

令和 6年 3月 28日


報道機関 各位


## 細胞内で物質が正しく運ばれるための 分子メカニズムの解明 -新規医薬品デリバリーシステム開発への応用期待-

### ■ ポイント

- ・細胞内での物質移動に使われる運び屋“輸送小胞<sup>\*1</sup>”が正しい行き先まで運ばれるための“宛先”情報はこれまでよく分かっていなかった
- ・Rab GTPase タンパク質<sup>\*2</sup>やホスホイノシチド<sup>\*3</sup>と呼ばれる脂質が SNARE タンパク質<sup>\*4</sup>と協調して“宛先”情報として働き、輸送小胞の正確な輸送を可能にしていることを見いだした
- ・本研究の成果を用いて細胞内輸送を人工的に制御することが可能になれば、薬を細胞内の特定部位へ送り届ける新しい医薬品デリバリーシステムの開発につながる

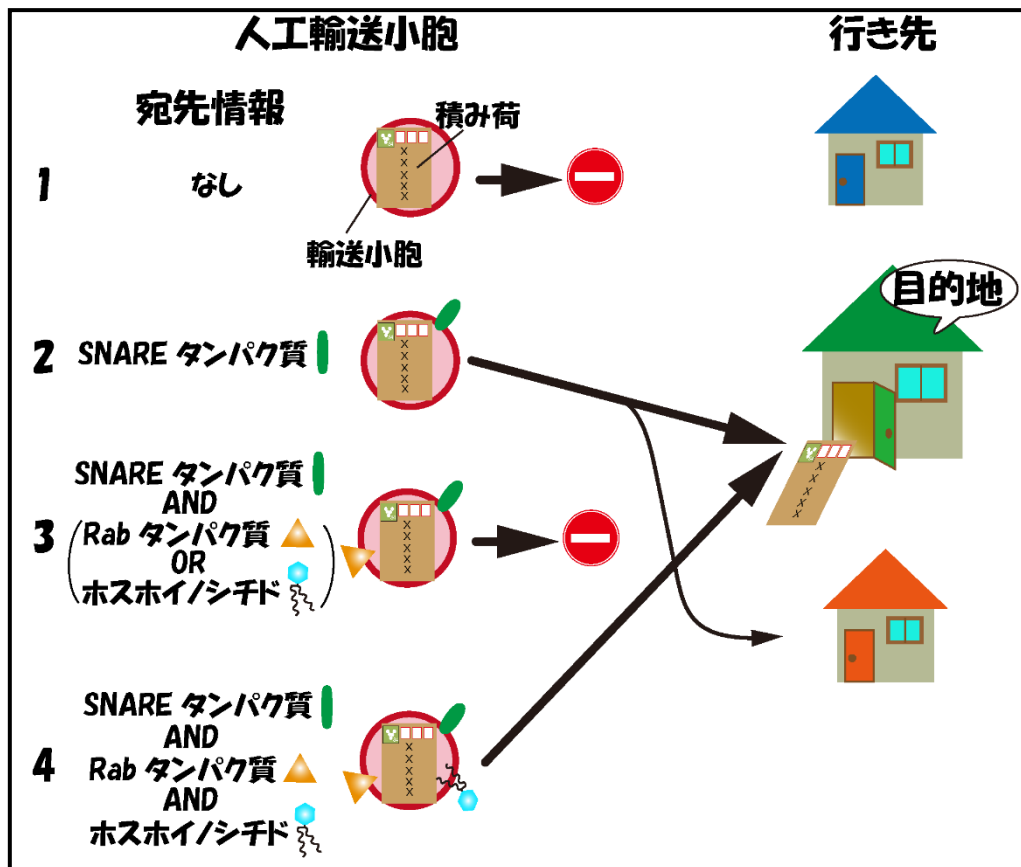
### ■ 概要

細胞内には小胞体、ゴルジ体、リソソームといった袋状の構造からなるオルガネラ（小器官）が多く存在しますが、それらは輸送小胞と呼ばれる更に小さな袋を使って物質のやりとりを行なっています（1）。輸送小胞が標的オルガネラまで正確に運ばれオルガネラ間での確な連携を図ることは細胞の生存に必須です。これまで、輸送小胞上には“宛先”情報が付加されていると考えられてきましたが、その分子実態については明らかにされていませんでした。

富山大学学術研究部工学系・オルガネラ合成生物学分野の小池誠一特命助教とドイツのマックスプランク学際科学研究所・神経生物学分野 Reinhard Jahn 教授らの国際共同研究グループは、人工的に作成した輸送小胞を細胞内へ注入し、その振る舞いを観察する方法を開発しました（2、Koike and Jahn 2017 PNAS）。この方法を用いて調べたところ、SNARE タンパク質が宛先情報として働いており、SNARE タンパク質の種類に応じて小胞の行き先が変わることを明らかにしました（Koike and Jahn 2019 Nature Communications）。しかし、SNARE タンパク質だけを持つ人工輸送小胞は、“本物”の輸送小胞に比べると行き先の特異性が低かったことから、小胞の行き先決定に関与する他の因子の存在が示唆されていました。

本研究では、Rab GTPase タンパク質やホスホイノシチドと呼ばれる脂質が、SNARE タンパク質による行き先決定を手助けすることによって、輸送小胞が必要なタイミングに、正確な行き先へと運ばれるようになることを見いだしました。

本研究成果は、「Nature Communications」に 2024 年 3 月 20 日（日本時間）に掲載されました。



#### 本研究の成果概略図

- 1 : 何も宛先情報が存在しない場合、人工輸送小胞はどこにも運ばれない。
- 2 : 宛先情報として SNARE タンパク質が存在する場合、輸送小胞は目的地まで運ばれるが、他の目的地まで運ばれてしまうことがある。
- 3 : SNARE タンパク質と活性化型 Rab GTPase タンパク質もしくはホスホイシチドのどちらか一方が存在する場合、小胞輸送は抑制される。
- 4 : SNARE タンパク質、活性化型 Rab GTPase タンパク質、ホスホイシチドの3種類が存在する場合、輸送小胞は目的地まで運ばれる。その行き先の特異性は、SNARE タンパク質単独の場合(2)に比べて高くなる。

#### ■研究の背景

私たちヒトの体を構成する細胞の中には、様々なオルガネラで埋め尽くされており、それらはエネルギー合成、タンパク質合成、老廃物の分解などの機能を担っています。細胞が恒常性を維持して生きていくためには、オルガネラ間の連携は必須です。そのため、オルガネラは輸送小胞と呼ばれる小さな運び屋に物質を詰め込み目的のオルガネラまで送り届けることで綿密なやりとりを行なっています（図1）。

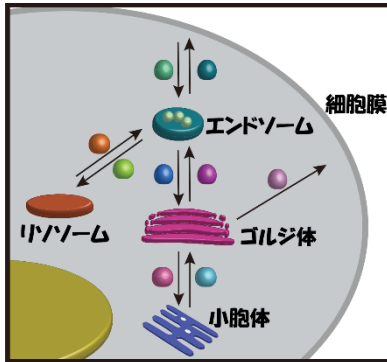


図1 細胞内小胞輸送経路

細胞内には多くのオルガネラ（小器官）が存在している。それぞれのオルガネラ間では輸送小胞を介して物質輸送が行われている。しかし、各々の輸送小胞が多くのオルガネラの中から正しい行先を見つけるための分子メカニズムはよく分かっていなかった。

では、輸送小胞は細胞内を埋め尽くす様々なオルガネラの雑踏の中から、どのように正しい標的オルガネラを見つけ出すことができるのでしょうか？私たちの社会における郵便システムのように、輸送小胞には運ばれて行くべき場所を示す何らかの“宛先”情報が付加していると考えられてきました。これまでの研究から、小胞輸送に関係する多くの因子が同定されていますが、どの因子があれば“宛先”として十分なのか？どのようなメカニズムで行き先が決定されるのか？といった疑問に答えることはできませんでした。

そこで、本研究グループでは細胞内に人工輸送小胞を作り出すという新しい手法を用いることによって、この問題にチャレンジしてきました。まず脂質二重膜からなるリポソーム<sup>※5</sup>の表面に、“宛先”の候補分子を結合させることで人工輸送小胞を試験管内で作成しました。そして、それらをマイクロインジェクション法<sup>※6</sup>を用いて細胞内へ注入し、どこへ運ばれていくかを調べました（図2、Koike and Jahn 2017 PNAS）。その結果、SNARE タンパク質と呼ばれる膜融合に関わるタンパク質がリポソーム膜に存在すると、ある程度特異性を持った輸送が再現できることを発見しました（Koike and Jahn, 2019, Nature Communications）。また、小胞上に存在する SNARE タンパク質の種類によって行き先が変わることから、SNARE タンパク質が“宛先”として利用されていることが明らかになりました。

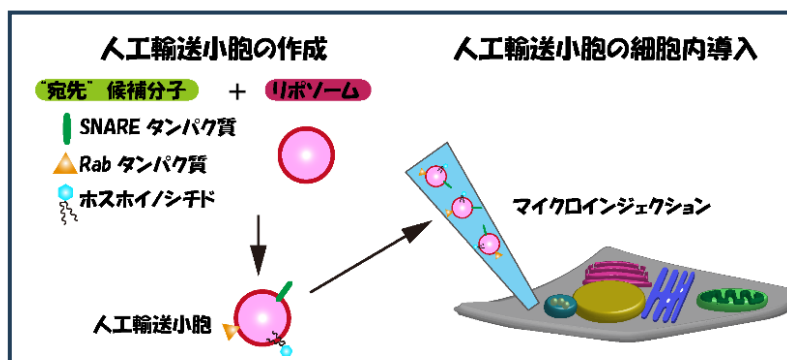


図2 人工輸送小胞の細胞内導入方法

脂質二重膜からなる蛍光標識人工脂質カプセル（リポソーム）に”宛先”候補分子を結合させることで、人工輸送小胞を作成した。その人工輸送小胞を詰め込んだ針を用いて、細胞内へ注入した。その後、細胞内で人工輸送小胞がどこへ運ばれていくのかを顕微鏡下で観察して調べた。

## ■研究の内容・成果

本研究ではまず、種類の異なる SNARE タンパク質を同時に結合させた時の、リポソームの行き先を調べました。その結果、このリポソームはおのこの SNARE タンパク質が示す“宛先”情報に従って、幾つもの行き先へ運ばれてしまうことが分かりました。しかし、本物の輸送小胞には何種類もの SNARE タンパク質が同時に存在しているにも関わらず、決められた行き先へ特異的に物質を送り届けることができます。この結果は、SNARE タンパク質だけでは細胞内小胞が持つ高い精度の輸送システムを再現できないことを意味しています。つまり、輸送小胞が正確に運ばれるためには、SNARE タンパク質以外にも、輸送小胞の行き先決定に関わる何らかの分子が関与していることが示唆されました。

そこで、SNARE タンパク質以外の分子に着目しました。いくつもの分子について調べた結果、Rab GTPase タンパク質とホスホイノシチドと呼ばれる脂質が小胞の輸送先決定に大きな役割を果たしていることが分かりました。SNARE タンパク質に加えて、活性化型 Rab GTPase タンパク質もしくはホスホイノシチドのどちらか一方を持ったリポソームでは、SNARE タンパク質の“宛先”情報に基づいた輸送が抑制されてどこにも運ばれなくなりました(概略図)。しかし、活性化型 Rab GTPase タンパク質、ホスホイノシチド、SNARE タンパク質の3種類の分子をリポソームに結合させると、SNARE タンパク質単独の時よりも目的地の特異性が高まることを見いだしました(概略図)。この効果は不活性化型 Rab GTPase タンパク質を用いた時には見られなかったことから Rab GTPase の活性に依存していることが分かりました。これらの実験結果から、Rab GTPase タンパク質とホスホイノシチドは輸送の開始スイッチとして機能しており、どちらか一方しか存在しないと SNARE タンパク質による“宛先”情報が抑制され、両方がそろったときに初めて小胞を目的地まで輸送できることが明らかになりました。また活性化型 Rab GTPase タンパク質とホスホイノシチドは、輸送小胞の行き先の正確性を高める役割を担っていることも分かりました。

最後に、Rab GTPase タンパク質、ホスホイノシチドがどのように輸送小胞の行き先を制御しているのかを調べました。これら2つの分子には様々なエフェクター因子と呼ばれるタンパク質が結合することが分かっています。Rab GTPase タンパク質の一つである Rab5 と、ホスホイノシチドの一種であるホスファチジル3リン酸(PI3P)を持ったリポソーム上へ誘引されるエフェクター因子について調べたところ、SNARE タンパク質の機能を修飾することがすでに知られている Rabenosyn-5 タンパク質が得られました。そこで Rabenosyn-5 タンパク質が存在しない時の小胞の行き先特異性を調べたところ、Rab5 と PI3P の両者が揃ったときに見られた SNARE タンパク質による行き先の特異性を高める校正機能が消失しました。この結果は、Rabenosyn-5 が SNARE タンパク質による“宛先”情報を修飾し、行き先の特異性を高める働きを持っていることを示しています。このように、Rab GTPase タンパク質やホスホイノシチドは、エフェクター因子を膜上へ誘引させることで、小胞輸送の特異性を制御していることが分かりました。

## ■今後の展開

現在、特定の細胞に薬を送り届けるための医薬品デリバリーシステムの開発が盛んにされていますが、本研究の成果は、オルガネラ特異的に薬を送り届ける新規システムの開発につながり、薬の効果を高められる可能性があります。また、これまでの生命科学研究は、生命現象に必要な分子を同定することが主な目的であったのに対し、本研究では、それら細胞構成分子を人工的に組み合わせて細胞内に人工オルガネラを作り出す新たな合成生物学<sup>※7)</sup>的技術を確立しました。この技術を用いると、細胞機能を成し遂げるための十分条件を明らかにすることや、人工オルガネラを持つ細胞を作成し社会に役立てることが可能になります。

### 【用語解説】

#### ※1 輸送小胞

直径 50-100 nm の脂質二重膜からなる小胞。出発地となるオルガネラで、同じ目的地へ運ばれるタンパク質が集められた後、その部分の膜が出芽して作られる。”宛先”情報に従って目的地となるオルガネラまで運ばれ、そのオルガネラ膜と融合することで、内包していた積荷を放出する。

#### ※2 Rab GTPase タンパク質

低分子量 G タンパク質に属し、哺乳類では 60 種類以上のタンパク質からなるファミリーを形成している。GTP（グアノシン三リン酸）が結合した活性化型と GDP（グアノシン二リン酸）が結合した不活性化型が存在し、分子スイッチとして働いている。おのおののオルガネラに異なった種類の Rab タンパク質が局在しており、オルガネラのアイデンティティーの決定や小胞輸送に深く関わっている。

#### ※3 ホスホイノシチド

オルガネラ膜を構成するリン脂質の一種。イノシトール環のリン酸パターンによって 7 種類存在するが、おのおのが異なったオルガネラ膜に分布し、異なったエフェクター因子と結合することから、オルガネラのアイデンティティーの決定に重要である。

#### ※4 SNARE タンパク質

オルガネラ間の膜融合を促進する働きを持つタンパク質。膜から伸びた SNARE タンパク質が複合体を形成し膜間距離を近づけることで膜融合を促進させる。哺乳類では 30 種類以上のタンパク質からなるファミリーを形成しており、おのおののオルガネラに異なった種類の SNARE タンパク質が局在している。

## **※5 リボソーム**

人工膜小胞。オルガネラや輸送小胞と同様に脂質二重膜からなるカプセル状の構造物。医薬品デリバリーシステムでのキャリアーとしても用いられる。

## **※6 マイクロインジェクション法**

細胞内へ分子を導入する方法の一つ。先端径が数百ナノメートルの針を細胞膜に突き刺し、針内の水溶液を細胞内へと放出する。

## **※7 合成生物学**

細胞を構成する因子の同定や機能解明を目指す分子生物学に対し、既知の細胞構成因子を組み合わせることで新しい生命装置を設計・合成することによって、生命の本質の理解を目指すとともに、社会問題解決への応用を目指す学問分野。

### **【論文詳細】**

論文名：

Rab GTPases and phosphoinositides fine-tune SNAREs dependent targeting specificity of intracellular vesicle traffic

著者：

Seiichi Koike and Reinhard Jahn

掲載誌：

Nature Communications

DOI：

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-46678-x>

### **【本発表資料のお問い合わせ先】**

富山大学学術研究部工学系

特命助教 小池 誠一

TEL : 076-445-6835 Email : [skoike@eng.u-toyama.ac.jp](mailto:skoike@eng.u-toyama.ac.jp)