

---

## 総 説

---

### 徳島発の臨床応用を目指した基礎研究

#### - トランスレーショナルリサーチを視野にいれた「小胞輸送」研究 -

佐々木 卓也, 西村 範行, 水野 広一, 真鍋 進治

徳島大学大学院医学研究科生体制御医学講座分子病態学分野

(平成15年3月5日受付)

(平成15年3月10日受理)

#### はじめに

21世紀に入り、気がつくとも日本の経済は最悪の状況になっており、多くの産業でお隣の韓国や中国にも大きく遅れをとっている。そのような状況で、日本はバイオサイエンス立国としての生き残りを決意し、政府は、特に「ライフサイエンス」の発展に力をいれ、この分野で国際社会における先導的な役割を果たしていくことを目指している。トランスレーショナルリサーチプログラムは、そういった状況で、文部科学省が打ち出した、「21世紀型革新的先端ライフサイエンス技術開発プロジェクト」のひとつにも挙げられており、本学でも、トランスレーショナルリサーチをひとつの看板に掲げていく方針である。トランスレーショナルリサーチとは、「ライフサイエンス分野の基礎的知見のうち、医療を通じて将来的に人への適用が見込まれるものに関し、有効性、安全性に関するデータ等を蓄積し、臨床現場で試験することなどにより臨床応用を推進することを目指す研究」と定義されている。したがって、臨床の教室は、単にこれまでに確立した診断法、治療法を施行するだけでなく、新しい診断法、治療法を自ら開発していくことが求められ、私共基礎の教室は、基礎研究として独創的であるだけでなく、臨床の現場に新たに提供できる、しかも、社会に還元される可能性の高い研究成果を出して行くことが求められている。本稿では、このような時代に、私共がトランスレーショナルリサーチを視野にいれて研究している「小胞輸送」について概説したい。

#### 1. 小胞輸送とは？

細胞が正常に機能するためには、その機能を制御する

分子（機能分子）が正しい時に正しい場所で働く必要がある。そのためには、細胞内で合成された機能分子が本来働く場所に運ばれる必要があるが、その時、機能分子の多くは小胞に積み込まれて運ばれる。これが「小胞輸送」である。例えば、グルタミン酸などの神経伝達物質はシナプス小胞に取り込まれ、神経終末のプレシナプス膜に運ばれてそこでシナプス間隙に放出されて働く。ホルモンや消化酵素は細胞内で合成された後、分泌顆粒に濃縮され、細胞膜に運ばれて細胞外に放出されて作用する。これらの機能分子が小胞輸送により正しく運ばれることは、神経伝達や内分泌・外分泌といった種々の生理機能の発現に必須であり、この輸送における異常は、痴呆症や記憶障害、種々の内分泌・外分泌障害といった疾病の病態生理に直結している。一方、必要となくなった機能分子が処理される際にも小胞輸送が関与している。例えば、細胞増殖因子が細胞膜の受容体に結合すると、増殖のシグナルがONになり、細胞内に伝えられるが、そのシグナルがOFFされるためには、受容体が細胞内に取り込まれ、最終的にはリソソームに運ばれて壊される必要がある。この過程にも小胞輸送が関与しており、その異常は、がん（異常増殖）につながる事が明らかになっている。このように「小胞輸送」は種々の重要な細胞機能の発現につながる細胞の基本となるしくみであることから、米国や欧州においては、古くから現在に至るまで細胞生物学における最も主要な研究テーマとなっているが、最近では、その制御の破綻が多くの疾患に関与している可能性が高いことから、種々の分野の臨床研究において広く注目されつつある<sup>1,2)</sup>。

この「小胞輸送」とは、基本的には、図1に示したように、細胞内のある1つの膜系（ドナー膜系）から芽が出て小胞が形成され（budding）、この小胞が他の膜系

(アクセプター膜系)に移動 (targeting) して結合し (tethering/docking), 融合 (fusion) する現象のことである。この targeting と tethering/docking および fusion の過程を主に制御する分子のひとつとして, Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) が存在する<sup>2-5</sup>)。Rab が小胞輸送の制御に関与していることは, 1980年に Schekman らにより単離された酵母の小胞輸送に必須の遺伝子群 (SEC) のひとつである *SEC4* が, 1987年に, Novick らによって, Rab のメンバーであることが発見され, 初めて明らかにされている。同じ頃, Gallwitz らにより発見された Ypt1 も, 小胞体からゴルジ装置への小胞輸送に作用する酵母の Rab のメンバーであることが報告されている。その後, 哺乳動物細胞にも多数の Rab のメンバーが見い出され, ゲノムプロジェクトがほぼ終了した現在, その数は60以上にものぼることが判明しており, 現在, 小胞輸送の分子機構を考える上で, Rab の研究は欠かせないものとなっている。

## 2. Rab の局在と活性制御機構

多くのメンバーから成る Rab は, それぞれのメンバーが細胞内の特定の膜系に局在し (図 2), その部位での

小胞輸送を制御している<sup>2-5</sup>)。例えば, Rab1や Rab2は小胞体~ゴルジ装置に, Rab6はゴルジ装置に局在し, それぞれの部位で合成/分泌経路の小胞輸送に関与している。Rab3A はシナプス小胞を含む分泌小胞に局在し, 神経伝達物質放出などのシグナル依存性のエキソサイトーシスに関与している。Rab4と Rab5は初期エンドゾームに局在し, エンドサイトーシスや受容体のリサイクリングに機能している。また, 多くのメンバーは全ての組織で普遍的に発現しているが, 組織特異的に発現するメンバーも見い出されており, Rab17や Rab25は上皮細胞特異的に発現している。

Rab には, 不活性型の GDP 結合型と, 活性型の GTP 結合型が存在する<sup>2-5</sup>)。GDP 結合型から GTP 結合型への変換は GDP/GTP 交換反応を促進する GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 (GDP/GTP exchange protein; GEP) と, GDP 結合型に結合して GTP 結合型への変換を抑制する GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質 (GDP dissociation inhibitor; GDI) により制御され, GTP 結合型から GDP 結合型への変換は, Rab 自身のもつ GTPase 活性を促進する GTPase 活性促進蛋白質 (GTPase-activating protein; GAP) により制御される。Rab GDI は Rab のメンバーすべてに作用するのに対し, Rab GEP や Rab GAP

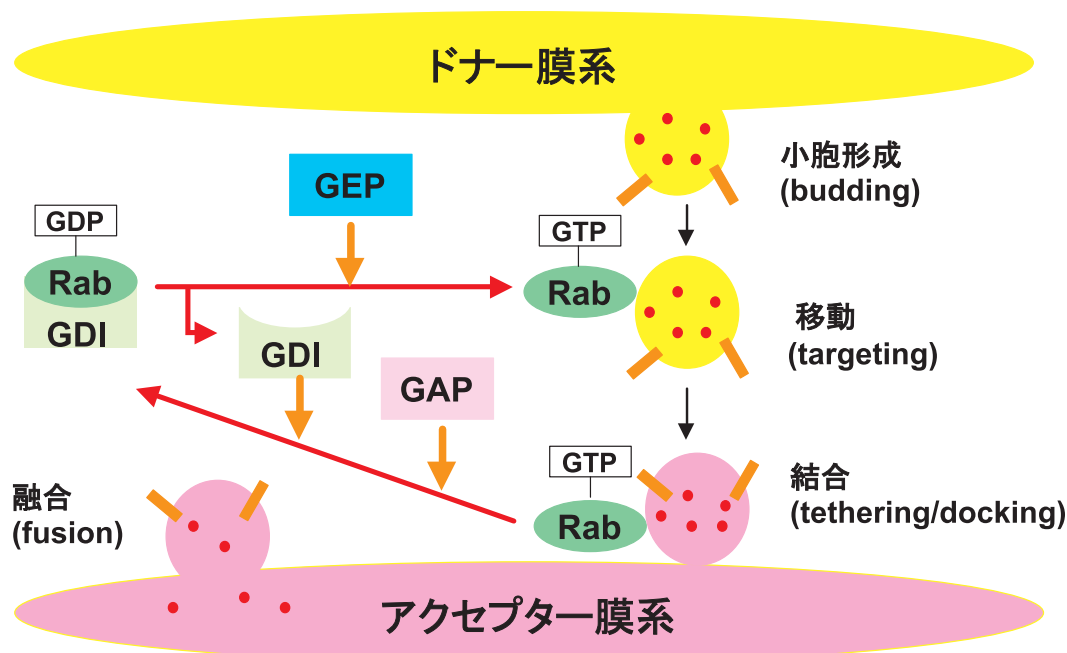


図 1 小胞輸送の基本過程と Rab

小胞輸送は小胞形成, 移動, 結合, 融合の4つの基本過程から成り, Rab は移動, 結合, 融合の過程を主に制御している。Rab は, GEP, GDI, GAP の少なくとも3個の活性制御蛋白質により, その活性と局在がサイクリカルに制御されて機能している。

は各メンバーに特異的であることが近年明らかになってきている。

Rab は、これらの活性制御蛋白質により、その活性と局在がサイクリカルに制御されて機能している（図 1）。静止状態の細胞では、Rab は GDP 結合型として Rab GDI と複合体を形成して細胞質に存在している。何らかの機序で、Rab GDI が Rab から解離すると、GEP が作用し、Rab は GTP 結合型に転換される。GTP 結合型 Rab は、各々の Rab に特異的な標的蛋白質と、ドナー膜、小胞膜、あるいはアクセプター膜上で結合し、その結果、小胞はアクセプター膜系に運ばれて結合する。こ

れらの作用が終了すると、GAP によって GDP 結合型に転換され、GDP 結合型は再び Rab GDI と複合体を形成して細胞質に戻る。この活性制御蛋白質のうち、佐々木らが1990年に発見した Rab GDI の神経特異的なイソフォームである Rab GDI $\alpha$  については、最近、イタリアのグループがヒトでその遺伝子変異を見出し、それが X 染色体性非特異的精神遅滞の原因のひとつであることを報告している。このように、活性制御蛋白質の異常が疾患につながることから、小胞輸送の制御における Rab の重要性が十分に予想される。

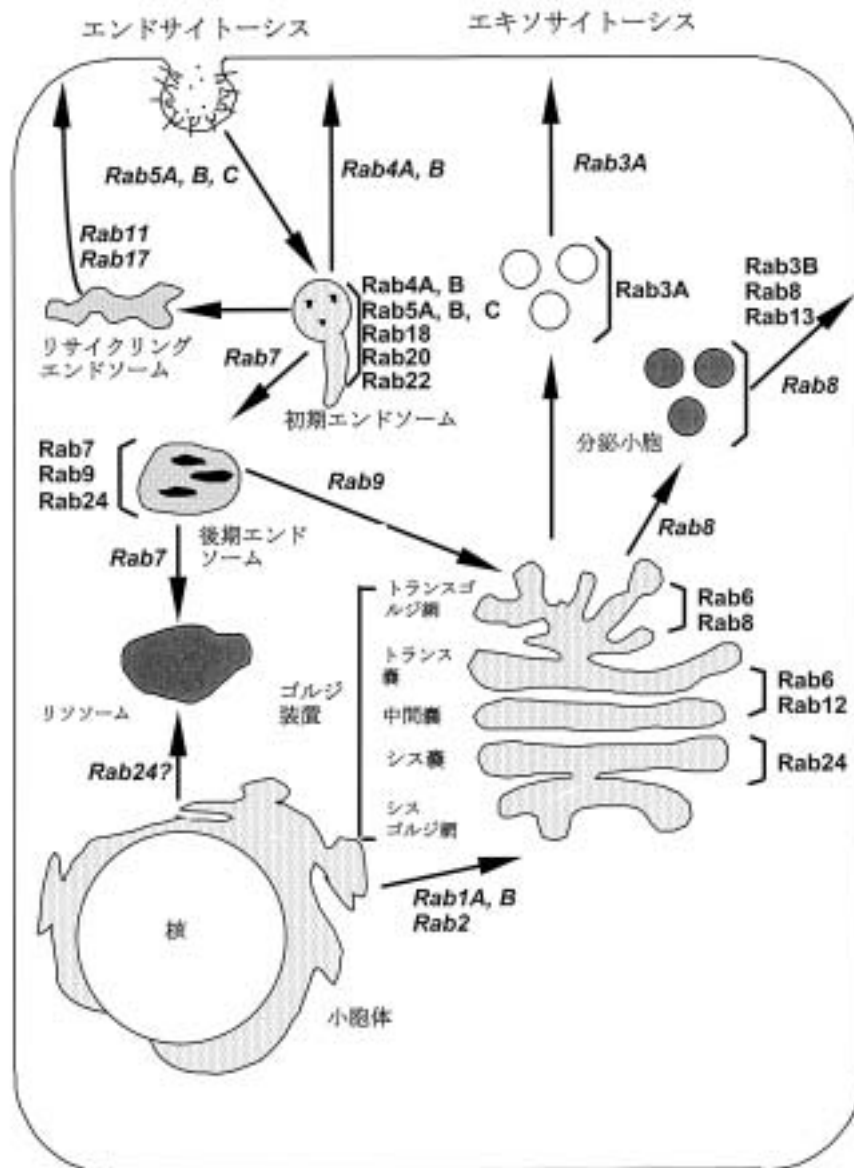


図 2 Rab の細胞内局在  
Rab の各メンバーの局在は正字で、制御する経路は斜字で示した。

### 3. Rab の機能と作用機構

Rab は、その GTP 結合型がメンバー特異的な標的蛋白質を細胞質から膜系にリクルートすることによって特定の小胞輸送経路を制御している<sup>2-5</sup>。さらに、各メンバーには複数個の標的蛋白質が存在し、それらが協調して小胞輸送の過程を調節していることが明らかになりつつある。例えば、Rab5の標的蛋白質として見い出された hVPS34/p150, EEA1, Rabenosyn 5では、PI3K である hVPS34/p150は Rab5によって初期エンドソームにリクルートされ、そこでホスファチジルイノシトール3リン酸 (PIP3) を産生する。その PIP3が Rab5とともに、EEA1や Rabenosyn 5を初期エンドソームへリクルートし、これらの標的蛋白質が tethering/docking 過程を進行させ、その結果、初期エンドソームの fusion が引き起こされると考えられている。

Rab が制御する fusion 過程の重要な作用部位として、Rothman らにより発見された SNARE 蛋白質が考えられている。SNARE 蛋白質は、小胞とアクセプター膜系の両側に普遍的に存在し、SNARE 蛋白質のトランスな結合が小胞とアクセプター膜との fusion を導く。最近、Rab にリクルートされた標的蛋白質自体あるいは標的蛋白質に結合する蛋白質 (複合体) が SNARE 蛋白質やその制御蛋白質と結合することが明らかになってきており、これが Rab による fusion 過程の制御機構の本体だと考えられている。また、小胞が微小管やアクチン線維に沿って輸送される targeting 過程では、Rab またはその標的蛋白質がキネシンやダイニンあるいはミオシン V などのモーター蛋白質の輸送小胞 (または膜系) へのリクルートに作用することも明らかになってきている。例えば、Rab27とその標的蛋白質 Melanophilin は、ミオシン V と3者複合体を形成することによって、メラノソームのアクチン線維に沿った移動を制御しており、Rab7の標的蛋白質 RILP は、ダイニンをリソソームにリクルートし、リソソームの微小管に沿った移動を制御している。

### 4. おわりに

本稿では、小胞輸送とその制御に関わる Rab につい

て、現在までにわかっている知見を簡潔に紹介した。Rab が発見されてから未だ十数年しか経ていないが、これまでの研究によって、Rab は小胞輸送制御の鍵を握る蛋白質であることが明らかになってきている。現在、小胞輸送の異常による疾患が多数同定されてきているが、その中には、上述した Rab の活性制御蛋白質の遺伝子変異だけでなく、Rab 自体の遺伝子変異 (例えば、Griscelli 症候群における Rab27A の異常、Charcot-Marie-Tooth 病 type2B における Rab7の異常) も発見されている。したがって、Rab の解析を中心に細胞の基本的なしくみである「小胞輸送」の制御機構を明らかにしようとする研究は、細胞生物学の古くからの命題に取り組んだ基礎研究であるだけでなく、種々の疾患の病態の解明や、新しい診断・治療法の開発につながる研究成果を期待できる。現在、私共の教室では、神経伝達物質の放出や接着分子の輸送、増殖因子受容体の破壊等に関わる種々の小胞輸送について、その小胞輸送経路を制御する Rab のメンバーを各々同定して、その機能を解析するというストラテジーで、関連の臨床講座と共同で研究を進めている。これらの研究成果を近いうちに徳島大学発のオリジナルなトランスレーショナルリサーチの発信につなげることができれば、と考えている。

### 文 献

本稿により、「小胞輸送」の研究に興味を持たれた方は、以下の最近の総説を参考にして欲しい。

- 1) 「タンパク質の一生 タンパク質の誕生、成熟から死まで」(中野明彦, 遠藤斗志也 / 編) 共立出版 2000
- 2) 「細胞内輸送がわかる」(米田悦啓 / 編) 羊土社 2002
- 3) Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T.: Small GTP-binding protein. *Physiol.Rev.*, 81 : 153-208 2001
- 4) Zerial, M. & McBride, H.: Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2 : 107-117 2001
- 5) Pfeffer, S.R.: Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.*, 11 : 487-491 2001

*Patient-oriented basic science in The University of Tokushima*  
*-“Vesicle transport” : from basic science to translational research and clinical application-*

*Takuya Sasaki, Noriyuki Nishimura, Kouichi Mizuno, and Shinji Manabe*

*Department of Biochemistry, The University of Tokushima Graduate School of Medicine, Tokushima, Japan*

#### SUMMARY

Transfer of proteins and lipids by means of small, membrane-bound vesicles within the cell is essential for virtually all cell functions. Defects in targeting functional molecules to the appropriate destinations can render cells non-functional, thereby causing diseases. The Rab small G protein family (Rab) consists of over sixty members, and is implicated in intracellular vesicle transport, which includes exocytosis, endocytosis, and transcytosis. Rab cycles between the GDP-bound inactive form and the GTP-bound active form and translocates between the cytosol and the membranes, and these cyclical activation, inactivation, and translocation processes are regulated by at least three types of regulatory proteins (GDI, GEP, GAP). The GTP-bound form then interacts with downstream effectors and functions through them. Evidence is accumulating that Rab is a key molecule to clarify molecular physiology and pathophysiology of vesicle transport.

Key words : vesicle transport, Rab, GDI, GEP, GAP