

## 小胞体-ゴルジ体膜接触を介したトランスゴルジネットワークからの CARTS輸送小胞形成の制御

若菜 裕一

### 1. はじめに

真核細胞において、トランスゴルジネットワーク (*trans*-Golgi network : TGN) は、タンパク質分泌経路の主要な積み荷選別の場として機能している。小胞体で合成されたタンパク質はCOPII小胞により、ゴルジ体のシス側へと輸送された後にトランス側へと移行し、TGNにおいてその目的地に応じた輸送小胞に搭載される。これらの輸送小胞は、頂端部および側底部細胞膜、エンドリソソームシステム、ゴルジ体初期区画、分泌顆粒（外分泌・内分泌細胞の場合）への輸送を仲介する。クラスリン被覆構造を有する一部の輸送小胞を除き、構成性分泌経路を仲介する輸送小胞の多くには特定の被覆構造がみられない。一般的に被覆構造の形成は、シグナル配列による積み荷の選別、輸送小胞の出芽、膜切断という一連のイベントの協調的な制御を可能にしているとされる。したがって、このような非被覆輸送小胞の形成がどのように制御されているのかは謎であったが、近年の研究からゴルジ体の脂質代謝および、小胞体-ゴルジ体膜接触を介した脂質輸送が重要な役割を持つことが次第に明らかになってきた。本稿では、我々が研究を進めている構成性分泌経路の輸送小胞、carriers of the TGN to the cell surface (CARTS) の発見の経緯と、これまでに明らかになったその生化学的特徴、特に小胞体-ゴルジ体膜接触を介したCARTSの形成制御機構について、関連する研究成果と合わせて紹介したい。

### 2. TGNにおける輸送小胞形成

TGNにおいて、タンパク質は大きく分けて三つの経路に振り分けられる（図1）。一つ目は、COPI小胞が仲介するゴルジ体初期区画への逆行輸送経路であり、ゴルジ体酵

素のリサイクリングに働く。二つ目は、エンドリソソームシステムへの輸送経路で、リソソーム酵素およびマンノース6-リン酸受容体を輸送する。この経路にはクラスリンアダプターであるAP-1やAP-3、GGA（Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, Arf-binding protein）が関与している。三つ目は、細胞膜への輸送経路であり、AP-1やクラスリン非依存的に機能するAP-4の関与が示唆されている。TGNからは、特徴的な格子構造を持つクラスリン小胞とは異なるタイプの輸送小胞が形成される。それらは球状のものからさまざまなチューブ状のもの（枝分かれや穴があるなど）を含む不定形を示し、サイズも不均一である。構成性分泌経路の輸送マーカーとして広く利用される水疱性口内炎ウイルスのコート糖タンパク質（vesicular stomatitis virus G protein : VSV-G）は、このようなチューブ状の輸送小胞によってTGNから出芽し、微小管に沿って細胞膜に輸送されることが示されている。しかし、VSV-Gはリサイクリングエンドソームを経由して細胞膜に輸送されるという報告もあり、輸送経路は細胞の種類によって異なる可能性がある。

TGNにおけるこのような非被覆輸送小胞の形成機構については、不明な点が多く残されているが、キーとなる分子装置がいくつか同定されている<sup>1-3)</sup>。たとえば、輸送小胞の前駆体をTGN膜から分離するための膜切断には、ダイナミン（低分子量Gタンパク質であるArf1の下流でアクチン・コータクチンとの複合体として機能する）とプロテインキナーゼD（protein kinase D : PKD）が仲介するシグナル経路がそれぞれ独立に関与していると考えられる<sup>3)</sup>。キナーゼ活性を消失したPKDのドミナントネガティブ変異体を細胞に過剰発現させると、TGNからは輸送小胞の前駆体に相当する長いチューブ構造が形成される。一方、活性化型PKDの過剰発現は、ゴルジ体膜の小胞化を引き起こす。これらの結果は、PKDのキナーゼ活性が膜切断に重要であることを示している。

### 3. CARTSの単離・同定

我々は以前、TGNから細胞膜に輸送される積み荷膜タンパク質であるTGN46を含む輸送小胞を細胞から単離し、質量分析によってその構成タンパク質を同定した<sup>4)</sup>。ここでは、ジギトニンで膜透過処理を施したHeLa細胞

東京薬科大学生命科学部（〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1）

Regulation of CARTS biogenesis from the *trans*-Golgi network through ER-Golgi membrane contact sites

Yuichi Wakana (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940396

© 2022 公益社団法人日本生化学会

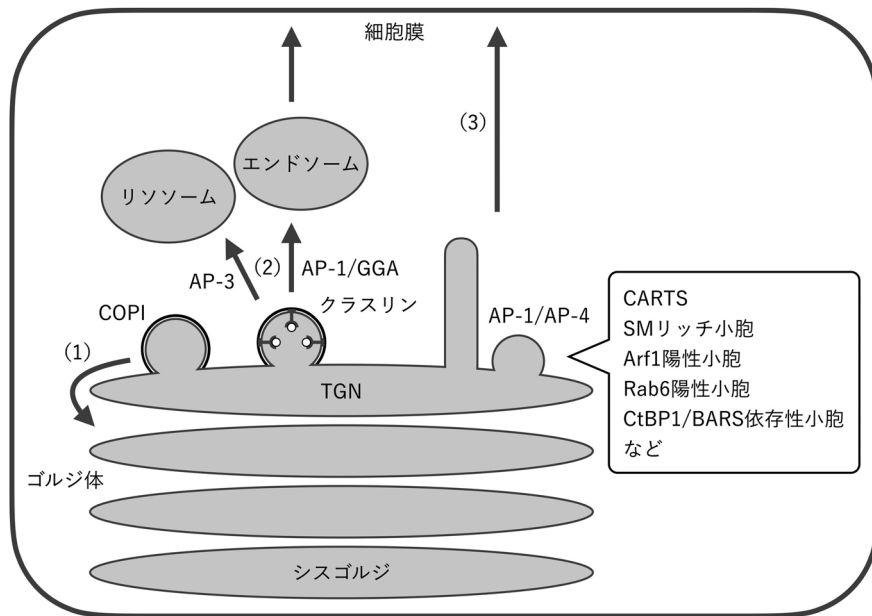


図1 TGNにおける輸送小胞形成

(1)COPI小胞が仲介するゴルジ体初期区画への逆行輸送経路。(2)クラスリン/AP-1/AP-3/GGAが仲介するエンドリソソームシステムへの輸送経路。積み荷タンパク質は、積み荷受容体とアダプタータンパク質を介してクラスリン被覆構造と結合する。(3)細胞膜への輸送経路。これまでにCARTSの他、いくつかの輸送小胞が見いだされている<sup>2,3)</sup>。C-terminal-binding protein 1 (CtBP1)/brefeldin A ADP-ribosylation substrate (BARS) 依存性小胞は、CARTSと同様にPKD依存性の構成性分泌経路を仲介するが、VSV-Gを含む点でCARTSと区別される。しかし、その他の輸送小胞については、共通の分子装置 (Rab6やPKD, アクチン, SMなど) や積み荷タンパク質 (VSV-GやリゾチームCなど) を含むものがあり、完全に異なるものとしては分類できない。

に、ATP再合成系とラット肝臓サイトゾル（流出した細胞質ゾル成分を補うため）を加えて32℃でインキュベーションを行い、TGNからの輸送小胞形成を誘導した。その後、細胞と輸送小胞を遠心分離し、抗TGN46抗体を用いた免疫沈降によって目的とする輸送小胞を単離した。質量分析の結果、我々がCARTSと名づけたこの輸送小胞は、TGN46の他に複数の分泌タンパク質と細胞膜タンパク質を含むことがわかった。これらのうち、pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) という分泌タンパク質は、CARTSに高度に濃縮されており、PAUFをCARTSマーカーとして用いた解析から、この輸送小胞が低分子量Gタンパク質であるRab6aとRab8aを含むこと、TGNから直接細胞膜へ向かう輸送経路を仲介することなどがわかった。PKDのキナーゼ活性は、PAUFの分泌やCARTS形成に必要であることから、CARTSはPKD依存性の構成性分泌経路の輸送小胞であることが示された。

#### 4. CARTSが仲介する輸送経路

CARTSは、PKD依存性輸送小胞のサブクラスの一つであり、PKD依存性の構成性・調節性分泌経路にはその他にも複数の輸送小胞が関与していると考えられる<sup>3)</sup>。CARTSは、VSV-GやコラーゲンIをTGNから細胞膜へ運

ぶ輸送小胞とは異なり、実際にCARTSのサイズ（直径100～250nm）はコラーゲンを輸送するには小さい。VSV-G輸送経路との比較から、我々はこれまでにCARTS輸送経路に特異的な役割を持つ分子を見いだしている。

キネシン-5/Eg5は、有糸分裂期に二極性の紡錘体を形成させる働きがあるが<sup>5)</sup>、間期には微細管に沿ったCARTSの輸送に関与することがわかった<sup>6)</sup>。双極性モーターであるこのタンパク質が、どのようにCARTSの移動を特異的に制御しているのかはまだ明らかになっていない。最近、キネシン-1/KIF5Bとキネシン-3/KIF13Bが連携してCARTSの輸送に働くことが報告されている<sup>7)</sup>。

CARTSの構成因子として同定されたミオシンIIは、もともとVSV-Gの細胞膜への輸送に関与し、Rab6陽性小胞をTGN膜から形成する際の膜切断に働くことが報告されていた<sup>8)</sup>。しかし、我々のデータはミオシンIIがCARTS形成に必要でないことを示しており、むしろこのタンパク質はCARTSが細胞膜に融合するために表層アクチンを通り抜ける際に重要であると考えられる<sup>4)</sup>。

我々は最近、小胞体膜のコレステロールセンサーであるsterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) が、小胞体-ゴルジ体膜接触部位に存在し、TGN膜からのCARTS形成を特異的に促進することを見いだした<sup>9)</sup>。その詳細については後述する。

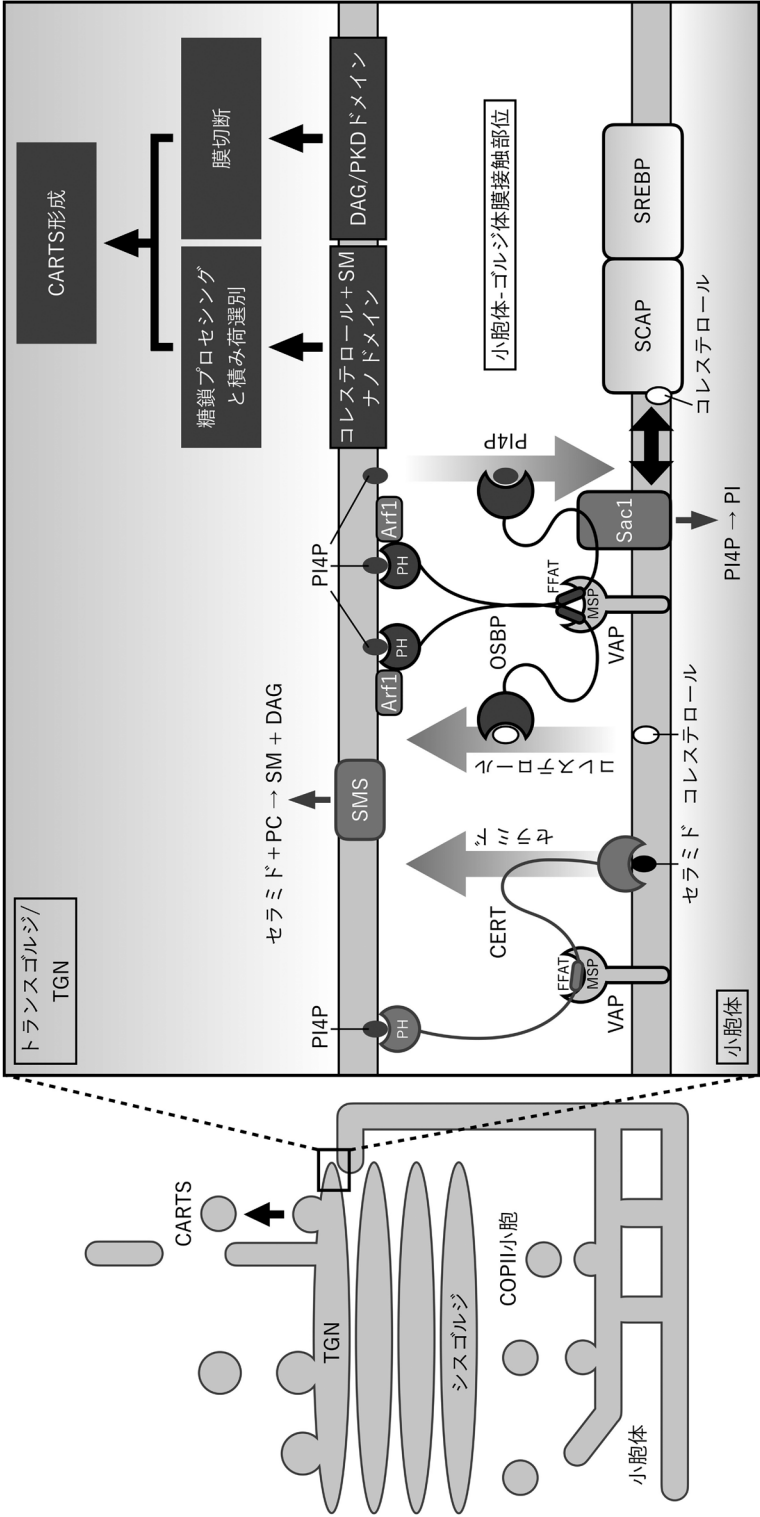


図2 小胞体-ゴルジ体膜接触を介した脂質輸送とCARTS形成制御  
小胞体-ゴルジ体膜接触部位において、VAP-CERT複合体はセラミドを小胞体からトランスゴルジ/TGNに輸送する(図中央)。輸送されたセラミドは、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine : PC) とともにSM合成酵素 (SM synthase : SMS) の働きにより、SMとDAGに代謝される。VAP-OSBP-Sac1複合体は、コレステロールとPI4Pを交換輸送する。小胞体膜のコレステロールと結合したSCAPとSREBPの複合体(図右下)は、Sac1を介してVAP-OSBPと相互作用し、その働きを促進していると考えられる。TGNにおいて、コレステロールとSMは脂質ナノドメインを形成して糖鎖プロセッシングと積み荷選別に働き、DAGはPKDによる膜切断を介してCARTS形成を促進すると考えられる(図右上)。



## 5. 小胞体-ゴルジ体膜接触を介したCARTS形成制御

近年の研究から、TGN膜からの輸送小胞形成には、小胞体とゴルジ体の膜接触（オルガネラコンタクト）を介した脂質輸送が重要な役割を持つことが次第に明らかになってきた。小胞体-ゴルジ体膜接触部位では、脂質が輸送小胞を介さず、両オルガネラ間で直接やりとりされる<sup>3, 10)</sup>。膜接触部位におけるこのような局所的で速い、指向性を持った脂質輸送は、小胞体膜のvesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP)とゴルジ体膜の脂質輸送タンパク質の相互作用に基づいている（図2）。膜貫通型の小胞体膜タンパク質であるVAPは、細胞質側のmajor sperm protein (MSP)ドメインを介して脂質輸送タンパク質のFFAT (two phenylalanines in an acidic tract) モチーフと結合することにより、小胞体をさまざまなオルガネラ膜に繫留させる働きがある。小胞体-ゴルジ体膜接触部位では、これまでにceramide transport protein (CERT) や oxysterol-binding protein (OSBP), four-phosphate adaptor protein 2 (FAPP2), Nir2といった脂質輸送タンパク質がVAPと相互作用することが明らかになっている。

CERTとOSBP, FAPP2はいずれもN末端側にpleckstrin homology (PH)ドメイン、中央にFFATモチーフ、C末端側に脂質輸送ドメインという類似した構造を持つ。PHドメインは、ホスファチジルイノシトール4-リン酸 (phosphatidylinositol 4-phosphate : PI4P) およびArf1と結合し、トランスゴルジ/TGN膜への結合に働く。膜接触部位におけるVAPとの相互作用を介して、CERTは小胞体からトランスゴルジ/TGNにセラミドを、OSBPはコレステロールを輸送する。OSBPによるコレステロールの輸送は、PI4Pの逆方向の輸送を伴い、小胞体に輸送されたPI4PはSac1 (PI4Pホスファターゼ) によって脱リン酸化されてPIとなる。この反応はコレステロール濃度の低い小胞体から高いゴルジ体へのコレステロール輸送の駆動力を生み出すと考えられている<sup>11)</sup>。FAPP2は、グルコシルセラミドをシスゴルジからトランスゴルジに輸送し、Nir2はPIを小胞体からゴルジ体に輸送する。CERTとOSBPは、PKDによりリン酸化されてTGN膜から解離することがわかっており、このような分子のターンオーバーは効率的な脂質輸送を可能にするとともに、小胞体膜とゴルジ体膜の結合・解離のダイナミクスを生み出していると考えられる。

超解像顕微鏡を用いた解析から、我々はCARTSの出芽が小胞体-ゴルジ体膜接触部位に近接したTGN膜ドメインで起こることを見いだした<sup>9)</sup>。VAPの二つのアイソフォーム (VAP-AとVAP-B) のダブルノックダウンは、TGN膜からのCARTS形成を抑制し、同様の結果はCERTとOSBPのダブルノックダウンや小胞体-ゴルジ体膜接触のダイナミクスを低下させるOSBP変異体の過剰発現によっても

得られた<sup>12)</sup>。これらの結果は、小胞体-ゴルジ体膜接触部位を介した脂質輸送がCARTS形成に重要であることを示唆している。また、これらの実験条件下では、CARTSの積み荷タンパク質であるPAUFのプロセッシングも阻害されることがわかった。TGNにおける糖鎖プロセッシングには、機能的な酵素ドメインの形成が不可欠であり、それはスフィンゴミエリン (sphingomyelin : SM) のホメオスタシスと深く結びついている。SMはコレステロールと重合し、秩序液体 (liquid-ordered) ナノドメインを形成することが知られ、他の脂質から隔離されたこのような脂質ナノドメインは、糖鎖プロセッシングや積み荷選別、輸送小胞形成に働くタンパク質に機能的な足場を提供すると考えられている。SMはセラミドとホスファチジルコリンから合成されるが、同時に生じるジアシルグリセロール (diacylglycerol : DAG) は、PKDをTGN膜にリクルートする働きがある。これらのことから、TGNにおけるCARTS形成は、1) コレステロールとSMに富んだ脂質ナノドメインの形成と2) DAG依存的なPKDのリクルートという少なくとも二つのシグナル経路によって制御されていると考えられる（図2）。

## 6. 小胞体膜コレステロールセンサー SCAPによるCARTS形成の促進

SCAPは、コレステロールホメオスタシスの維持に関わる膜タンパク質である<sup>13)</sup>。細胞内のコレステロールが欠乏すると、SCAPはその結合パートナーである膜結合型転写因子SREBPを小胞体からゴルジ体に輸送する。ゴルジ体でプロテアーゼによる切断を受け活性化したSREBPの転写活性化ドメインは、核内に移行し、コレステロールの生合成と取り込みに関わる遺伝子の転写を促進する。一方、小胞体に十分な量のコレステロールが存在するとき、コレステロールと結合したSCAPは小胞体膜のInsigと結合し、SREBPを小胞体にとどめる働きがある。我々は、十分量のコレステロール存在下において、小胞体膜のSCAP-SREBP複合体プールの一部が、Sac1を介してVAP-OSBPと相互作用し、小胞体-ゴルジ体膜接触部位に局在することを見いだした<sup>9)</sup>。SCAPは、小胞体膜のコレステロールレベル依存的にコレステロール/PI4P交換輸送を促進することでCARTS形成を促進すると考えられる（図2）。

## 7. TGNにおけるSM代謝と積み荷タンパク質の選別

最近、TGNにおけるSM合成がSPCA1というCa<sup>2+</sup>ポンプを活性化し、Cab45 (TGN内腔のCa<sup>2+</sup>結合タンパク質) のオリゴマー化を誘導することでSMリッチな輸送小胞の積み荷選別を促進することが明らかになった<sup>14)</sup>。ま

た、TGN膜のSMリッチドメインに局在するSyndecan-1は、リポタンパク質リパーゼ (lipoprotein lipase : LPL) の積み荷受容体として機能し、LPLをSMリッチな輸送小胞に搭載する働きがあることが報告された<sup>15)</sup>。CARTSの膜もSMリッチであることが示唆されており、SPCA1-Cab45による積み荷選別を受けるリゾチームCがCARTSの積み荷分子として同定されていることから、同様の仕組みがCARTSの積み荷選別に働いている可能性が高い。

## 8. おわりに

CARTSの同定により、新たな輸送経路の解析が可能となり、それが新規分子および機能の発見につながった。VAPのノックダウンは、CARTSだけでなくVSV-Gの輸送も阻害することから、小胞体-ゴルジ体膜接触を介した脂質輸送は、少なくとも二つの輸送経路において重要な役割を持つ。興味深いことに、PI4P代謝に働くSac1の活性は、成長因子や代謝ストレスに起因する複数のシグナル経路の制御を受けている。また、ゴルジ体膜のPI4Pレベルの変化が輸送に及ぼす影響は、積み荷タンパク質ごとに異なっている。これらのことは、ゴルジ体膜の脂質代謝が多様な輸送小胞の形成制御に関与していることを示唆しており、膜接触を介した局所的な脂質の輸送と特異的な脂質ナノドメインの形成がそれを可能にしているのではないかと考えられる。近年、さまざまなタンパク質の同調輸送実験系や脂質プローブの開発が進んでおり、今後これらと超解像イメージング技術を組み合わせることで、輸送小胞形成の時間的制御に関する重要な手がかりが得られるものと期待される。

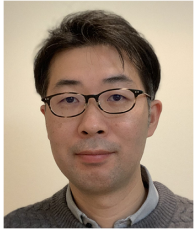
## 謝辞

最後に、多賀谷光男先生をはじめ本研究室の先生方、学生たち、共同研究を快く引き受けていただいた、あるいは試料をご提供いただいた研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Spang, A. (2015) The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane. *Membranes*, **5**, 84–98.
- 2) Stalder, D. & Gershlick, D.C. (2020) Direct trafficking pathways from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **107**, 112–125.
- 3) Wakana, Y. & Campelo, F. (2021) The PKD-Dependent Biogenesis of TGN-to-Plasma Membrane Transport Carriers. *Cells*, **10**, 1618.
- 4) Wakana, Y., van Galen, J., Meissner, F., Scarpa, M., Polishchuk, R.S., Mann, M., & Malhotra, V. (2012) A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.*, **31**, 3976–3990.
- 5) Kapitein, L.C., Peterman, E.J.G., Kwok, B.H., Kim, J.H., Kapoor, T.M., & Schmidt, C.F. (2005) The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*, **435**, 114–118.
- 6) Wakana, Y., Villeneuve, J., van Galen, J., Cruz-Garcia, D., Tagaya, M., & Malhotra, V. (2013) Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.*, **202**, 241–250.
- 7) Serra-Marques, A., Martin, M., Katrukha, E.A., Grigoriev, I., Peeters, C.A., Liu, Q., Hooikaas, P.J., Yao, Y., Solianova, V., Smal, I., et al. (2020) Concerted action of kinesins KIF5B and KIF13B promotes efficient secretory vesicle transport to microtubule plus ends. *eLife*, **9**, e61302.
- 8) Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B., & Echard, A. (2010) Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 645–654.
- 9) Wakana, Y., Hayashi, K., Nemoto, T., Watanabe, C., Taoka, M., Angulo-Capel, J., Garcia-Parajo, M.F., Kumata, H., Umemura, T., Inoue, H., et al. (2021) The ER cholesterol sensor SCAP promotes CARTS biogenesis at ER-Golgi membrane contact sites. *J. Cell Biol.*, **220**, e202002150.
- 10) Mesmin, B., Kovacs, D., & D'Angelo, G. (2019) Lipid exchange and signaling at ER-Golgi contact sites. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **57**, 8–15.
- 11) Antonny, B., Bigay, J., & Mesmin, B. (2018) The Oxysterol-Binding Protein Cycle: Burning Off PI(4)P to Transport Cholesterol. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 809–837.
- 12) Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N., Murate, M., Kobayashi, T., Arasaki, K., Inoue, H., & Tagaya, M. (2015) CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell*, **26**, 4686–4699.
- 13) Brown, M.S., Radhakrishnan, A., & Goldstein, J.L. (2018) Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 783–807.
- 14) Deng, Y., Pakdel, M., Blank, B., Sundberg, E.L., Burd, C.G., & von Blume, J. (2018) Activity of the SPCA1 Calcium Pump Couples Sphingomyelin Synthesis to Sorting of Secretory Proteins in the Trans-Golgi Network. *Dev. Cell*, **47**, 464–478.e8.
- 15) Sundberg, E.L., Deng, Y., & Burd, C.G. (2019) Syndecan-1 Mediates Sorting of Soluble Lipoprotein Lipase with Sphingomyelin-Rich Membrane in the Golgi Apparatus. *Dev. Cell*, **51**, 387–398.e4.

---

**著者寸描****●若菜 裕一**（わかな ゆういち）

東京薬科大学生命科学部助教，博士（生命科学）。

■**略歴** 2007年東京薬科大学大学院生命科学研究科博士後期課程修了。同年バルセロナCRG-Centre for Genomic Regulation 博士研究員，12年より現職。

■**研究テーマと抱負** ゴルジ体を中心とした細胞内物流システムの解析。コレステロールなどの脂質が，ゴルジ体を介し

て細胞機能の発現や疾患の発症にどのように関わっているのかを解明したいと考えています。

■**ウェブサイト** <https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/labo/200700014-3321.html>

■**趣味** 読書，音楽鑑賞，4歳の息子と遊ぶこと。