

ALS 関連小胞体分子 VAP のトポロジー変換機構解明

広島大学大学院統合生命科学研究科 細胞生物学研究室
千原 崇裕

研究の背景と目的：

膜タンパク質は、生体膜上で一定のトポロジー（膜に組み込まれる向き）を取ることで、正常に機能を果たしている。これは、膜タンパク質の「ドグマ」として古くから信じられており、分子生物学・細胞生物学の教科書にもそのように記述されている。しかし近年、同一の膜タンパク質が膜への挿入前後でトポロジーを切り替える現象（以後、トポロジー変化と呼ぶ）が見つかっており、この前提が揺らぎ始めている（例：LacY, TM4SF20, CCR5, syntaxin-4, VAP；図1）。また、トポロジー変化によって膜タンパク質が異なる機能を持つようになることも明らかになってきている。このことから、膜タンパク質は「発現量の変化」「立体構造の変化」「局在性の変化」だけでなく、「トポロジー変化」によっても機能を変えている可能性が高まってきた。よって、膜タンパク質のトポロジー変化は、細胞生物学的に重要な研究課題として注目されている。しかしながら、膜タンパク質のトポロジー変化についての体系的な解析は進んでおらず、例えば、トポロジー変化の分子機構、普遍性、その生理的意義に関する研究は殆ど進んでいないのが現状である。本研究では、筋萎縮性側索硬化症（ALS）関連分子の一つである小胞体膜タンパク質 VAP をモデル分子として膜タンパク質のトポロジー変化に着目し、その分子メカニズムの解明を目指した。

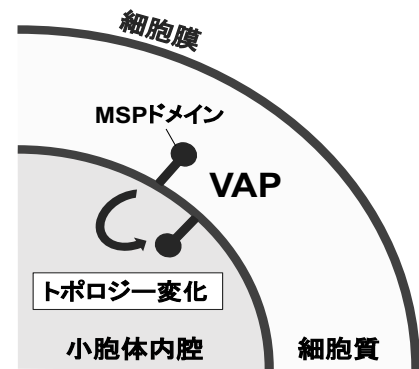


図 1 トポロジー変換の仮説図

VAP は、小胞体と細胞内小器官の「繋ぎ止め分子」として機能しており、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因遺伝子としても知られている。VAP は C 末の膜貫通ドメインによって小胞体膜にアンカーされ、N 末の MSP ドメインは細胞質側を向く（図 2）。MSP ドメインは細胞外に分泌され、細胞外シグナルとしての機能を持つことが知られているがその切断・分泌機構は不明である。本研究では、ショウジョウバエの培養細胞技術、遺伝学的手法を用いて以下の研究を実施した。

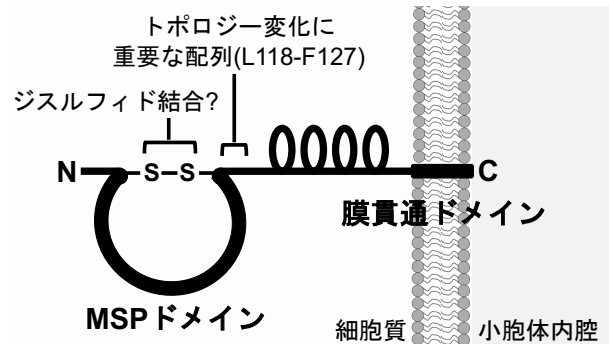


図 2 VAP の構造

研究結果：

結果 1：Vap33 は小胞体上で MSP ドメインを細胞質側へ向けている

本研究では、Vap33（ヒト VAPB のショウジョウバエオルソログ）を用いた解析を行なった。上述のようにヒト VAP は小胞体に位置し、その MSP ドメインを細胞質側に向けていることが知られている。最初に、Vap33 に関しても同様の細胞内局在を示すかを Split-GFP システムを用いて検証した。Split-GFP システムとは、GFP11 と GFP1-10 を独立に発現させ、これらタンパク質が同じ細胞内コンパートメントに局在する時に機能的な GFP が再構成され蛍光を発するシステムである（図 3：米国ジョージア大学・神山大地氏、東北大学・関根清薫氏との共同研究）。GFP11 を N 末にタグ付けた Vap33 (GFP11-Vap33) と細胞質局在型 GFP1-10 を S2 細胞に共発現させたところ、強い GFP 蛍光が観察された。一方、GFP11-Vap33 と小胞体貯留型 GFP1-10-SEHDEL を共発現させた場合、GFP 蛍



図 3 Split-GFP システム

光は観察されなかった。次に GFP11 を C 末にタグ付けした Vap33 (Vap33-GFP11) と細胞質局在型 GFP1-10 を共発現させた場合、GFP 蛍光は観察されなかった。一方、Vap33-GFP11 を小胞体貯留型 GFP1-10-SEHDEL と共発現させた場合は強い GFP 蛍光が観察された。これら結果から Vap33 の MSP ドメインは細胞質側を向いていることが示唆された。研究代表者は、この結果を更に確認するために、Vap33 MSP ドメインの N グリコシル化に関して解析した。その結果、MSP ドメインは N グリコシル化されるためのアミノ酸を有するものの、N グリコシル化されていないことが明らかになった。N グリコシル化は小胞体内腔で起こる修飾である事実を踏まえると、Vap33 MSP ドメインは小胞体内腔に向いていない、すなわち Vap33 MSP ドメインが細胞質側を向いていることが明らかになった。

結果 2 : Vap33 は形質膜上で MSP ドメインを細胞外へ向けている

細胞質側に存在する Vap33 MSP ドメインはどのようにして細胞外へ分泌されるのだろうか。研究代表者は、形質膜における Vap33 の局在を調べるためにフローサイトメトリーを用いた解析を行なった。Vap33 の N 末端と C 末端にそれぞれ FLAG タグおよび HA タグを付加した FLAG-Vap33-HA を作製し、S2 細胞へトランスフェクションした。それら細胞に対して、抗 FLAG 抗体などを用いた「細胞外」免疫染色を行い、フローサイトメトリー解析することで、Vap33 の末端が細胞質側と細胞外のどちらを向いているかを検証した。様々な条件で検討を繰り返した結果、形質膜上で Vap33 MSP ドメインは細胞外を向いていることが明らかになった。更にこの結果を検証する目的で、FLAG-Vap33-HA をトランスフェクションした細胞の免疫電子顕微鏡観察を行なった (旭川医科大学・甲賀大輔氏、鹿児島大学・久住聡氏との共同研究)。その結果、想定通り、Vap33 MSP ドメインが細胞外に局在していることが明らかになった。

結果 3 : Vap33 は典型分泌経路を介して形質膜上へ輸送される

上記結果から、Vap33 は小胞体上では MSP ドメインを細胞質側へ向け、一方、形質膜上では MSP ドメインを細胞外へ向けていることが分かった。次に小胞体膜から形質膜までの Vap33 細胞内輸送経路に関して解析することとした。ショウジョウバエ遺伝学的手法を用い RNAi スクリーニングを行った結果、Vap33 は典型分泌経路を用いて形質膜まで輸送されることが明らかになった。更に「結果 1」で記載した Split-GFP システムを用いて Vap33 の膜挿入状態 (トポロジー) を詳細に解析した結果、Vap33 は細胞内輸送過程で小胞体・ゴルジ体までは MSP ドメインを細胞質側に向けていることが明らかになった。

結果 4 : 形質膜まで輸送された Vap33 はマトリックスプロテアーゼによって切断されて分泌される

形質膜まで輸送された Vap33 はどのようにして MSP ドメインを切断し分泌するのだろうか。「結果 3」で行った遺伝学的スクリーニングを用いて各種プロテアーゼの可能性を検討した結果、マトリックスプロテアーゼ 1 と 2 (Mmp1/2) が形質膜上の Vap33 を切断することが明らかになった。

結果のまとめ :

本研究から、Vap33 は小胞体膜上では MSP ドメインを細胞質側へ向け、その後、典型分泌経路を経て形質膜上まで輸送されることが明らかになった。興味深いことに、Vap33 は形質膜上で MSP ドメインを細胞外へ向けている。この結果から、Vap33 はゴルジ体から形質膜の間でそのトポロジーを変換させていることが分かる。更に形質膜上の Vap33 は Mmp1/2 によって切断されて MSP ドメインを分泌することも明らかになった。Mmp1/2 が Vap33 を切断することは、Vap33 の MSP ドメインが細胞外に向いている事実とも一致する。

本研究の学術的意義 :

「膜タンパク質の親水性ドメインが、疎水性を帯びた生体膜を乗り越えてトポロジーを変化させる」という現象は、物理化学的な問題を抱えているためその存在自体が疑問視されてきた。しかし近年、トポロジーが変化することで膜タンパク質の機能が切り替わる例が報告され始めている。例えば、細胞環境に応じて CC ケモカイン受容体 (GPCR の 1 つ) のトポロジーが変化し、リガンド応答性が調節されることが示された (eLife, e40234, 2019)。このようにトポロジー変化の生理的・機能的重要性に注目が集まっている。しかし、膜タンパク質のトポロジー変化は、従来の膜タンパク質に関するドグマに反する概念であるため研究が進んでいないのが現状である。今回研究代表者は、敢えて上記難題を研究対象とし、膜タンパク質の「ドグマ」が本当に正しいかを検証し、実際に Vap33 が細胞内輸送過程もしくは形質膜上でそのトポロジー状態を変化させていることを証明することに成功した (論文投稿中 2023)。

VAP/Vap33 の MSP ドメインは「細胞質側に位置する」ことから、その分泌過程で ER・ゴルジ経路 (典型的な分泌経路) を通ることはないと考えられてきた。細胞質中のタンパク質が如何にして分泌されるのかについては不明な点が多く、非典型的な分泌経路も含めて様々な仮説が提唱されてきた。今回の結果は、細胞質側に局在する膜タンパク質ドメインであっても、トポロジー変換することで ER・ゴルジ経路を介して

分泌される可能性を示している。今後、VAP/Vap33 と同様のトポロジー変換、分泌メカニズムを用いた様式で分泌される分子群の同定が期待される。

運動神経系の神経変性疾患では、脂質の組成に異常が生じている (Front Mol Neurosci 10, 1-14, 2017)。膜タンパク質が脂質依存的にトポロジー変化するという知見を考慮すると、これらの疾患では、様々な膜タンパク質のトポロジーが逆転している可能性がある。そこで、本研究で得られた結果を基に、「膜タンパク質のトポロジーを変化させることでその機能を調節する」ような薬剤を開発できれば、「治らない病気」と言われてきた神経疾患の治療に解決の糸口が見えるかもしれない。特に VAP は、指定難病としての認定を受けている ALS の原因遺伝子でもあることから、VAP/Vap33 に関する分泌メカニズムの解明は ALS の創薬に繋がる可能性を秘めている。

膜タンパク質は全タンパク質の 30%、創薬標的の 50% を占めており、生命現象や医療に広く関与している。よって、本研究を通して膜タンパク質トポロジーに関する新しいパラダイムを確立できれば、分子生物学・細胞生物学を始めとした学術・医療・創薬・産業などといった多様な側面にインパクトを与えることができる。