

GPIアンカー型タンパク質の選別輸送の品質管理

花岡 和樹¹, 黒川 量雄², 船戸 耕一¹

1. はじめに

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) はタンパク質を細胞膜につなぎとめる役割をしている糖脂質である。GPIが錨 (アンカー) のような役割を果たすことから, GPIによって修飾されたタンパク質はGPIアンカー型タンパク質 (GPI-AP) と呼ばれている。小胞体で*de novo*合成されたGPI-APは, GPIアンカーの構造変化 (リモデリング) を受けながら選別輸送され, 細胞表層へ運ばれる。近年, GPIアンカーのリモデリングがGPI-APの選別輸送に関与していることが明確となってきた。本稿では, GPI-APの生合成とリモデリング, そして選別輸送機構について, 筆者らの研究成果を交えながら概説する。

2. GPI-APの生合成

GPI-APは原虫のような原生生物, 真菌, 植物や動物に至る真核生物に広く存在しており, 哺乳動物では100種類以上, 出芽酵母では50種類以上あるといわれている。多くは細胞膜において機能を果たしているが, 酵母や植物では細胞壁に局在するタンパク質もGPIアンカーによる修飾を受けており, 細胞壁の生合成や恒常性維持に重要な役割を果たしている。GPIアンカーの基本骨格はイノシトールリン (Ino-P) 脂質, グルコサミン (GlcN), 三つのマンノース (Man) とエタノールアミンリン酸 (EtNP) からなるEtNP-6Man ($\alpha 1-2$) Man ($\alpha 1-6$) Man ($\alpha 1-4$) GlcN ($\alpha 1-6$) Ino-P脂質であり, 生物種間で保存されている^{1,2)}。

GPIアンカーの生合成は, Ino-P脂質 (PI) に*N*-アセチルGlcNがUDP-*N*-アセチルGlcNから転移する反応で始まる (図1)²⁾。Gpi1-3などのGPI-GlcNAc転移酵素による反応は小胞体膜の細胞質側で起こり, GlcNAc-PIが合成される。続いて, Gpi12により脱アセチル化されGlcN-PIとなる。GlcN-PIのイノシトール分子の水酸基に脂肪酸が付加され, GlcN-(acyl) PIが合成される。アシル化を触媒する出芽酵母の酵素Gwt1のトポロジー解析から, この過程が小胞体内腔側で行われていることが示唆されている。GlcN-PIは小胞体の細胞質側のリーフレットで合成されることから, 細胞質側から内腔側へ転移すると推察されているが, GlcN-PIが転移する直接的な証拠はまだ得られていない。GlcN-PIやGlcN-(acyl) PIなどのGPI中間体は出芽酵母Arv1の欠失株で蓄積する³⁾。この表現型は, 界面活性剤処理により拡散障壁としての膜を破壊すると失われることから, Arv1はGPI中間体の転移に関わる因子であると推定されている。Arv1は, 内腔側で合成され細胞質側へ拡散したGlcN-(acyl) PIを回収する働きを担っているかもしれない⁴⁾。一方で, トリパノソーマのArv1ホモログ (TbArv1) はGPI-GlcNAc転移酵素と物理的に相互作用することから, GPI-GlcNAc転移酵素の調節因子である可能性も提案されている。最近, GPI中間体の転移に関与する候補遺伝子として哺乳動物においてCLPTMILが同定された⁵⁾。

続いて, 小胞体内腔側で, GlcN-(acyl) PIにドリコールマンノースリン酸を供与体として直鎖状に三つのマンノースが転移される。細胞株や組織あるいはタンパク質により, 四つ目のマンノースが付加されることもある。それらマンノースにはホスファチジルエタノールアミン由来のEtNPが結合する。三つ目のマンノースに結合するEtNPはGPIアンカーの基本骨格の一部であり, そのEtNPのアミノ基がタンパク質のC末端とアミド結合してGPI-APができる。一つ目と二つ目のマンノースにもEtNPが結合する。近年, 動物細胞の変異株の解析から, 二つ目のマンノースに結合するEtNPもタンパク質のGPI化に使われていることが明らかにされた⁶⁾。また, 出芽酵母の解析から, 小胞体と他のオルガネラとの接触部位に存在する脂質輸送タンパク質CsflがEtNPをGPIアンカーに効率的に組み込むために必要であることもわかってきた⁷⁾。

¹ 広島大学大学院統合生命科学研究科 (〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4)

² 理化学研究所光量子工学研究センター (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

Quality-controlled GPI-anchored protein sorting

Kazuki Hanaoka¹, Kazuo Kurokawa² and Kouichi Funato¹
(¹ Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan, ² RIKEN Center for Advanced Photonics, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950228

© 2023 公益社団法人日本生化学会

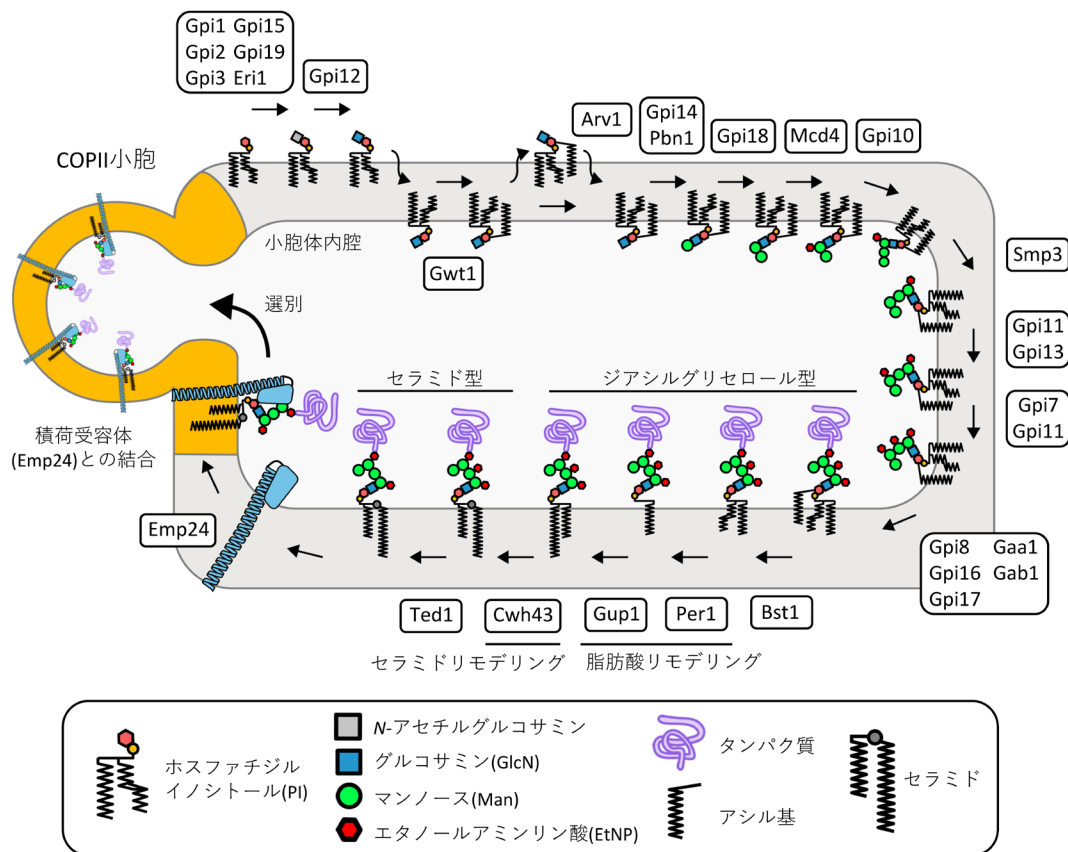


図1 出芽酵母におけるGPIアンカー型タンパク質の生合成とリモデリング

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) はホスファチジルイノシトール (PI) に、グルコサミン (GlcN)、マンノース (Man)、エタノールアミンリン酸 (EtNP) が順に付加されて合成される。Gpi8などからなるGPIトランスアミダーゼ複合体によってGPI完全前駆体がタンパク質に付加された後、糖脂質部分のリモデリングを経て、ゴルジ体へ運ばれる。

3. GPI-APのリモデリング

イノシトール分子に結合しているアシル基はGPIアンカーがタンパク質に付加された後に小胞体内腔で除去される。酵母において、Bst1による脱アシル化はミスfoldしたGPI-APの品質管理とGPI-APの脂質部分のリモデリングの両方に関与していることから、GPI-APの折りたたみとリモデリングに依存した小胞体からの排出を監視する装置として機能していることが提唱されている²⁾。脱アシル化の後、GPI-APの脂質部分の不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸に置換される (図1)。これを脂肪酸リモデリングと呼ぶ。哺乳動物では、この脂肪酸リモデリングにPGAP3とPGAP2が、酵母ではPer1とGup1が関与している^{1,2)}。哺乳動物PGAP3とPGAP2は主にゴルジ体に、出芽酵母Per1とGup1は主に小胞体に局在する。また、出芽酵母では、多くのGPI-APの脂質部分がジアシルグリセロール型からセラミド型へ変換される。この反応はセラミドリモデリングと呼ばれ、小胞体とゴルジ体の両方で起こる⁸⁾。小胞体でのセラミドリモデリングにはCwh43が関与しているが

(第6章にて詳述)、ゴルジ体でのセラミドリモデリングに関与する遺伝子はまだ同定されていない。脂肪酸リモデリングは、GPI-APが界面活性剤不溶画分に結合するのに必要な反応なので、脂質部分のリモデリングはGPI-APがスフィンゴ脂質とステロールに富む脂質ドメインと会合するのに重要であると考えられている。

GPIアンカーがタンパク質に修飾されたのち、二つ目のマンノースに付加されたEtNPは小胞体で除去される。このEtNPトリミングには、哺乳動物ではPGAP5、出芽酵母においてはそのホモログであるTed1が関与している^{9,10)}。出芽酵母のもう一つのPGAP5ホモログCdc1はゴルジ体に局在し、一つ目のマンノースのEtNPトリミングに関与すると考えられている。最近、Ted1と同様の機能を果たすDcr2がゴルジ体に局在することも報告された¹¹⁾。

4. GPIアンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への選別輸送

GPI-APは分泌タンパク質と同様に、コートタンパク質

複合体II (COPII) 小胞に詰め込まれて、小胞体からゴルジ体へ運ばれる。GPIアンカーの脂質部分が小胞体の内腔側のリーフレットに挿入されており、膜貫通していないために、細胞質側に存在するコートタンパク質とは直接相互作用できない。そのため、COPII小胞に集積するためには、細胞質側でコートタンパク質と直接結合する領域を持つ膜貫通型の積荷（カーゴ）受容体が必要である^{1,2)}。哺乳動物と出芽酵母の両方の研究により、p24ファミリータンパク質がGPI-APのカーゴ受容体として機能することが明らかにされている。出芽酵母のp24ファミリータンパク質Emp24とGPI-APとの結合にはTed1が必要であることから¹⁰⁾、GPIアンカーの二つ目のマンノースにEtNPがついていない構造がEmp24の認識に重要であると考えられる（図1）。哺乳動物においても、二つ目のマンノースのEtNPのトリミングがGPI-APの小胞体からの輸送に必要であることが報告されている⁹⁾。さらに、コートタンパク質のうち、哺乳動物ではSec24のアイソフォームSec24C/Sec24Dが、出芽酵母ではLst1がp24ファミリータンパク質の細胞質領域を特異的に認識し、GPI-APの輸送小胞の形成に関与しているようである。

出芽酵母では、GPI-APは他の膜タンパク質と異なったCOPII小胞で小胞体からゴルジ体へ輸送される¹²⁾。このGPI-APの輸送はGPIアンカー合成の異常により阻害されることから³⁾、GPIアンカーが選別シグナルとして機能していることが提唱されている。また、セラミドの合成を阻害すると、GPI-APの輸送が特異的に遅延することから、セラミドに富む脂質ドメインからなる小胞体出口部位（ERES）がGPI-APの選別に関与していると考えられる¹⁾。実際、スフィンゴ脂質はGPI-APの膜への結合を強める働きを有していることが報告されている¹³⁾。そのため、GPI-APとセラミドは同じ輸送小胞を介して小胞体からゴルジ体へ輸送されるモデルが提唱されている³⁾。

5. GPIアンカー型タンパク質の選別の可視化と膜セラミドの鎖長の重要性

上述したように、生化学的解析によりGPI-APが小胞体で他のタンパク質と選別される知見に加えて、通常の蛍光顕微鏡観察でこれらが異なるERESへ集まる結果が報告された。しかし、解像度などが不十分なため、選別の詳細やその機構は不明であった。そこで筆者らは、多色・超解像・高速で4次元蛍光イメージングが可能な高感度共焦点顕微鏡システムSCLIMを用い、GPI-APのGas1-GFP、膜貫通ドメインを持つタンパク質Mid2-iRFP、ERESに局在するSec13-mCherryの3色同時ライブイメージングを行った¹⁴⁾。その結果、新たに生成されたGas1-GFPは細胞内に多数存在するERESのいくつかの近傍にクラスター化する一方

で、Mid2は小胞体全体に分布した。さらに、Gas1とMid2が異なるERESへと選別、輸送されることが示され、GPI-APの小胞体での選別輸送が証明された。

次に、GPI-APの選別の機構の解明に取り組んだ。出芽酵母は通常炭素数24以上の極長鎖セラミドを生合成する。小胞体などの細胞の膜構造にはこの極長鎖セラミドが含まれ、Gas1のGPIアンカーも極長鎖セラミドで構成される。そこで、極長鎖セラミドをほとんど合成できず、より短いセラミドを合成する*GhLag1*株を用いてGas1-GFP、Mid2-iRFP、Sec13-mCherryの局在を比較した¹⁴⁾。この細胞のGas1のGPIアンカーの脂質部分は一部残っている極長鎖セラミドであるが、小胞体膜には短いセラミドしか含まれない。Gas1-GFPがMid2-iRFPと同様に小胞体全体に局在し、しかもMid2-iRFPと同じERESに選別されたことから、小胞体膜セラミド長によりGPI-APの選別輸送が制御されていることが示された（図2、右上および右下：セラミドに富む脂質ドメイン（ゾーン）にGPI-APが集積する）。

6. GPIアンカー型タンパク質の選別におけるGPIリモデリングの役割と品質管理

セラミドリモデリングに必要な遺伝子*CWH43*の破壊はGPI-APの輸送の著しい遅延を引き起こすが、その理由として、GPIアンカーのセラミドへの構造変化が選別に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、*CWH43*の破壊がGas1の選別に必要なクラスター化に影響を与えるかを調べた¹⁵⁾。Sec13-mCherryとGas1-GFPを共発現する*sec31-1*株と*cwh43Δsec31-1*二重変異株を作製し、カーゴタンパク質とERESを蛍光顕微鏡により観察した。その結果、*sec31-1*株ではGas1-GFPがERESの近くにクラスター化した一方で、*cwh43Δsec31-1*株では小胞体全体に分散し、セラミドリモデリングがGas1のクラスター形成に必要であることがわかった。*cwh43Δ*ではGPIアンカーの二つ目のマンノースのEtNPがトリミングされず、Gas1がEmp24と結合できないことも判明し、Ted1による認識にGPIアンカーのセラミド部分が関与していることが示された。また、*cwh43Δ*が示す輸送の遅延は、二つ目のマンノースのEtNPの付加に必要なGpi7を同時に欠失させることによってレスキューされた。Gpi7によるEtNPの付加はセラミドリモデリングのために必要であることから、これらの結果はEtNPの付加とその除去がGPI-APの脂質部分をセラミド型に正しく変換させ、変換したもののみを小胞体から効率よく送り出すという、品質管理の役割を果たしていることを示唆している（図2）。さらに、この品質管理機構がGas1のERESにおける選別に不可欠であることも、SCLIMを用いた解析によって確認された¹⁵⁾。

先に述べたように、GPIアンカーの脂質部分がセラミド

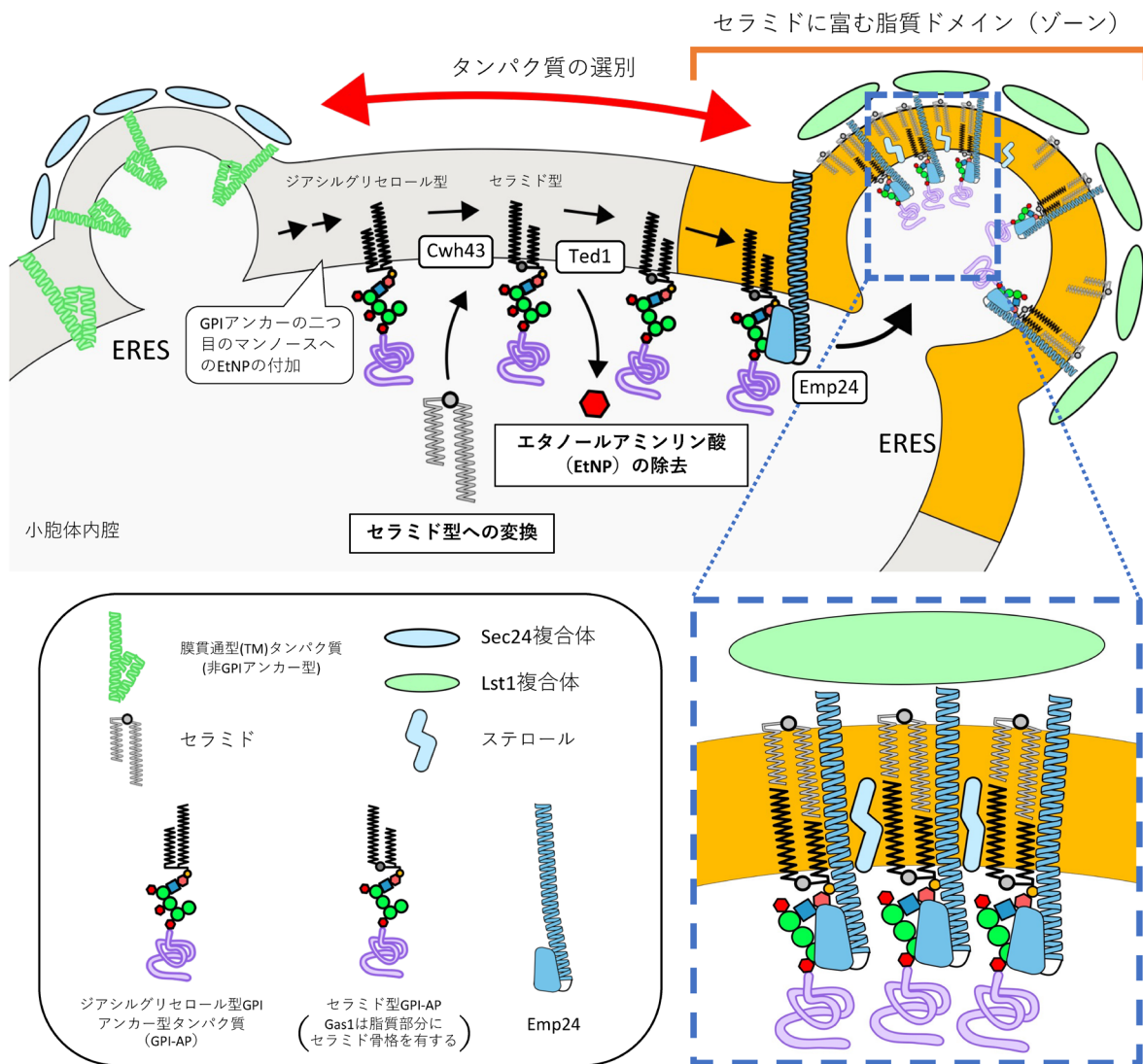


図2 GPI アンカー型タンパク質の選別輸送の品質管理機構

二つ目のマンノースにEtNPを持つGPI完全前駆体がGas1タンパク質に付加したのち、GPIアンカーの脂質部分はCwh43によりジアシलगリセロール型からセラミド型に変換される（図中の上中央）。その後、二つ目のマンノースのEtNPがTed1によって除去され、カーゴ受容体であるEmp24に認識される。Gas1とEmp24との複合体は、セラミドに富む脂質ドメインと会合し（詳細は図中の右下破線内）、コートタンパク質Lst1複合体との結合を介してゴルジ体へ選別輸送される。

型であるGas1の選別には、膜の反対側のリーフレットへ炭素鎖が突き出る炭素数24以上の極長鎖セラミドが必要である。分子動力学シミュレーションによって、Emp24の細胞質側のリーフレット内の膜貫通ヘリックス領域周辺にセラミドが集積することが明らかにされている¹⁴⁾。これと一致して、ヒトのEmp24ホモログTMED2は細胞質側のスフィンゴ脂質と相互作用することも知られている。C26セラミドを有するGas1のGPIアンカー部分は小胞体の内腔側に位置していることから、図2で示すように、Gas1のGPIアンカーの糖鎖がEmp24の内腔側の領域と相互作用し、GPIアンカーのセラミドが細胞質リーフレット側でEmp24の膜貫通ヘリックスと結合しているセラミドと鉗

合することで、強固な脂質ドメインを形成し、GPI-APの選別を確かなものに行っていると推察される。

7. おわりに

出芽酵母において、セラミド骨格を持つGas1は他の膜タンパク質とは異なるERESへ選別される。この選別には、膜中の極長鎖セラミドに加え、GPIアンカーのセラミド部分とそれをモニターする糖鎖リモデリング酵素Ted1が必要であることが判明し、品質管理されていることが明らかにされた^{14, 15)}。今後、セラミド骨格を持つ他のGPI-APもこの機構により品質管理されているか解析する必要

がある。また、哺乳動物においても小胞体でGPIアンカーがPGAP5によって構造変化することが示されており⁹⁾、哺乳動物にも出芽酵母と同様の選別の品質管理機構が存在するかどうか今後の解析が期待される。さらに、出芽酵母と哺乳動物の両方において、ゴルジ体へ運ばれたGPI-APはその内腔側でGPIアンカー部分のさらなる構造変化を受ける^{1, 2, 8)}。ゴルジ体でのGPIアンカーの構造変化がどのような役割を果たしているかを明らかにすることも今後の課題である。

文 献

- Muñiz, M. & Riezman, H. (2016) Trafficking of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J. Lipid Res.*, **57**, 352–360.
- Fujita, M. (2013) Biosynthesis and remodeling of GPI-anchored proteins. *Seikagaku*, **85**, 985–995.
- Kajiwar, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., & Funato, K. (2008) Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2069–2082.
- Okai, H., Ikema, R., Nakamura, H., Kato, M., Araki, M., Mizuno, A., Ikeda, A., Renbaum, P., Segel, R., & Funato, K. (2020) Cold-sensitive phenotypes of a yeast null mutant of ARV1 support its role as a GPI flippase. *FEBS Lett.*, **594**, 2431–2439.
- Wang, Y., Menon, A.K., Maki, Y., Liu, Y.S., Iwasaki, Y., Fujita, M., Guerrero, P.A., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Murakami, Y., et al. (2022) Genome-wide CRISPR screen reveals CLPTM1L as a lipid scramblase required for efficient glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2115083119.
- Ishida, M., Maki, Y., Ninomiya, A., Takada, Y., Campeau, P., Kinoshita, T., & Murakami, Y. (2022) Ethanolamine-phosphate on the second mannose is a preferential bridge for some GPI-anchored proteins. *EMBO Rep.*, **23**, e54352.
- Toulmay, A., Whittle, F.B., Yang, J., Bai, X., Diarra, J., Banerjee, S., Levine, T.P., Golden, A., & Prinz, W.A. (2022) Vps13-like proteins provide phosphatidylethanolamine for GPI anchor synthesis in the ER. *J. Cell Biol.*, **221**, e202111095.
- Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., & Conzelmann, A. (1997) Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 3506–3518.
- Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009) GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. *Cell*, **139**, 352–365.
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A.M., Aguilera-Romero, A., Martin, M.E., Okano, T., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Riezman, H., Funato, K., Goder, V., et al. (2015) COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Curr. Biol.*, **25**, 152–162.
- Chen, L., Tu, L., Yang, G., & Banfield, D.K. (2021) Remodeling-defective GPI-anchored proteins on the plasma membrane activate the spindle assembly checkpoint. *Cell Rep.*, **37**, 110120.
- Muñiz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **104**, 313–320.
- Watanabe, R., Funato, K., Venkataraman, K., Futerman, A.H., & Riezman, H. (2002) Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J. Biol. Chem.*, **277**, 49538–49544.
- Rodriguez-Gallardo, S., Kurokawa, K., Sabido-Bozo, S., Cortes-Gomez, A., Ikeda, A., Zoni, V., Aguilera-Romero, A., Perez-Linero, A.M., Lopez, S., Waga, M., et al. (2020) Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. *Sci. Adv.*, **6**, eaba8237.
- Rodriguez-Gallardo, S., Sabido-Bozo, S., Ikeda, A., Araki, M., Okazaki, K., Nakano, M., Aguilera-Romero, A., Cortes-Gomez, A., Lopez, S., Waga, M., et al. (2022) Quality-controlled ceramide-based GPI-anchored protein sorting into selective ER exit sites. *Cell Rep.*, **39**, 110768.

著者寸描

●花岡 和樹 (はなおか かずき)



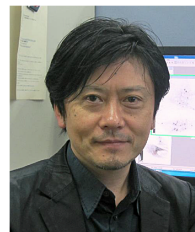
広島大学大学院統合生命科学研究科博士課程前期。学士（農学）。

■略歴 2022年 広島大学生物生産学部卒業。同年広島大学統合生命科学研究科博士課程前期入学。

■研究テーマと抱負 出芽酵母におけるGPIアンカー型タンパク質やセラミドの輸送に関する研究を行っています。好奇心の赴くままに幅広いテーマで研究活動に励みたいと考えています。

■趣味 登山（日本百名山の制覇が目標）。

●黒川 量雄 (くろかわ かずお)



理化学研究所光量子工学研究センター専任研究員。博士（バイオサイエンス）。

■略歴 1995年創価大学工学部卒業。2000年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程修了。国際医療センター研究所流動研究員、大阪大学微生物病研究所助手を経て05年理化学研究所研究員。09年より専任研究員。17～21年明治大学農学部兼任講師。

18年より現職。

■研究テーマと抱負 最先端イメージング（特に4次元超解像イメージング）技術を駆使し、生きた細胞内のタンパク質選別輸送を可視化するアプローチで膜交通機構の解明に取り組んでいる。

■ウェブサイト <http://researchmap.jp/read0092267>

■趣味 ガーデニング（を趣味にする予定）。

●船戸 耕一（ふなと こういち）



広島大学大学院統合生命科学研究科准教授。博士（薬学）。

■略歴 1994年徳島大学大学院薬学研究科博士後期課程修了，日本学術振興会海外特別研究員（米国ワシントン大学医学部）。理化学研究所基礎科学特別研究員，スイスバーゼル大学生物研究所博士研究員，スイスジュネーブ大学理学部上級博士研究員を経て，2004年広島大学大学院

生物圏科学研究科助教授，07年同大学大学院准教授，19年より現職。

■研究テーマと抱負 酵母における脂質の合成，輸送，機能に関する研究。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/read0117551>

<https://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.51877d6e3c66c294520e17560c007669.html>

■趣味 お酒をだらだらと飲むこと。