

小胞体内腔蛋白質の局在化機構

Retention mechanism of luminal proteins in endoplasmic reticulum

代表研究者 関西医科大学第一生理助手 吉 森 保
Res. Assist., Kansai Medical University, Department of Physiology
Tamotsu YOSHIMORI

Protein sorting in intracellular traffic is one of the central issues in cell biology. Newly synthesized luminal soluble proteins in the endoplasmic reticulum (ER) are sorted either as permanent ER resident proteins or are transported through the Golgi apparatus for further sorting such as secretory or as lysosomal proteins. Recently a sorting signal has been suggested for selective retention in the ER luminal space. We found by immunogold electron microscopy that protein disulfide-isomerase (PDI), a major resident protein in the ER of many tissues, is exceptionally transported from ER in rat exocrine pancreatic cells to glandular lumen through secretory pathway. For the purpose of understanding the machinery of the ER retention we investigated this phenomenon and tried to identify a putative receptor for the retention signal, and following results were obtained.

1) *In vitro* pulse-chase experiment indicated secretion of PDI in rat exocrine pancreatic cells. Results of several biochemical comparisons suggest that there is no major change in the secreted PDI molecules. Furthermore, we prepared polyclonal antibody specific to the retention signal sequence, KDEL, (anti-KDEL antibody) and suggested by this antibody that the secreted PDI possesses the KDEL sequence. For probing possibility of secretion of other ER resident proteins, polyclonal antibodies against grp78 (BiP) and endoplasmic (grp94) were prepared. Secretion of both proteins in this tissue was shown by the antibodies. These results suggests possibilities that the ER resident proteins might over-flow from the receptor for KDEL sequence (KDEL-receptor) or the cellular retention mechanisms being defective in this tissue.

2) We raised an anti-idiotypic antibody by immunizing rabbits with the affinity-purified anti-KDEL antibody in order to identify KDEL-receptor. The obtained serum competitively inhibited binding of the anti-KDEL antibody to a synthetic peptide containing KDEL sequence. Immunoblotting with the anti-idiotypic antibody revealed a major immunoreactive band of about 76 Kd in mouse hybridoma extracts. This band was detectable in both microsome and Golgi fraction, but not in the plasma membrane fraction. Immunogold electron microscopy showed that antigen of this antibody localized in the lumen of unknown membrane compartments near the ER and Golgi apparatus, and not in the ER. There is a possibility that this compartment might be a place of recycling of the ER resident proteins and further investigation is needed to resolve the possibility.

3) Anti-KDEL antibody were applied to identify new ER luminal proteins bearing KDEL sequence. Several unknown bands were detected in immunoblotting of various tissues extracts with anti-KDEL antibody. For example unknown about 45 Kd molecule was reacted as major band in rat cerebellum extracts. Purification of the molecule is in progress.

研究目的

細胞内で合成された多種多様の蛋白質はそれぞれが機能する細胞内外の場所に向かって、正しく振り分けられ輸送されなければならない。細胞に

よるそのような選別、いわゆる“ソーティング sorting”は現代細胞生物学の大きな課題の一つである。例えば小胞体は細胞内のオルガネラ・ネットワークである中央空胞系の出発点として分

泌蛋白質や細胞膜蛋白質を合成し送りだしているが、ここでも小胞体に留まってそこで機能する蛋白質とそれらの送り出される蛋白質とのソーティングが行われている。その機構は長らく不明であったが、最近いくつかの小胞体内腔蛋白質については局在化を指令するシグナル（残留シグナル）が存在することが示唆され、機構解明の糸口になるものと注目されている。我々はそれらの蛋白質の内の一つ、蛋白質 S-S 結合形成酵素 (PDI) の種々の組織における細胞内分布を詳細に検討し、膵外分泌腺細胞でこの蛋白質が例外的に小胞体外に輸送されていることを見いだした。そこでこの現象の解析を始めると同時に、残留機構そのものへのアプローチを計画した。すなわち、主要な小胞体内腔蛋白質それぞれに対する抗体、小胞体残留シグナルに特異的な抗体を作製しそれを用いて、小胞体内腔蛋白質の選択的残留がどのようにして遂行されているのか分子レベルでの理解を目指した。

研究経過

上記目的に従い、小胞体残留シグナルを認識する細胞側因子の検索、同定を中心に、膵外分泌腺の残留機構の分析、シグナルを持つ蛋白質の新たな同定を含めた研究を展開した。

主要な小胞体内腔蛋白質の C 末端には共通なアミノ酸配列 Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) が存在し、それが小胞体残留を指令するシグナルであることが 1987 年に遺伝子工学的に実証された。したがって、現在、研究の焦点は、この信号を認識し信号を持つ蛋白質を小胞体に残留させる細胞側の仕組みの解明にあり、具体的にはシグナルを認識する因子 (KDEL 受容体) を分子として同定することが要請される。

我々は KDEL 受容体の同定を目指し 3 種類のアプローチを行ったが、そのうち抗イディオタイプ抗体の手法で成果が得られた。

また膵外分泌腺における例外的な PDI の分泌現象と小胞体残留機構の関わりを知るために、PDI 以外の小胞体内腔蛋白質である grp78 (BiP) 及びエンドプラスミン (grp94) に対する抗体を作製してそれらの蛋白質もこの組織で分泌されてい

るか否かを調べた。

小胞体内蛋白質の全てが KDEL 配列を持つわけではないので、KDEL 配列による残留の機序を把握するためにどのような蛋白質が KDEL 配列を持つのか知る必要がある。残留シグナルの KDEL 配列に対する抗体を用いて KDEL 配列を持つ未知の蛋白質の検索を行った。

研究成果

1) KDEL 受容体の同定

抗体の変容部の構造はその抗体が認識する抗原決定基に対応した固有の型、イディオタイプ、を持つ。体内ではある抗体のイディオタイプを認識する抗イディオタイプ抗体が作られており、それが免疫系の調節に重要な意義を持つと考えられている。この抗イディオタイプ抗体を人為的に作ることで、ある信号を認識する受容体の同定が試みられている。すなわち、信号を鍵、受容体を鍵穴とすれば、鍵に対する抗体のイディオタイプは鍵穴の構造に似ており、それに対する抗体は鍵穴である受容体に結合できると考える。例えばクロロプラストへの選別輸送の信号となるアミノ酸配列に対する抗体の抗イディオタイプ抗体を用いてその信号の受容体と思われる蛋白質が発見された。

我々はこの戦略に基づき、KDEL 受容体の同定を試みた⁹⁾。KDEL 配列に対する抗体 (抗 KDEL 抗体) はすでに作製しその特異性の高さも十分に吟味済みである。これをさらに家兎に免疫した。得られた血清は、KDEL 配列を含む合成ペプチドに対する抗 KDEL 抗体の結合を競合的に阻害した。したがって、抗 KDEL 抗体のイディオタイプに結合する抗体ができていない可能性が高いと考えられる。この血清は、マウスハイブリドーマ細胞抽出物の免疫プロットングにおいて、主に分子量約 76 K の分子と反応した。この分子は、ラットの肝臓やすい臓のミクロソーム分画でも検出された。またゴルジ体分画にも存在したが、細胞膜分画には全く無かった。さらに免疫電子顕微鏡法により、ゴルジ体と小胞体の近傍に位置する未知の膜構造の内腔にその抗原が局在することが判った。

KDEL 配列を持つ小胞体内腔蛋白質 (KDEL

蛋白質)がどのようにして小胞体に留まるのかを説明するモデルがいくつか考えられているが、現在、再循環モデルが最も有力視されている。このモデルでは、KDEL 蛋白質は分泌蛋白質等と共に輸送小胞に入りいったん小胞体から出るが、分泌経路のどこかで KDEL 受容体と出会うと捕獲され、小胞体に送り返されると想定する。捕獲の場としては、①ゴルジ体、②小胞体とゴルジ体の中間に存在が仮定される“サルベージコンパートメント”が提唱されている。我々の作製した抗イディオタイプ抗体が KDEL 受容体を認識している確証は現時点で無いが、抗原が局在している膜構造は②の区画であるのかもしれない。

我々とは独立に、Vaux らも抗イディオタイプ抗体の手法を用いて、KDEL 受容体として分子量 72 K の分子を同定したと最近報告した。彼らもこの分子がサルベージコンパートメントに分布していると考えている。また Pelham らは、酵母の突然変異の遺伝子解析から、酵母の小胞体残留信号 HDEL の受容体と思われる分子量 26 K の蛋白質を同定し、さらにこれと相同なヒトの蛋白質(分子量 25 K)を見いだした。これらの KDEL 受容体候補の相互の関係については今のところ不明である。

2) 膵外分泌腺の小胞体残留機構

膵外分泌腺における例外的な PDI の小胞体からの輸送について、まず生化学的に PDI の分泌を証明した。分泌される PDI と小胞体の PDI の分子種に大きな差は無く、さらに抗 KDEL 抗体を用いて分泌される PDI も KDEL 配列を持つことを明らかにした⁹⁾。またブレフェルディン A などの分泌経路の阻害剤により PDI の分泌が阻止されたので、PDI の分泌は分泌経路を通したものである。次に PDI 以外の KDEL 蛋白質でもこの分泌が起こっているのか検討するために grp 78 (Bip) とエンドプラスミン (grp94) を選び、それらに対する抗体を作製した。抗体による解析の結果、これらの蛋白質も効率はいずれ異なるが膵外分泌腺で分泌されていることが判明した⁹⁾。これらの結果から、この組織では KDEL 受容体に対して KDEL 蛋白質が過剰なためにオーバー

フローが起こっているか、KDEL 配列の認識機構が機能していないかのどちらかが示唆される。なお抗イディオタイプ抗体と反応する 76 K 分子が膵臓の小胞体分画に検出されており、これは前者の可能性と良く一致する。

3) 未知の KDEL 蛋白質

抗 KDEL 抗体をプローブとした種々の組織の免疫ブロットから、既知の KDEL 蛋白質とは分子量の異なる分子がいくつか検出された⁹⁾。例えば小脳では分子量 45 K の分子が主に抗体と反応する。免疫電子顕微鏡法では、小脳プルキニエ細胞の小胞体に抗 KDEL 抗体の抗原が豊富に分布していることも示された。

今後の課題と発展

KDEL 配列を持つ小胞体内腔蛋白質の残留機構の研究は、分子レベルでのメカニズムの解明の段階に入ってきたと言えよう。現在の問題は以下の諸点である：①我々を含めいくつかのグループにより同定された KDEL 受容体の候補が、すべて受容体そのものなのか、またそうであるとした場合、相互の関係はどのようなものなのか、②再循環説が正しいならば KDEL 蛋白質はどこで受容体と出会うのか、両者の結合と解離はどのような条件でおこるのか、③再循環説だけで残留は説明できるのか。③については補完的なシステムとして小胞体内ゲルマトリックスモデルが提唱されている。今後我々は抗イディオタイプ抗体が認識する分子の性状をより詳しく調べると同時に、再循環説の吟味、検討を行っていきたい。手法的には、凍結超薄切片を用いた高感度免疫電子顕微鏡法から遺伝子クローニングを含む分子生物学的手法、マイクロインジェクションやセミインタクト細胞などの細胞工学的手法を駆使し、多角的なアプローチを行う。例外的な現象である膵外分泌腺の KDEL 蛋白質分泌の機序の解析もさらに進め、残留機構の理解への努力とドッキングさせたい。また抗 KDEL 抗体をプローブとして見いだした未知の KDEL 蛋白質の精製、性状分析を目指したい。

現在、研究を小胞体からの輸送における選別にとどめず、小胞体に関連したいくつかの方向で発

展させつつある。異常な構造を持った分泌蛋白質は小胞体から輸送されず、おそらく小胞体内で分解される。その機構を突然変異を導入したリゾチーム遺伝子を細胞で発現させる系を用いて解析しつつある。また膜内腔の pH が、小胞体-ゴルジ体間輸送に関係していることを膜内腔酸性化をつかさどる液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤¹⁰⁾を用いた実験で明らかにした。小胞体は中央空胞系の起点であり、研究自体も中央空胞系の構造と機能の探求へとつなげていきたいと考えている。

発表論文

- 1) S. Akagi, A. Yamamoto, T. Yoshimori, R. Masaki, R. Ogawa and Y. Tashiro: Distribution of protein disulfide isomerase in rat epiphyseal chondrocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1835~1844 (1989).
- 2) 田代 裕, 大森浩一郎, 吉森 保: 小胞体・ゴルジ体間輸送とタンパク質の選別機構. *細胞工学*, **8**, 142~150 (1989).
- 3) Y. Tashiro, S. Akagi, T. Yoshimori and A. Yamamoto: Intracellular transport between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Gunma Symposia on Endocrinology*, **26**, 25~36 (1989).
- 4) T. Yoshimori, A. Yamamoto and Y. Tashiro:

Protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Cell Struct. Funct.*, **14**, 849~849 (1989).

- 5) 吉森 保: BiP, SRP 関連蛋白質, NSF 関連蛋白質. *生体の科学*, **41**, 281~288 (1990).
- 6) T. Yoshimori, T. Semba, H. Takemoto, S. Akagi, A. Yamamoto and Y. Tashiro: Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15984~15990 (1990).
- 7) 吉森 保: Membrane traffic の研究の進歩. *Biomedica*, **5**, 67~71 (1990).
- 8) T. Yoshimori, Y. Hata, A. Yamamoto and Y. Tashiro: The identification of a receptor for the endoplasmic reticulum retention signal, "KDEL", by anti-idio type antibody. *Cell Struct. Funct.*, **15**, 444~444 (1990).
- 9) H. Takemoto, T. Yoshimori, K. Inoue and Y. Tashiro: Secretion of the ER luminal proteins in rat exocrine pancreatic cells. *Cell Struct. Funct.*, **15**, 444~444 (1990).
- 10) T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai and Y. Tashiro: Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, in press (1991).