

機関番号：32659

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370050

研究課題名 (和文) ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of the retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum

研究代表者 多賀谷 光男 (TAGAYA MITSUO)
東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

研究成果の概要 (和文)：小胞体からの順行輸送は、ゴルジ体からの逆行輸送によって相補されており、両者の輸送のバランスは厳密にコントロールされている。逆行輸送については今まで解明が進んでいなかったが、申請者は小胞体に存在する SNARE (syntaxin18: Syn18) を同定し、このタンパク質が逆行輸送における膜融合に関与することを見いだした。Syn18 は他の SNARE (BNIP1、p31、Sec22b) および膜表在性タンパク質である ZW10、RINT-1、NAG と複合体を形成している。本研究によって以下のことが明らかとなった。

(1) NAG はその N 末端領域で p31 の N 末端領域と結合し、C 末端領域で ZW10-RINT-1 と結合している。NAG は逆行輸送を仲介する輸送小胞の小胞体への繫留に関与する。(2) ノックアウトマウスの解析から、p31 遺伝子は細胞の生存に必須であることが判明した。p31 の欠損は小胞体ストレスを誘起してアポトーシスを導く。(3) Syn18 は小胞体構造の維持に関与し、それには逆行輸送も何らかの関係をしている。(4) 逆行輸送を介して膜タンパク質の小胞体局在維持に関与する Rer1 は、動物細胞では小胞体-ゴルジ体中間区画に存在し、その形成に関与する。

研究成果の概要 (英文)：The anterograde transport from the endoplasmic reticulum (ER) is compensated by the retrograde transport from the Golgi apparatus, and a balance of the two pathways is precisely regulated. The mechanism of the retrograde transport remained to be elucidated. We identified syntaxin 18 (Syn18), an ER SNARE implicated in membrane fusion in the retrograde pathway. It forms a complex with other SNAREs (BNIP1, p31, and Sec22b) and peripheral membrane proteins (ZW10, RINT-1, and NAG). The following results have been obtained in this projects. (1) NAG interacts with the N-terminal region of p31 and ZW10-RINT-1 through its N- and C-terminal regions, respectively. NAG functions to mediate the tethering of retrograde transport carriers with the ER. (2) Gene knockout study revealed that p31 is essential for cell viability. Knockout of the p31 gene induces ER stress, leading to apoptosis. (3) Syn18 is involved in the maintenance of the ER structure, and the retrograde transport from the Golgi is related to this function via an unknown mechanism. (4) Rer1, a receptor involved in the maintenance of the localization of ER-resident membrane proteins, is located in the ER-Golgi intermediated compartment and involved in its organization in mammalian cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌系タンパク質の合成の場であり、品質管理機構によって立体構造の形成されたタンパク質のみを選別し、順行輸送によってゴルジ体に向けて搬送する。順行輸送に伴ってゴルジ体へ運ばれた輸送を仲介する膜タンパク質や、誤送された小胞体残留タンパク質は、逆行輸送によって小胞体へと戻される。相反する輸送のバランスは厳密にコントロールされていると考えられているが、その分子機構はまだよくわかっていない。

小胞輸送の最終ステップである小胞と膜の融合は SNARE によって媒介されている。SNARE (SNAP receptor) には、ターゲット膜に存在する分子種 (t-SNARE) と小胞に存在する分子種 (v-SNARE) が存在する。t-SNARE からは 3 本、v-SNARE からは 1 本、合計 4 本の α -ヘリックスが強固に結合することで小胞とターゲット膜の融合が引き起こされると考えられている。膜融合後、 α -SNAP を介してシャペロン様 ATPase である NSF が SNARE 複合体に結合し、ATP の加水分解エネルギーを利用して複合体を解離させる。

我々は、動物細胞小胞体に存在する SNARE である syntaxin18 (Syn18) を同定し、Syn18 が他の SNARE (BNIP1、p31、Sec22b) および膜表面タンパク質 (ZW10、RINT-1 など) と結合していることを見いだした。ZW10 と RINT-1 は細胞周期のチェックポイントに、BNIP1 は BH3-only タンパク質としてアポトーシスに関与することが報告されていたが、申請者らの研究によって、これらのタンパク質は多機能タンパク質として小胞体-ゴルジ体間の膜輸送にも関与することが示された。申請者らの知見は、小胞体膜融合反応は独立した細胞内現象ではなく、この複合体タンパク質を介して、様々な反応とクロストークしている可能性を示唆する。最近の研究では、神経芽細胞腫で増幅している遺伝子 (NAG: Neuroblastoma-amplified gene) 産物も、Syn18 複合体のサブユニットであることを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究では、Syn18 による小胞体膜融合に着目し、その解析の難しさのために研究の遅れているゴルジ体から小胞体への輸送 (逆行輸送) の機構の解明を目指す。また、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を行うことで、膜タンパク質の小胞体保持に関与する Rer1 についても研究を行う。以下はその具体的な項

目である。

- 1) 新たに同定した NAG の機能の解明
- 2) ノックアウト細胞を利用した p31 の機能の解析
- 3) Syn18 の小胞体膜融合における役割
- 4) Rer1 の解析

3. 研究の方法

1) 生化学的手法

結合実験に用いるタンパク質は、His₆ や GST 等のタグを付加し、組換えタンパク質として大腸菌で発現させ精製した。抗体を作製する場合には、組換えタンパク質あるいは合成ペプチドを用い、ウサギに免疫した。抗体は、抗原カラムを用いて抗血清からアフィニティ精製した。

2) 遺伝子ノックアウト

p31 遺伝子のノックアウトにおいては、コンディショナルノックアウトの手法を用いた。MEF は p31 (flox/flox) マウスと p31 (+/-) をかけ合わせ、13.5 日の胚から調製した。p31 遺伝子は、Cre リコンビナーゼを有するアデノウイルスを MEF に感染させてノックアウトした。

3) 細胞生物学的手法

培養細胞は多くの場合、HeL 細胞を用いた。結合実験等、タンパク質の高発現が必要な場合には 293T 細胞を用いた。RNAi は合成オリゴ RNA を用いて行った。複数のオリゴ RNA を用いるか、あるいはオリゴ RNA 耐性の cDNA を発現させて、発現抑制の効果が特異的であることを検証した。

4) 顕微鏡による解析

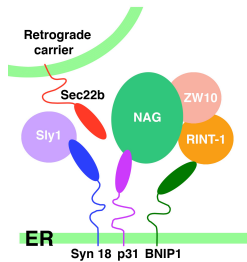
蛍光顕微鏡解析にはオリンパス fluoview 300 あるいは 1000、Leica DMIRE2 を用いた。電子顕微鏡解析は長浜バイオ大学の山本章嗣博士に行っていた。

4. 研究成果

1) 新たに同定した NAG の機能の解明

NAG は 2,371 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、酵母 Sec39/Ds13 と同源性を有していることから、酵母のオルソログであると考えられる。NAG はその N 末端領域で p31 の N 末端領域と結合し、C 末端領域で ZW10-RINT-1 と結合した。RNAi 法を用いて NAG の発現を抑制すると p31 の発現量も減少した。それゆえ NAG は複合体を形成することで p31 を安定化していると考えられる。NAG 発現抑制細胞ではゴルジ体の形態には変化がなく、また小胞体からのタンパク質の輸送にも変

化がなかったが、小胞体-ゴルジ体中間区画 (ERGIC) は分散し、また、シスゴルジに存在して小胞体へリサイクリングしているタンパク質を分散させた。ジギトニン処理で細胞膜に孔をあけると、分散したリサイクリングタンパク質を含む膜構造は消失したことから、それらの膜構造は細胞構造にしっかりと繋ぎ止められていなくなっていることがわかった。以上の結果から、NAG は p31 と ZW10-RINT-1 をつなぐ働きを持ち、逆行輸送を仲介する膜小胞の繫留に関与していることが示唆された。NAG の酵母オルソログである Sec39/Ds13 は 82 kDa しかなく、それに比べて NAG は 270 kDa と大きなタンパク質なので、Syn18 複合体としての機能だけでなく、他の機能も有しているかもしれない。



2) ノックアウト細胞を利用した p31 の解析
p31 のノックアウトマウスは胎生致死であることから、p31 は細胞の増殖に必須なタンパク質であることが判明した。脳において p31 を欠損させると、p31 欠損細胞はアポトーシスを起こして死滅した。MEF を使って解析すると、p31 の欠損によって小胞体構造が大きく崩れ、それに伴って小胞体ストレスが起こってアポトーシスへと導かれることが判明した。

3) Syn18 の小胞体膜融合における役割
Syn18 の機能は RNAi 法を用いて調べた。Syn18 の発現を抑制すると、ERGIC のみならずゴルジ体も分散した。Syn18 発現抑制細胞では、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送のみならず、小胞体からゴルジ体への順行輸送においても遅延が見られた。興味深いことに、Syn18 の発現が抑制されると、粗面小胞体と滑面小胞体が分離し、滑面小胞体は凝集体を形成した。この分離は、逆行輸送を活性化するブレフェルジン A によって解消されることから、逆行輸送と小胞体構築の間に関連性があることが示唆された。

4) Rer1 の機能の解明
酵母においては Rer1 はゴルジ体に存在することが報告されているが、動物細胞では Rer1 がゴルジ体ではなく ERGIC に存在することが判明した。Rer1 と KDEL 受容体はともにゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関与する

が、異なるタイプのカーゴを輸送する。GFP-Rer1 および KDEL 受容体-mRFP を利用し、生細胞イメージングによって両者の挙動を比較した。その結果、Rer1 が ERGIC に存在するのに対して、KDEL 受容体はシスゴルジに存在し、両者は異なる経路で小胞体へ戻ることが判明した。Rer1 の発現を抑制すると ERGIC 構造が分散し、そこに存在するタンパク質が小胞体へ戻ることが判明した。一方、KDEL 受容体などのシスゴルジ体に存在するタンパク質の局在には変化がなかった。これらの結果から、Rer1 は ERGIC に存在し、ERGIC の構築に関与していることが判明した。

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 8 件)

1. Steuble, M., Gerrits, B., Ludwig, A., Mateos, J. M., Diep, T. M., Tagaya, M., Stephan, A., Schatzle, P., Kunz, B., Streit, P., and Sonderegger, P. Molecular characterization of a trafficking organelle: dissecting the axonal paths of calyculin-1 transport vesicles. *Proteomics* **10**, 3775-3788 (2010). 査読有
2. Iinuma, T., Aoki, T., Arasaki, K., Hirose, H., Yamamoto, A., Samata, R., Hauri, H. P., Arimitsu, N., Tagaya, M., and Tani, K. Role of syntaxin 18 in the organization of endoplasmic reticulum subdomains. *J. Cell Sci.* **122**, 1680-1690 (2009). 査読有
3. Aoki, T., Ichimura, S., Itoh, A., Kuramoto, M., Shinkawa, T., Isobe, T., and Tagaya, M. Identification of the neuroblastoma-amplified gene (NAG) product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum

- retrograde transport. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2639-2649 (2009). 査読有
4. Uemura, T., Sato, T., Aoki, T., Yamamoto, A., Okada, T., Hirai, R., Harada, R., Mori, K., Tagaya, M., and Harada, A. p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1869-1881 (2009). 査読有
 5. Nagahama, M., Ohnishi, M., Kawate, Y., Matsui, T., Miyake, H., Yuasa, K., Tani, K., Tagaya, M., and Tsuji, A. UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 303-308 (2009). 査読有
 6. Inoue, M., Arasaki, K., Ueda, A., Aoki, T., and Tagaya, M. N-terminal region of ZW10 serves not only as a determinant for localization but also as a link with dynein function. *Genes Cells* **13**, 905-914 (2008). 査読有
 7. Katano, T., Furue, H., Okuda-Ashitaka, E., Tagaya, M., Watanabe, M., Yoshimura, M., and Ito, S. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 3161-3170 (2008). 査読有
 8. Wakana, Y., Takai, S., Nakajima, K., Tani, K., Yamamoto, A., Watson, P., Stephens, D., Hauri, H.-P., and Tagaya, M. Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtannuclear compartment related to ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1825-1836 (2008). 査読有
- [学会発表] (計 7 件)
1. Itoh, A., Wakana, Y., Furuno, A., and Tagaya, M. Mammalian Rer1 is localized at the ER-Golgi intermediate compartment and participates in its formation. The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010/9, Nara
 2. 伊藤彩乃、古野暁子、若菜裕一、多賀谷光男、哺乳類 Rer1 は ERGIC-53 (小胞体-ゴルジ体中間区画タンパク質) の局在調節に関与する、第 82 回日本生化学会大会、2009/10、神戸
 3. 多賀谷光男、伊藤彩乃、若菜裕一、Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral and centrosomal regions of the endoplasmic reticulum、第 82 回日本生化学会大会、2009/10、神戸
 4. 青木健洋、市村セラ、多賀谷光男、小胞体に局在する Neuroblastoma Amplified Gene タンパク質の役割、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008/12、神戸
 5. 土性梨香、植田晃大、多賀谷光男、積み荷受容体である p23 は小胞体 t-SNARE である BNIP1 と相互作用する、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008/12、神戸
 6. Itoh, A., Takai, S., Wakana, Y., and Tagaya, M. Bap31 is an itinerant protein that moves between the

peripheral ER and a juxtannuclear compartment related to ER-associated degradation. The Golgi Meeting: Membrane trafficking in global cellular responses, 2008/9, Pavia, Italy

7. Aoki, T., Ichimura, S., Shinkawa, S., Isobe, T., and Tagaya, M. NAG is a new component of the syntaxin 18 complex, which links between the ER-SNARE p31 and RINT-1/ZW10. The Golgi Meeting: Membrane trafficking in global cellular responses, 2008/9, Pavia, Italy

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lmc-b-6/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多賀谷 光男

(TAGAYA MITSUO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

(2) 研究分担者

原田 彰宏

(HARADA AKIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

有光なぎさ

(ARIMITSU NAGISA)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：40408688

(3) 連携研究者