

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06126

研究課題名(和文) COPII小胞形成反応における膜の形態による制御機構の解析

研究課題名(英文) ER membrane structure can regulate COPII function in vesicle formation

研究代表者

依光 朋宏 (Yorimitsu, Tomohiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：00534364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：COPIIタンパク質は小胞体膜上の特定の部位ERESに集合し小胞体からの輸送を担う小胞を形成する。ERESは小胞体ネットワーク構造体のチューブ構造やシート構造の縁といった膜曲率が高い部位に形成される。本研究では小胞体ネットワークが破壊された酵母変異体の解析から、ERES形成に重要な役割を果たすSec16の機能が小胞体膜の構造変化により調節される可能性が見出された。また小胞体膜構造の変化がCOPIIタンパク質の膜への集合を制御する可能性も明らかにした。以上の結果からこれまで不明であったCOPIIタンパク質の機能制御と小胞体膜の構造の関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体は複雑なネットワーク構造体であることが知られている。一方、COPIIタンパク質は小胞体膜がくびり切られることで輸送小胞を形成するが、その足場となる小胞体膜の構造とCOPIIタンパク質機能についての関連性の有無は不明であった。本研究成果はその機能的関連性を示唆するものであり、本研究分野を発展させる意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：COPII protein assembles at the endoplasmic reticulum (ER) subdomain ERES and forms transport vesicles that mediate ER export. ER is a network structure that consists of the tubules and the sheets. ERES is known to be generated at high-curvature regions of the ER such as the tubules and edges of the sheets. In this study, I analyzed COPII protein in yeast mutant strain in which the ER structure is disrupted. I show that when the ER structure is altered, the essential function of Sec16, which plays a critical role in ERES formation, can be modulated. The altered ER structure also changes COPII protein assembly. These results provide insight into the functional relevance between the regulation of COPII protein and the structure of the ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 小胞輸送 COPII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体(ER)は平らなシート状領域とそこから伸びるチューブ状領域によるネットワーク化されたオルガネラである。また ER は細胞内輸送の入り口として機能する。ER から輸送されるタンパク質は、その内腔で高次構造形成ならびに翻訳後修飾を受けた後に輸送小胞 COPII 小胞に積み込まれゴルジ体へ輸送される。COPII 小胞は膜上で COPII コートタンパク質の一連の働きにより形成される。

COPII 小胞を介した輸送は ER 膜上のランダムな場所で行われるわけではなく、ER Exit Site (ERES) と呼ばれる特異サブドメインでのみ行われる。このようなサブドメインから COPII 小胞が形成される生理的意義は不明である。また、小胞形成に関わる COPII タンパク質の機能についての理解に比べると、ERES の分子機構の理解は遅れている。

ERES は蛍光タンパク質が融合された COPII タンパク質が集積するドットとして蛍光顕微鏡により観察できる。本研究で使用した出芽酵母細胞は数十個の ERES を持つ。ERES はチューブ領域やシート領域のエッジといった膜の湾曲が大きい ER 膜構造に構築される傾向にある可能性が報告されている。しかしそのメカニズムなどの詳細な解析はなされていない。生体膜の構造(湾曲)がタンパク質機能に影響を与えることはよく知られている。しかし ERES 機能ならびに ERES に集積する COPII タンパク質の機能の制御と ER 膜構造の関連性は不明である。

ERES 構築/制御に関わる重要な因子として Sec16 が同定されている。Sec16 は膜表在タンパク質であり全ての COPII コートと相互作用する。このような性質から Sec16 は膜上に集積することでドメインを形成し、そのドメインに COPII タンパク質をリクルートすることにより ERES を構築しその機能調節も担うことが推定されている。COPII タンパク質との相互作用の機能が近年明らかにされつつあるが、Sec16 の分子機能は未だ不明な点が多い。Sec16 機能の解明することが本研究分野の重要なテーマの一つである。

2. 研究の目的

ER の膜構造が ERES の機能性に関わる可能性を考え、特に ERES 機能に重要な役割を持つ Sec16 の機能に焦点を当てこの可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母を用いて実験を行なった。COPII タンパク質は生育に必須な因子であるため、温度感受性変異体を制限温度で培養することでその機能阻害実験を行なった。ER 膜構造の機能解析を行うために、ER 膜のネットワーク構造の維持に必要な因子を欠失した *rtn1Δ yop1Δ* 酵母変異体を用いた。タンパク質の細胞内局在の観察は蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより行なった。タンパク質間の相互作用を調べるために、まずクロスリンカー-DSP で処理した酵母細胞をガラスビーズで破碎し、その細胞抽出液をオクチルグルコシドにより可溶化した。この可溶性画分を Ni-NTA アガロースもしくは抗 HA 抗体と反応の後にウエスタンブロッティングにより相互作用するタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) ER 膜構造の変化に伴う Sec16 機能の調整

Sec16 は必須因子であり、その温度感受性変異体 Sec16^{L1089P} 変異体をプラスミド上から発現する *sec16Δ* 酵母細胞は制限温度である 30°C で致死になる。一方、Sec16 機能と ER 膜構造の関連性を調べるために L0189P 変異体を *rtn1Δ yop1Δ sec16Δ* 細胞で発現すると、制限温度でも生育することを発見した。Sec16 温度感受性変異体は Sec16^{L1089P} 以外に 3 つの変異体 Sec16^{L1059S}、Sec16^{L1084P}、Sec16^{W1231R} が同定されている。*rtn1Δ yop1Δ* による Sec16 変異体の生育回復は Sec16^{L1089P} 特異的であるかを調べるために、これら 3 つの変異体を発現する細胞を用い同様の実験を行なった。これらの変異体を発現する *sec16Δ* 細胞はそれぞれ異なる温度条件で生育致死を示した。4 つの変異体はそれぞれ異なる部位のアミノ酸残基が置換されているが、感受性を示す温度も異なることを明らかにした。Sec16^{L1089P} だけでなく他の 3 つの変異体を発現する *rtn1Δ yop1Δ sec16Δ* 細胞も全て制限温度条件で野生型と比較すると遅いながらも生育を示した。全ての変異体を発現する *sec16Δ* 細胞が生育を示さない 36°C 条件下でも、*rtn1Δ yop1Δ sec16Δ* 細胞では全て生育が見られた。

rtn1Δ yop1Δ に伴う生育回復は Sec16 以外の COPII タンパク質の温度感受性変異体でも生じるのかを調べた。*sec12-4*、*sec13-1*、*sec23-1* 温度感受性変異体それぞれに *rtn1Δ yop1Δ* を導入しその生育を調べた。非制限温度では *rtn1Δ yop1Δ* の有無で生育に違いは見られなかった。制限温度下では Sec16 変異体とは異なり *rtn1Δ yop1Δ* が導入された全ての温度感受性変異体で生育の回復は見られなかった。以上の結果から *rtn1Δ yop1Δ* による温度感受性変異体の機能回復は Sec16 特異的であると考えられた。

rtn1Δ yop1Δ による Sec16 変異体発現細胞の生育の回復は ER からの輸送能の回復によるものであるかを調べるために、COPII 小胞の積み荷である EGFP-Emp47、Mid2-GFP の細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。野生型 Sec16 発現細胞では温度に関わらず ER から運ばれた EGFP-

Emp47 はゴルジ体、Mid2-GFP は細胞膜へ局在する。一方、Sec16^{L1089P} 変異体を発現する sec16Δ細胞では、EGFP-Emp47、Mid2-GFP とともに非制限温度下では野生型 Sec16 発現細胞と同様の局在パターンを示すが、制限温度条件では ER への蓄積が見られた。対して、同制限温度下においてこのような ER への蓄積を示す Sec16^{L1089P} 発現 rtn1Δ yop1Δ sec16Δ細胞は顕著に減少した。このことから rtn1Δ yop1Δは Sec16 変異に伴う輸送阻害を回復することが考えられた。以上の結果から rtn1Δ yop1Δによる ER の膜構造の変化が膜に結合する Sec16 に影響を与え、その結果 Sec16 変異体の機能回復が生じることが示唆された。このことから ER の膜構造が Sec16 の機能を調節する可能性が考えられた。

(2) ER 膜構造による Sec16 機能の調整に関わる因子の探索

ER 膜構造による Sec16 の機能制御メカニズムを調べるためにこの現象に関わる因子の探索を行なった。Lnp1、Sey1 は Rtn1、Yop1 とともに小胞体ネットワークの構築に関わる。Sec16^{L1089P} を発現する rtn1Δ lnp1Δ sec16Δ細胞、yop1Δ lnp1Δ sec16Δ細胞では rtn1Δ lnp1Δ sec16Δ細胞と同様に制限温度下でも生育が観察された。一方、Sec16^{L1089P} を発現する rtn1Δ sey1Δ sec16Δ細胞、yop1Δ sey1Δ sec16Δ細胞だけでなく rtn1Δ yop1Δ sey1Δ sec16Δ細胞でも制限温度下での生育が阻害された。

Sey1 は dynamin-like GTPase タンパク質である。そこで GTPase 活性の機能を調べるために、野生型 Sey1 もしくは GTPase 活性阻害変異体 Sey1^{K50A} 変異体を Sec16^{L1089P} 発現 rtn1Δ yop1Δ sey1Δ sec16Δ細胞で発現させた。野生型 Sey1 では制限温度条件で生育が観察された一方、Sey1^{K50A} 変異体では生育が回復しなかった。以上の結果から ER 膜構造変化に伴う Sec16 変異体機能の回復に Lnp1、Sey1 が関わり、また Sey1 はその GTPase 活性依存的に関与することが示唆された。

ER 膜タンパク質 Sed4 は COPII 輸送に必要であり Sec16 と相互作用することが報告されている。そこで Sed4 の rtn1Δ yop1Δに伴う Sec16 機能回復への関与を調べるために、Sec16^{L1089P} を発現する rtn1Δ yop1Δ sec16Δ sed4Δ細胞 の生育を調べた。制限温度下においてこの細胞は生育が阻害されることを見出した。以上の結果より Sed4 が rtn1Δ yop1Δによる Sec16 変異体機能の回復に必要であることを示した。

(3) Sed4 の細胞機能の解析

Sed4 の細胞内での分子機能はその解析がほとんどなされてないため依然不明である。従って、rtn1Δ yop1Δによる Sec16 変異体機能の回復への Sed4 の関与のメカニズムの知見を得るためには、まず Sed4 自身の機能を知る必要があると考えた。そこでまず蛍光タンパク質を融合した Sed4 の細胞内局在を調べた。Sed4 は ER 全体だけでなく ERES へ局在することを発見した。この結果は Sed4 を大量発現した化学固定された細胞を用いた以前の報告とは異なる。本研究では Sed4 が比較的レベルで発現する生細胞を用いることでより生理的条件に近い条件下で観察しており、結果の相違は実験条件の違いから生じたものであると考えられる。

Sed4 と COPII タンパク質 Sec12 はともに 1 回膜貫通タンパク質で細胞質領域に相同性を示す。しかしその機能は異なり、Sec12 は ERES に局在せず Sec16 と相互作用しない。この機能性の違いを利用して Sed4 機能の解析を行うために Sed4-Sec12 キメラ変異体 Sed4^{12N} を作成した。Sed4^{12N} は Sec12 由来の細胞質領域を持ちそれ以外の領域は Sed4 由来のものを持つ変異体である。細胞内局在を調べると、Sed4^{12N} 変異体は野生型 Sed4 とは異なり ERES 局在能が阻害され Sec12 に似た局在を示した。Sec12 は ER のチューブ領域とシート領域の全体に局在するが、Sed4^{12N} も同様の局在パターンを示すのかを調べた。Sed4^{12N} は Sec12 と異なり ER のシートには局在せずチューブやシートの縁といった膜の曲率の高い領域のみに局在することを発見した。

Sec12 と Sed4^{12N} はその ER 内腔領域が異なることから、Sed4^{12N} の膜曲率の高い領域への局在化は ER 内腔領域の働きによるものであると考えた。そこでこのような局在パターンを生み出すドメインを調べるために Sed4^{12N} の ER 内腔領域の欠損変異体を作成した。作成した ER 内腔領域の様々な部位を欠損する種々の変異体は Sec12 様の局在パターンを示したことから、膜曲率の高い領域への局在は ER 内腔領域の全体もしくは複数の部位に担われることが考えられた。以上の結果から、ER 膜構造により Sed4 の局在、機能が制御され、その結果相互作用する Sec16 の機能も調節される可能性が推測された。

(4) ER 膜構造による COPII タンパク質間相互作用の制御

ER 膜構造変化に伴う Sec16 機能への効果について分子レベルで知見を得るために、rtn1Δ yop1Δ細胞中での COPII タンパク質間の相互作用を免疫沈降法により調べた。まず COPII コートサブユニット Sec23-his と Sec31-Flag の相互作用を検証した。野生型細胞に比べ rtn1Δ yop1Δ細胞では Sec23-his と相互作用する Sec31-Flag が減少した。次に、Sec16-HA と Sec23、Sec31-Flag の相互作用を調べた。野生型細胞に比べ rtn1Δ yop1Δ細胞では Sec16-HA と相互作用する Sec23 は増加した一方 Sec31-Flag は減少した。これらの結果から rtn1Δ yop1Δが COPII タンパク質間の相互作用に影響を与えることが示唆された。rtn1Δ yop1Δにより ER の膜構造が変化す

ることに伴い Sec16 機能に影響を及ぼし、その結果 Sec16 と COP11 タンパク質間の相互作用パターンが変化した可能性が考えられた。このことから ER の膜構造は COP11 タンパク質間の相互作用を調節する働きを持つことが推定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horikawa, K., Yorimitsu, T., Kodera, C. Sato, K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Implication of a Novel Function of Sar1 in the Nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Struct Funct	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yorimitsu, T., Sato, K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Sec16 function in ER export and autophagy is independent of its phosphorylation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell	6. 最初と最後の頁 149-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-08-0477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依光 朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 ERの形態によるCOPIIタンパク質の機能制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依光 朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 ER構造によるCOPII小胞輸送の調節
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依光 朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 小胞体の形態変化に伴うCOP11輸送システムの制御メカニズム
3. 学会等名 第3回オルガネラゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依光 朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 Sed4はSec16と共にER exit siteにおいて機能する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関