

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19687008

研究課題名（和文） 人工脂質平面膜を用いた輸送小胞形成のダイナミクス解析

研究課題名（英文） Dynamic analysis of transport vesicle formation using artificial planar lipid bilayer

研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00303602

研究成果の概要（和文）：1 分子観察用の顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜を用いて、小胞体からの輸送小胞形成反応を再現し、輸送小胞形成過程における蛍光標識した輸送基質タンパク質、および輸送小胞形成因子の挙動を解析した。その結果、低分子量 GTPase Sar1 による GTP 加水分解とコートタンパク質の働きによって輸送基質タンパク質が効率的に輸送小胞へと集積されていく分子メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the dynamics of fluorescently labeled cargo proteins during COPII vesicle formation using single-molecule microscopy combined with an artificial planar lipid bilayer. We show that continuous GTPase cycles of Sar1 facilitate cargo concentration into COPII vesicle buds. We propose that the minimal set of COPII components is required to concentrate cargo molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：小胞輸送、輸送小胞、小胞体、低分子量 GTPase、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内には、オルガネラが発達し、各オルガネラ間は直径 50～100 nm の輸送小胞を介した小胞輸送によって盛んに物質のやりとりが行われている。細胞内の膜系の半分以上を占める小胞体は、小胞輸送によって運び出されるタンパク質の種類が最も多く、COPII コートと低分子量 GTPase である

Sar1 によって輸送されるタンパク質の輸送小胞への取り込みが厳密に制御されている。しかし、輸送小胞が形成される様子は、電子顕微鏡による固定されたスナップショットという静止した情報しか得られないという限界があった。そのため、輸送される基質タンパク質が輸送小胞に選択的に取り込まれる過程や、コートタンパク質が Sar1 によっ

て制御されながら自己集合する過程など、輸送小胞形成の基本的特性については依然として不明なままであった。

2. 研究の目的

小胞体における輸送小胞形成の反応メカニズムを解明するには、従来の生化学的手法による解析だけではなく、生体膜上における輸送される基質タンパク質や、低分子量 GTPase とコートタンパク質の自己集合過程を 1 分子レベルで直接可視化して解析することが重要である。蛍光タンパク質を用いた細胞内イメージング技術の発展により生体膜因子を観察することが可能となっているものの、生体膜上での個々の因子のダイナミクスを解析するには限界がある。そこで本研究では、これまでに研究代表者が構築した精製因子により輸送小胞形成を再現する完全再構成系を、1 分子観察用の顕微鏡下で人工脂質平面膜上に再現して、これを制御された実験条件下で観察・解析を行うことで、小胞体からの輸送小胞形成反応の分子メカニズムの解析を行い、小胞輸送研究のブレークスルーをめざす。

3. 研究の方法

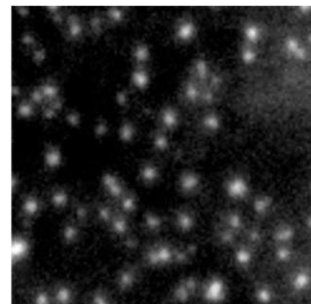
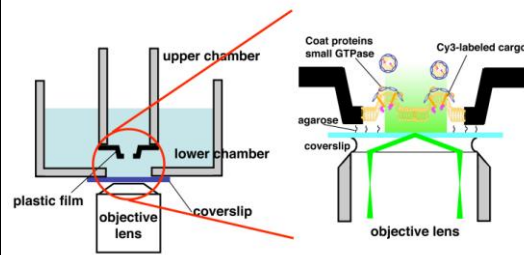
精製した輸送される基質となる積み荷タンパク質を蛍光標識し、顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜に再構成する。ここに輸送小胞形成に必要なコートタンパク質や低分子量 GTPase などの精製因子を加えることにより、積み荷タンパク質が輸送小胞へと集積される様子を可視化し、形成される蛍光輝点の座標、および蛍光強度から定量的に解析を行う。また、輸送小胞形成において最も重要な役割を担っている低分子量 GTPase を蛍光標識し、輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase の動態を明らかにする。さらに、非輸送基質タンパク質（非積み荷タンパク質）の動態についても積み荷タンパク質の動態と同時に解析を行い、輸送小胞形成過程における、積み荷タンパク質と非積み荷タンパク質との選別の分子メカニズムについても詳細な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 精製因子による COPII 小胞形成過程の定量的可視化法の確立

1 分子観察用の顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜に、蛍光標識した積み荷膜タンパク質を再構成し、小胞体から形成される輸送小胞 (COPII 小胞) の形成に必要な可溶性因子を加えることによって、COPII 小胞形成過程における積み荷膜タンパク質のダイナミクスをリアルタイムでイメージングして解析を行う手法を確立させた。この実験系の最大のメリットは蛍光標識した積み荷タンパク

質の「時空間情報」が蛍光輝点の座標と蛍光強度を指標として定量的に得られることである (下図)。



人工脂質平面膜上で形成途上の COPII 小胞を蛍光の輝点として定量的に捉えることができる

(2) 人工脂質平面膜系を用いた COPII 小胞への積み荷タンパク質濃縮の分子メカニズムの解明

これまで、細胞内のどの小胞輸送経路においても、輸送小胞 1 個あたりに取り込まれる積み荷タンパク質の数は何分子なのかという、ごく素朴な問いに答えられていなかったものの、この実験系を用いて解析を行うことにより、膜上で形成途上の COPII 小胞を蛍光の輝点として定量的に捉えることができ、COPII 小胞 1 個あたり約 70 分子の積み荷タンパク質が取り込まれることを明らかにした。さらに低分子量 GTPase である Sar1 が GTP の加水分解を繰り返すことにより、積み荷タンパク質の COPII 小胞への濃縮が促進される様子を初めて可視化し、これまでの試験管内再構成系の結果から予測されていた Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる積み荷タンパク質の濃縮モデルを証明した。

(3) COPII 小胞形成過程における非積み荷タンパク質の排除メカニズムの解明

小胞体からの COPII 小胞形成過程において、輸送シグナルを持たない非積み荷タンパク質が COPII 小胞から積極的に排除される現象が知られているものの、この現象に関わる因子や分子メカニズムについては明らかとなっていなかった。そこで、構築した人工脂質平面膜を用いたダイナミクス解析により、積

み荷タンパク質、および非積み荷タンパク質をそれぞれ別々の蛍光色素で標識することにより、COPII 小胞形成過程における両者のダイナミクスについて解析を行った。COPII 因子の添加後、積み荷タンパク質を検出するチャンネルで観察を行ったところ、人工脂質平面膜上に GTP および COPII 因子依存的に積み荷タンパク質によるクラスターが形成されているのが確認された。この時、非積み荷タンパク質を検出するチャンネルで観察を行うと、積み荷タンパク質が形成するクラスター領域がバックグラウンドと比べて 6-7 割程度蛍光シグナルが減少していることが確認された。これらのことから、COPII 因子によって膜上に形成された積み荷タンパク質のクラスターから、輸送シグナルを持たない非積み荷タンパク質が積極的に排除を受けていることが示唆される。さらに、この非積み荷タンパク質の排除の効率は、GTP の非加水分解アナログである GMP-PNP 存在下では低下することから、Sar1 による GTP 加水分解サイクルによって非積み荷タンパク質の COPII 小胞からの排除が促進されていることが明らかとなった。以上のことから、COPII 因子のみでも積み荷タンパク質の COPII 小胞への濃縮と同時に、非積み荷タンパク質の COPII 小胞からの選択的排除が行われていることが初めて示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yamashita, M., Kurokawa, K., Sato, Y., Yamagata, A., Mimura, H., Yoshikawa, A. Sato, K., Nakano, A., Fukai, S. (2010) Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3. *Nature Struct. & Mol. Biol.* 17, 180-186. 査読有り
2. Tabata, K.V., Sato, K., Ide, T., Nishizaka, T., Nakano, A., Noji, H. (2009) Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J.* 28, 3279-3289. 査読有り
3. Murakami-Sekimata, A., Sato, K., Sato, K., Takashima, A., Nakano, A. (2009) O-Mannosylation is required for the solubilization of heterologously expressed human b-amyloid precursor protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 14, 205-215. 査読有り
4. Higashio, H., Sato, K., Nakano, A. (2008) Smy2p participates in COPII vesicle formation through the interaction with Sec23p/Sec24p subcomplex. *Traffic* 9, 79-93. 査読有り
5. Sato, K., Nakano, A. (2007) Mechanisms of

COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett.*, 581, 2076-2082. 査読有り

6. Goh, T., Uchida, W., Arakawa, S., Ito, E., Dainobu, T., Ebine, K., Takeuchi, M., Sato, K., Ueda, T., Nakano, A. (2007) VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 3504-3515. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. 佐藤 健 「小胞体における輸送小胞形成の分子メカニズムの解析」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月 21 日 神戸国際会議場

2. Ken Sato “Dynamics of COPII-mediated cargo concentration observed in a planar lipid membrane” 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 平成 20 年 12 月 12 日 神戸国際会議場

3. 小寺千絵、中野明彦、佐藤 健 「Sed4p による Sar1p の制御機構の解析」第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 平成 20 年 12 月 12 日 神戸国際会議場

4. Ken Sato “Cargo concentration and COPII vesicle formation observed in reconstituted planar model membrane system” 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会 平成 19 年 12 月 13 日

[図書] (計 3 件)

1. 佐藤 健 秀潤社 細胞工学「Sar1 が制御する輸送小胞形成の分子メカニズム」(2009) 1264-1268.

2. Ken Sato and Akihiko Nakano, Springer Wien New York, “The Golgi Apparatus-COPII” (2008) 78-86.

3. 佐藤 健 共立出版 蛋白質核酸酵素「小胞体における積み荷蛋白質の選別と COPII 小胞形成のメカニズム」(2008) 2039-2045.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：00303602