

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07340

研究課題名(和文) COPII因子による小胞輸送を支える時空間制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of spatiotemporal regulation of membrane traffic mediated by COPII components

研究代表者

佐藤 健 (Sato, Ken)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00303602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小胞体からの小胞輸送を担うCOPII小胞の形成を時空間的に制御している因子の同定を行い、その分子メカニズムの解明を行った。

その結果、COPIIコートのサブユニットであるSec24に対して特異的に作用する脱リン酸化酵素を同定し、この脱リン酸化酵素により、Sec24の小胞体膜への結合が制御されていることを明らかにした。また、ER exit siteの形成に関与するSec16について、人工脂質平面膜上に再現したCOPII小胞形成反応における動態を解析したところ、COPIIコートと積み荷が形成するクラスター内に、Sar1のGTP加水分解サイクルに依存して取り込まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての真核細胞内に備わる小胞輸送と呼ばれる物質輸送の仕組みについて、特に小胞体からゴルジ体への小胞輸送反応に焦点を当て、その制御、調節メカニズムの一端を明らかにした。小胞輸送は他分野にも広く関わる細胞の基礎現象であるため、例えばこれまで原因不明であった疾患の原因が小胞輸送機能の損傷にあるものが最近続々と報告されてきている。そのため小胞輸送の仕組みを解明することは、現代細胞生物学の重要なテーマであるのみならず、創薬や疾患治療への応用への展開にも大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms of COPII vesicle formation and its spatiotemporal regulation were analyzed, and the serine/threonine protein phosphatase2A was identified as a regulator of this reaction. Hyperphosphorylated form of Sec24 subunit was observed in the absence of this phosphatase, and this hyperphosphorylated Sec24 reduces its binding affinity to the ER membrane. Furthermore, Sec16 is shown to be incorporated within the COPII-cargo clusters, and that this is dependent on the Sar1 GTPase cycle.

研究分野：細胞内輸送

キーワード：小胞体 COPII 低分子量GTPase 小胞輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Blotelによる「シグナル仮説」の提唱から40年が経ち、細胞内のさまざまなオルガネラへのタンパク質輸送にはタンパク質自身に書き込まれたシグナルと、それを認識する輸送装置のはたらきが重要であるという概念はもはやすっかり定着した。一方で、膨大なゲノムの配列情報からそれらの産物である個々のタンパク質の機能を、細胞というシステムの中で理解することが求められている。その中でも、タンパク質の細胞内輸送・局在化のメカニズムについては、分子レベルでさらにいっそう正確かつ厳密な理解が必要とされている。

真核細胞内のオルガネラ間におけるタンパク質のやりとりは、主として直径50~100ナノメートルの輸送小胞を介した小胞輸送により行われている。特に細胞内膜系の半分以上を占める小胞体(ER)からの輸送は、各オルガネラで機能するタンパク質や、細胞外に分泌されるタンパク質など、細胞内の全タンパク質の約30%が経路する小胞輸送の大動脈である。この輸送を担っているのがCOPIIコートと呼ばれるタンパク質複合体によって覆われたCOPII小胞である。研究代表者は、これまで出芽酵母を主な材料として、COPII小胞の形成過程に焦点をあて、積み荷タンパク質が厳密な分子選別を受けてCOPII小胞へと濃縮されるメカニズムの解明において重要な成果を挙げてきた。これまでの研究からCOPII小胞形成の素反応の概略は判明してきたものの、細胞内に目を転じると、さまざまな状況証拠から、この輸送反応は時空間的な制御を受けていることが明らかであるものの、この制御に関わる因子やメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでのさまざまな状況証拠から、細胞内におけるERからの輸送反応は、厳密な制御を受けていることが明らかである。たとえば、COPII小胞の形成は輸送を必要とするタンパク質の増減に応じて促進や抑制を受けて刻々と変化する。しかし、この制御に関わるしくみは実体さえ掴めていない。また、COPII小胞の形成はER exit siteと呼ばれるER膜上のコンパートメント化されたサブドメインで行われ、この数を増減させることにより輸送を調節していることが示唆されているものの、このコンパートメントの構築メカニズムについては不明である。

このような背景から、本研究では出芽酵母をモデルとして、小胞輸送の中でもERからのCOPII小胞の形成反応に焦点を絞り、この反応を時間的に制御(COPII小胞形成のタイミング制御)している因子の同定、および空間的な制御(ER exit siteの形成機構)に関わる分子メカニズムを、独自の試験管内再構成系や人工膜1分子計測系を用いたアプローチにより解析を行うと同時に、さまざまな変異株の利用や蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングなど、酵母の特性を活かしたin vivoアプローチによってin vitro解析で得られた知見の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) COPII小胞による輸送を制御する脱リン酸化酵素の同定

COPII小胞の形成に関わる因子群が、さまざまな翻訳後修飾を受けていることは古くから認識されているものの、それにより何がどのように制御されているのかについての知見は非常に少ない。ここではリン酸化・脱リン酸化による制御に着目し、出芽酵母の脱リン酸化酵素の欠損株ライブラリーを用いて、COPII因子の脱リン酸化に関わる酵素の同定を行う。

出芽酵母では32種の脱リン酸化酵素が知られており、これらの単独破壊株(3種の必須遺伝子については温度感受性変異株)におけるERからの輸送異常、およびER exit siteの形成異常を指標としてスクリーニングを行う。具体的には、ER-ゴルジ体間をリサイクルしているマーカートンパク質について、このタンパク質のERへの蓄積を指標として輸送異常をスクリーニングする。また、COPII小胞の形成が行われるER膜上のER exit siteは、そこに特異的に局在するSec16を蛍光標識すると、ドット状の蛍光輝点として観察される。このSec16の局在異常を指標としてER exit siteの形成異常をスクリーニングする。

候補となる脱リン酸化酵素については、そのターゲットとなるCOPII因子の同定を行う。具体的には、脱リン酸化酵素の欠損により、そのターゲットとなる因子は細胞内でハイパーリン酸化されていることが予想されることから、欠損株中における各COPII因子の分子量シフト、および抗リン酸化抗体による解析を指標に同定を行う。

(2) COPII小胞形成を空間制御するER exit site構築の解析

ER膜上でCOPII小胞の形成が行われるER exit siteの形成に関与することが示唆されているSec16について、試験管内再構成系や人工脂質平面膜系での解析を目的として、各COPII因子との結合領域や、Sec16の機能ドメインを同定する。それらの機能ドメインの精製系を構築し、試験管内再構成系に導入して解析を行う。これまでSec16は、COPIIコート、低分子量GTPase Sar1、グアニンヌクレオチド交換因子Sec12など、COPII小胞の形成に関与するほとんどすべての因子と相互作用することが報告されているものの、それらの相互作用がER exit siteの形成とどのようにリンクしているのかについては一切不明である。試験管内再構成系を用いることにより、特にSec16による低分子量GTPase Sar1のGTPase活性制御を中心に解析することにより、COPII小胞形成とER exit site形成にSec16がおよぼす役割を精密に解析する。

(3) 試験管内再構成系を用いたリン酸化/脱リン酸化による COPII 小胞形成制御機構の解析
スクリーニングにより同定された脱リン酸化酵素について、その酵素が COPII 小胞形成過程において制御する反応を、試験管内再構成系を用いて詳細な解析を行う。具体的には、同定された脱リン酸化酵素を欠損した株より、その脱リン酸化のターゲットとなる COPII 因子の精製を行う。これにより得られたハイパーリン酸化 COPII 因子を用いて、COPII 小胞形成過程の一連の反応のうち、どのサブステップでの活性に影響を与えているのかを明らかにする。さらに、各サブステップにおける低分子量 GTPase Sar1 の GTPase 活性への影響を測定することにより、リン酸化/脱リン酸化により調節される反応を明らかにする。

(4) COPII 因子のリン酸化/脱リン酸化による輸送反応制御の in vivo 解析

同定した脱リン酸化酵素について、そのターゲットとなる COPII 因子との細胞内における相互作用を、酵母 two-hybrid 法、および免疫沈降法により確認を行う。これらの方法により相互作用が検出できた場合、さらに COPII 因子の部分欠失変異体を用いることにより、リン酸化されるドメインの探索を行い、リン酸化される部位を絞り込む。リン酸化部位が同定できた場合、その情報を元に COPII 因子のリン酸化部位変異体を作成し、細胞内における ER-ゴルジ体間の小胞輸送活性、ER exit site 形成能、およびシス-ゴルジ体の形成能を指標として、リン酸化/脱リン酸化により制御される反応の詳細な解析を行う。

(5) 人工脂質平面膜を用いた Sec16 による COPII 小胞形成の空間制御の解析

これまで Sec16 は試験管内での COPII 小胞形成反応には不要であるとされているものの、細胞内においては特に ER exit site の形成に重要な機能を果たしている可能性が示唆されており、また、ER-ゴルジ体間の小胞輸送のみならず生育に必須な因子であることが示されている。研究代表者のグループでは、顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上で COPII 小胞形成反応を再現し、蛍光標識した各因子のダイナミクスを観察、計測する実験系を構築している。精製 Sec16、あるいはその機能ドメインの存在下において、人工脂質平面膜上における積み荷タンパク質や COPII コートの集積過程について解析を行い、ER exit site 様の構造が形成されるかについて詳細に検討を行う。

4. 研究成果

COPII 小胞形成因子のうち、COPII コートの各サブユニット (Sec13, Sec31, Sec23, Sec24) と、出芽酵母が持つ 3 種類の脱リン酸化酵素との相互作用について、酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングを行ったところ、2 種類の PP2A タイプに分類される脱リン酸化酵素が、COPII コートを構成するもののうち、Sec24 サブユニットと相互作用する可能性が示唆された。Sec24 のアイソフォームである Lst1 では同様な相互作用は見られなかった。これら 2 つの脱リン酸化酵素を欠損させた酵母株の作成を行い、細胞内における Sec24 の挙動を解析したところ、リン酸化された Sec24 が細胞内に蓄積されることが認められた。また、欠損株内においては、ER 膜に結合している Sec24 の割合が低くなることを見出した。これらのことから、同定した 2 つの PP2A タイプの脱リン酸化酵素により Sec24 のリン酸化状態が変化することにより、このコートタンパク質の ER 膜への結合が制御されていることが明らかとなった。

さらに、同定された 2 つの脱リン酸化酵素のうち、片方のみを欠損させた場合には、リン酸化 Sec24 の蓄積、および Sec24 の局在変化が見られなかったことから、2 つの脱リン酸化酵素は、冗長的に機能していることが明らかとなった。

また、ER exit site の形成に深く関与することが示唆されている足場タンパク質 Sec16 について、顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上に再現した COPII 小胞形成反応における動態を検出するための蛍光標識法の検討を行い、Sec16 の挙動の可視化が可能で蛍光標識 Sec16 の精製標品を得ることができた。また、この蛍光標識 Sec16 と各 COPII 因子とを別々の蛍光色素で染め分けて検出するための材料、および測定条件について検討を行い、データ取得のための実験条件を最適化させた。この実験系を用いて COPII 小胞形成過程における、Sec16 の挙動を解析したところ、COPII コート、および積み荷タンパク質が形成するクラスター内に Sec16 が取り込まれていることが明らかとなった。さらに、この Sec16 の取り込みには、低分子量 GTPase である Sar1 による GTP 加水分解サイクルが必須であることを明らかにした。これらのことから、これまで不明であった、COPII 小胞形成過程における Sec16 の時空間情報について新たな知見が得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Iwasaki, H., Yorimitsu, T., Sato, K. “Microscopy analysis of reconstituted COPII coat polymerization and Sec16 dynamics” J. Cell Sci., 査読有, 130, 2017, 2893-2902.
doi:10.1242/jcs.203844

Sato, K. “ Sec16 at transitional ER sites: Still a model ” Bioessays, 査読有,38, 2016, 940.

doi:10.1002/bies.201600151

〔学会発表〕(計 3 件)

依光朋宏、佐藤 健：「ER の形態による COPII タンパク質の機能制御」第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 25 日 国立京都国際会館

島川純一、依光朋宏、佐藤 健：「COPII コート因子のリン酸化/脱リン酸化による小胞輸送制御メカニズムの解明」第 90 回日本生化学会大会 2017 年 12 月 9 日 国立京都国際会館

依光朋宏、佐藤 健：「COPII カーゴの ER exit sites への集積と Sec16 機能の関連性」第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 27 日 仙台国際センター（宮城県・仙台市）

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。