

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770066

研究課題名(和文) 小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送における新規分子機構の解明と発生過程における役割

研究課題名(英文) Elucidation of novel molecular mechanisms in protein transportation from ER to Golgi apparatus and their roles in development

研究代表者

小谷 友也 (KOTANI TOMOYA)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70419852

研究成果の概要(和文)：Mys 蛋白質は、我々がゼブラフィッシュにおいて新規に同定した蛋白質で、ほぼすべての脊椎動物のゲノムにこの蛋白質をコードする遺伝子が存在する。本研究では、Mys 蛋白質の全長の中で保存性の高いカルボキシル末端に対する抗体を新規に作製し、ゼブラフィッシュに加えヒト、マウス、アフリカツメガエルにおける Mys 蛋白質の発現を確認した。次に、Mys 蛋白質の細胞内局在を解析し、ゴルジ体と細胞質中の小胞に局在することを明らかにした。我々は、Mys と相互作用する蛋白質を網羅的に解析し、Sec23A 蛋白質を同定した。抗体を用いた二重染色法から、Mys と Sec23A 蛋白質がゴルジ体に共局在すること、免疫沈降法から、内在の Mys と Sec23A が共沈降することを示した。すなわち、これら蛋白質が細胞質、特にゴルジ体において共局在し、相互作用して機能していることが示唆された。今後、Mys 蛋白質の発現阻害を行うことで蛋白質輸送における Mys の役割を詳細に解明する。

研究成果の概要(英文)：We previously identified a novel gene *misty somites (mys)*, which encodes Mys protein, and found that almost all vertebrate genomes contain the gene encoding Mys protein homolog. In this study, we newly produced antibodies recognizing carboxy-terminus of human Mys protein, a region highly conserved in vertebrate Mys protein homologs. Mys protein homologs were found to be expressed in human and mouse cultured cells and *Xenopus* embryos. We then examined the localization of Mys protein in human cultured cells using the newly produced antibody and found that Mys protein was localized in Golgi apparatus and vesicles distributed throughout cytoplasm. We isolated Sec23A protein as a protein interacting with Mys by performing a pull-down assay with Flag-tagged human Mys protein in human cultured cells followed by mass spectrometry analysis. Immunostaining using anti Mys antibody and anti-Sec23A antibody showed co-localization of Mys and Sec23A in Golgi apparatus. Immunoprecipitation using these two antibodies showed the interaction of endogenous Mys and Sec23A. These results suggest that Mys and Sec23A function in Golgi apparatus in cooperation with each other. We are currently performing knock-down experiences and will elucidate roles of Mys in protein transportation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：蛋白質、細胞・組織、蛋白質相互作用、小胞輸送、遺伝子発現阻害

1. 研究開始当初の背景

我々は新規遺伝子 *misty somites (mys)* を同定し、この遺伝子がゼブラフィッシュの発生過程に必須であることを明らかにした。*mys* がコードする蛋白質のアミノ酸配列はすべての脊椎動物で非常に高度に保存されており、その機能も共通していると考えられる。しかし、Mys 蛋白質のアミノ酸配列には機能を予測できる既知の配列は存在せず、Mys が機能する分子機構は全く未知の状態であった。

2. 研究の目的

我々の解析結果から、Mys 蛋白質は発生過程において、頭部・体節の形態形成、体節境界線の維持に関わることが明らかとなった。本研究の目標は Mys の機能を制御する上流の因子の同定と、Mys が機能を発揮する下流の分子機構を解明することにある。その中でも本研究課題は Mys が制御する下流の現象、すなわち Mys がどのように頭部・体節の形態形成に関わるのか、どのように体節境界線を維持しているのかについて、その分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題において我々は次の方法で研究を遂行した。

(1)ゼブラフィッシュ Mys 蛋白質を特異的に認識する抗体を作製し、ゼブラフィッシュ胚と成魚における発現様式を解析した。さらに、Mys 蛋白質のアミノ酸配列において非常に保存性の高い C 末端を認識するヒト Mys 抗体を作製し、モデル脊椎動物における Mys 蛋白質の発現と細胞内における局在を生化学的・細胞生物学的に解析した。

(2) Mys 蛋白質と相互作用するプロテインキナーゼ A 調節サブユニットおよび Sec23A に対する抗体を作製・購入した。これら抗体を用い、プロテインキナーゼ A 調節サブユニットと Sec23A の発現様式を免疫染色法で解析した。さらに、Mys 蛋白質との相互作用を免疫沈降法で解析した。

(3)ゼブラフィッシュ胚あるいはヒト培養細胞において、Flag タグを融合した Mys 蛋白質を過剰発現させ、機能解析を行った。反対に、モルフォリノアンチセンス DNA を用いた発現阻害実験を行い、機能を解析した。

4. 研究成果

(1) *mys* 遺伝子はほぼすべての脊椎動物のゲノムに存在するが、コードする蛋白質の発現は不明であった。我々は、ゼブラフィッシュ Mys 蛋白質に対する抗体を作製し、ゼブラフィッシュの胚および成魚の脳・心臓・精巣・卵巣における Mys 蛋白質の発現を明らかにした。ゼブラフィッシュ胚において Mys 蛋白質の発現はほぼすべての細胞で見られ、これは *mys* 遺伝子の転写産物を *in situ* hybridization 法で解析した結果と一致する。細胞内における発現部位は細胞質全体であった。

Mys 蛋白質のアミノ酸配列は脊椎動物間で非常に高く保存されているが、N 末端側より C 末端側がより高度に保存されている。我々は、保存性の高い C 末端側の配列を大腸菌で発現させ、モルモットにおいて抗体を作製した。用いた配列はヒト Mys ホモログの C 末端である。新たに作製した抗体によって、ヒトとマウスの培養細胞、さらにアフリカツメガエル胚における Mys 蛋白質の発現が証明された。興味深いことに、ヒト培養細胞において Mys 蛋白質は約 58-kDa と 54-kDa の蛋白質として検出された。ヒトにおいては *mys* 遺伝子の転写産物に 4 種の選択的スプライシング産物が存在することが確認されており (Kamakari et al., 2005)、分子量の異なる Mys 蛋白質はこれらの転写産物に別々にコードされている蛋白質の発現を示していると考えられる。

ヒト培養細胞において Mys 蛋白質はゴルジ体と細胞内に拡散する小胞に局在した。

(2)①我々は Mys 蛋白質と相互作用する蛋白質として、プロテインキナーゼ A 調節サブユニットを同定した。プロテインキナーゼ A は 2 分子の触媒サブユニットと二量体の調節サブユニットからなる複合体で、触媒サブユニットに調節サブユニットが結合することで不活性化、乖離することで活性化する。調節サブユニットに対する抗体を作製し、その発現部位を解析した結果、ゼブラフィッシュ

胚のほぼ全細胞における発現が示された。また、Mys とプロテインキナーゼ A 調節サブユニットは同じ細胞で発現しており、発現部位は細胞質であった。さらに、免疫沈降法の結果から、内在の Mys とプロテインキナーゼ A 調節サブユニットが相互作用することが示された。

プロテインキナーゼ A 調節サブユニットにおける Mys 結合領域を解析した結果、ドメイン A で Mys と結合することが明らかとなった。この領域は触媒サブユニットの結合領域であり、Mys と触媒サブユニットがドメイン A に対する結合で競合することが予測された。実際に、Mys 蛋白質は *in vitro* において触媒サブユニットを調節サブユニットから乖離させ、プロテインキナーゼ A を活性化することを示した。さらに、ゼブラフィッシュ胚における Mys 蛋白質の発現阻害によって、触媒サブユニットと調節サブユニットの結合が促進され、プロテインキナーゼ A の活性が減少することを示した。すなわち、Mys はプロテインキナーゼ A 調節サブユニットのドメイン A に結合し、触媒サブユニットを調節サブユニットから乖離、最終的にプロテインキナーゼ A を活性化することが明らかとなった。

ゼブラフィッシュ胚において Mys を過剰発現させ、プロテインキナーゼ A を過剰に活性化することを試みたが、プロテインキナーゼ A の活性に変化は起こらなかった。Mys の発現を解析した結果、過剰発現によって内在の Mys 蛋白質が減少することが明らかとなった。これは、Mys の発現量を調節するフィードバック機構の存在を示唆する。

ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスにおいてプロテインキナーゼ A は、胚・器官の形態形成に重要なヘッジホッグシグナルを負に制御する。Mys の発現阻害によってプロテインキナーゼ A の活性が減少することから、これらの胚で起こる頭部と体節の形態異常がヘッジホッグシグナルの異常に起因すると考え、ヘッジホッグシグナル標的遺伝子の発現様式を解析した。その結果、Mys の発現阻害によってヘッジホッグシグナル標的遺伝子の発現領域が拡大すること、プロテインキナーゼ A の活性化によってこれら発現領域の拡大が抑制されることが示された。すなわち、Mys の発現阻害による頭部・体節の形成異常はプロテインキナーゼ A の活性が減少し、ヘッジホッグシグナルの抑制が解除されたために起こったと結論された (Kotani et al., 2010)。

以上の結果は、Mys の分子作用機構を明らかにしたのみでなく、プロテインキナーゼ A の新規活性化機構の解明、ヘッジホッグシグナルを制御する新規分子機構の解明に至る非常に重要な成果をもたらした。

②我々は Mys 蛋白質と相互作用する蛋白質として、Sec23A 蛋白質を同定した。Sec23A 蛋白質は小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送を担う小胞を構成する蛋白質で、Sec23A 蛋白質をコードする遺伝子に生じた変異は遺伝病の原因となることが明らかとなっている。

Sec23A に対する抗体を購入し、その発現部位を解析した結果、ヒト培養細胞においてゴルジ体と小胞体、さらに細胞全体に拡散する小胞に局在した。その発現部位の一部は Mys 蛋白質と一致した。さらに抗 Mys 抗体で Mys を免疫沈降した結果、Sec23A が共沈降すること、抗 Sec23A 抗体で Sec23A を免疫沈降した結果、Mys が共沈降することを示した。したがって、内在の Mys と Sec23A が相互作用することが示された。

ヒト培養細胞において Mys 蛋白質の過剰発現の影響を解析するため、Flag 標識 Mys 蛋白質を培養細胞に発現させた。しかし、過剰発現による影響は見いだせなかった。内在の Mys と Flag 標識 Mys の発現を解析した結果、Flag 標識 Mys の発現量が増加するに従って、内在の Mys の発現量が減少することが明らかとなった。これは、ゼブラフィッシュ胚と同様に、Mys 蛋白質の発現量を制御するフィードバック機構の存在を示唆する。過剰発現による影響が見いだせない原因はこの発現量の制御にあると思われる。

現在、Mys と Sec23A における相互作用に関わる部位の同定、および RNAi を用いた Mys 蛋白質の発現阻害を行っており、これらの解析によって小胞体からゴルジ体における蛋白質輸送に果たす Mys の役割が明らかになるものと期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Tomoya Kotani, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Koichi Kawakami, Masakane Yamashita, "Mys protein regulates protein kinase A activity by interacting with regulatory type I α subunit during vertebrate development", *Journal of Biological Chemistry*, (査読あり) vol.285, p5106-5116, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 小谷友也、家村俊一郎、夏目徹、川上浩一、山下正兼「蛋白質間相互作用による新規プロテインキナーゼ A 活性化機構」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸

(2) Tomoya Kotani, Shun-ichiro Iemura,

Tohru Natsume, Koichi Kawakami, Masakane Yamashita, “Mys protein antagonizes Hedgehog signaling through activation of PKA during embryonic development” 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009, 9 September 2009, Edinburgh, Scotland, United Kingdom

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 友也 (KOTANI TOMOYA)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：70419852

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし