

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06655

研究課題名(和文)小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送を支えるリン酸化・脱リン酸化による制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanisms by phosphorylation-dephosphorylation that supports ER-to-Golgi vesicular traffic

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では出芽酵母における小胞体とゴルジ体間の小胞輸送をモデル系とし、この反応に関わる因子群が受けるリン酸化、脱リン酸化に着目して、輸送反応とそれに関わるオルガネラ形成が制御、調節される仕組みについて解析を行った。その結果、PP2AホスファターゼによりCOPIIコートを構成するサブユニットのT21残基が脱リン酸化を受けることを明らかにした。また、小胞体出口部位の形成に関与するSec16について、この因子のリン酸化は機能上必須ではないことを示し、さらにSec16は小胞体膜に局在するSed4と協働して機能してい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

真核細胞に普遍的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あて、その制御機構の一端を明らかにした。小胞輸送反応は他領域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が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明らかにすることは、現代細胞生物学の重要なテーマであると同時に、創薬や疾患治療にも大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, using vesicular transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in budding yeast as a model system, we focused on phosphorylation and dephosphorylation of factors involved in this reaction and analyzed how transport reactions and related organelle formation are regulated and controlled. We found that the T21 residue of the COPII coat subunit is dephosphorylated by PP2A phosphatase. We also showed that phosphorylation of Sec16, which is involved in the formation of the ER exit site, is not functionally essential, and that Sec16 functions in concert with Sed4, which localizes to the ER membrane.

研究分野：細胞内輸送

キーワード：小胞輸送 リン酸化 COPII 小胞体

## 1. 研究開始当初の背景

「シグナル仮説」の提唱から40余年がたち、細胞内のさまざまなオルガネラへのタンパク質の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働きが重要であるという概念はもはやすっかり定着した。これに加えて、オルガネラの膜を変形させて小胞を形成し、そこに特定の分子を取り込んで別のオルガネラへと運ぶ「小胞輸送」における厳密な分子選別のしくみについての理解も進んできている。一方で、小胞輸送が生み出す膜の流れはオルガネラの形成・形態維持と直接関わる現象であるものの、これに関わるメカニズムについての知見は驚くほど少なく、細胞というシステムの中で分子レベルで正確かつ厳密に理解することが求められている。

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反応は厳密に制御を受けていることは明らかである。例えば、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しているものの、この制御に関わる仕組みは実体さえつかめていない。さらにCOPII小胞の形成はER exit siteと呼ばれるER膜上の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ようであるが、このER exit siteの構築メカニズムでさえ依然として不明である。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、小胞輸送を理解するための次のステップとして重要な課題は、この反応の制御メカニズムの解明ではないかと考えるに至った。この足がかりとなる事実として、COPII小胞の形成に関わる因子群は、さまざまな翻訳後修飾を受けることが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かについての知見は非常に少ない。そこで本研究では、翻訳後修飾の中でもリン酸化・脱リン酸化による制御に注目し、出芽酵母におけるERからゴルジ体への小胞輸送をモデルとし、この反応に関わる因子群がリン酸化・脱リン酸化により受ける制御の実態、およびER exit siteの形成に関わる分子メカニズムと、これらがもたらすオルガネラ形成への影響について解析を行う。独自の試験管内再構成系を用いたアプローチにより解析を行うのと同時に、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、および反応制御機構の解析

出芽酵母では32種の脱リン酸化酵素が同定されており、これらとCOPIIコートの各サブユニット(Sec13/31、Sec23/24)、低分子量GTPase Sar1とこのヌクレオチド交換因子Sec12、およびER exit site形成因子であるSec16について相互作用を酵母two-hybrid法により検討する。これまでの予備実験から、COPIIコートのサブユニットの一部、および低分子量GTPase Sar1、そしてそのヌクレオチド交換因子Sec12と相互作用する脱リン酸化酵素の候補が得られている(未発表)。引き続きスクリーニングを行うと同時に、既に得られている候補の脱リン酸化酵素について解析に着手する。具体的には、候補となる脱リン酸化酵素の欠損株中における各COPII因子の分子量シフト、およびリン酸化抗体による検出を指標に、脱リン酸化のターゲットとなるCOPII因子を確定させる。

また同定されたCOPII因子の脱リン酸化がCOPII小胞形成過程に及ぼす影響について、試験管内再構成系を用いた詳細な解析を行う。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、ターゲットとなるCOPII因子の精製を行い、得られたハイパーリン酸化したCOPII因子を用いることにより、小胞形成の一連の反応のうち、どのサブステップ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。

さらに同定した脱リン酸化酵素について、これに関わるCOPII因子中のリン酸化部位を質量分析等で同定する。リン酸化部位が同定できた場合、その情報を元にCOPII因子の非リン酸化変異体、および擬似リン酸化変異体を作成し、細胞内における小胞体-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形成への影響を指標として、リン酸化/脱リン酸化により制御される反応、およびこれが関与するオルガネラの形成・形態維持について詳細

な解析を行う。

#### (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、精製 Sec16 とその機能ドメインを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していく。

また、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可視化解析を行い、人工脂質平面膜上で 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

酵母 two-hybrid 法により、COPII コートのサブユニットを構成する因子のうちの一つが PP2A ホスファターゼと相互作用して脱リン酸化を受けることを明らかにし、さらにこの PP2A ホスファターゼがターゲットとするリン酸化部位の同定を行った。その結果、COPII コートサブユニットの 21 番目のリン酸化チロシンであることが明らかになった。また、この 21 番目のチロシンを非リン酸化残基、あるいはアスパラギン酸やグルタミン酸などの疑似リン酸化残基に置換した COPII コートサブユニットを発現する酵母株を作成した。これらの酵母株を用いて、細胞内における小胞輸送反応やオルガネラの形態形成におよぼす影響について解析を行ったところ、現在まで解析した限りではこれ大きな影響は見られていない。

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 の解析では、これまでの網羅的解析により同定されている Sec16 中のリン酸化部位 108 箇所について、これらすべてをアラニン残基に置換した変異体を作成した。この Sec16 変異体を酵母細胞中に発現させたところ、ER exit site の形成、および小胞体からの小胞輸送活性に顕著な影響は見られなかった。このことから、これまで重要な役割を果たしていると考えられていた Sec16 のリン酸化自体は、小胞体からゴルジ体への小胞輸送や、関連するオルガネラの形態形成に必須ではないことが明らかとなった。また、Sec16 が関与しているオートファジーについても Sec16 変異体を発現させた株で大きな影響は見られなかった。さらに ER exit site の形成過程において、Sec16 が小胞体膜に局在する Sec12 ホモログである Sed4 と特定の領域で相互作用することを明らかにした。この相互作用に加え、Sed4 が小胞体膜中で自己集合するのにもなって ER exit site が形成されることも明らかにした。

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 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 -

1. 著者名 Yorimitsu, T., Sato, K.	4. 巻 136
2. 論文標題 Sec16 and Sed4 interdependently function as interaction and localization partners at ER exit sites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs.261094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.261094	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3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 Sec16とSed4は相互作用することでER exit siteに集合する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依光朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 小胞体膜タンパク質Sed4のER exit siteへの集合メカニズム
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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