- 9) Rosa-Ferreira, C. & Munro, S. (2011) *Dev. Cell*, 21, 1171-1178.
- 10) Klassen, M.P., Wu, Y.E., Maeder, C.I., Nakae, I., Cueva, J.G., Lehrman, E.K., Tada, M., Gengyo-Ando, K., Wang, G.J., Goodman, M., Mitani, S., Kontani, K., Katada, T., & Shen, K. (2010) *Neuron*, 66, 710-723.
- 11) Goetz, S.C. & Anderson, K.V. (2010) *Nat. Rev. Genet.*, 11, 331-344.
- 12) Satir, P. & Christensen, S.T. (2007) *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 377-400.
- 13) Li, Y., Ling, K., & Hu, J. (2012) *J. Cell Biochem.*, 113, 2201-2207.
- 14) Kobayashi, T., Hori, Y., Ueda, N., Kajiho, H., Muraoka, S., Shima, F., Kataoka, T., Kontani, K., & Katada, T. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 439-442.
- 15) Nachury, M.V., Seeley, E.S., & Jin, H. (2009) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 26, 59-87.
- 16) Caspary, T., Larkins, C.E., & Anderson, K.V. (2007) *Dev. Cell*, 12, 767-778.
- 17) Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, G.J., Cole, D.G., Miller, M.S., & Hopkins, N. (2004) *Development*, 131, 4085-4093.
- 18) Cevik, S., Hori, Y., Kaplan, O.I., Kida, K., Toivenon, T., Foley-Fisher, C., Cottell, D., Katada, T., Kontani, K., & Blacque, O.E. (2010) *J. Cell Biol.*, 188, 953-969.
- 19) Hori, Y., Kobayashi, T., Kikko, Y., Kontani, K., & Katada, T. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 373, 119-124.
- 20) Humbert, M.C., Wehbrecht, K., Searby, C.C., Li, Y., Pope, R.M., Sheffield, V.C., & Seo, S. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109, 19691-19696.

著者寸描

●紺谷 圈二 (こんたに けんじ)



東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室
准教授. 博士 (理学).

■略歴 1965年東京都に生る. 90年東京工業大学理学部卒業. 95年同大学院生命理工学研究科バイオサイエンス専攻博士課程修了. 94年日本学術振興会特別研究員. 96年三菱化学株式会社. 97年日本学術振興会未来開拓学術研究リサーチ・アソシエイト. 98年東京大学薬学部助手. 2002年カリフォルニア大学サンタバーバラ校博士研究員 (Dr. Joel Rothman 研究室). 05年東京大学薬学部助教授.

■研究テーマと抱負 低分子量 G タンパク質の活性制御機構と生理的役割の解析. 低分子量 G タンパク質の活性を制御できる化合物の探索と創薬への可能性にもチャレンジしたい.

■ホームページ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/>

■趣味 ライブハウスに行くこと. 映画を観ること.