

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770099

研究課題名（和文） 膜小管を使った細胞内輸送の分子機構

研究課題名（英文） molecular mechanisms of membrane traffic with lipid tubules

研究代表者

吉田 祐美（YOSHIDA YUMI）

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員

研究者番号：10452096

研究成果の概要（和文）：分泌型タンパク質は、合成されたのち細胞内輸送システムによって細胞の外へと運搬される。輸送システムにおいて積み荷は主に小胞体から形成される輸送小胞に詰め込まれた形で運ばれることがよく知られているが、そのほかに小管状の構造物が小胞体近傍にしばしば観察されており、小管を介した輸送も示唆されていた。本研究では小管の形成を細胞内で観察し、YIF1A, YIPF5などの膜タンパク質が小管に局在していることを示した。

研究成果の概要（英文）：Secretory protein is transported outside the cell by membrane transport system after it is synthesized. The cargo proteins are transported from the endoplasmic reticulum to the cellular membrane by using vesicles budded from ER membrane. Membrane tubules are sometimes observed around ER membrane and Golgi apparatus. In this study, the membrane tubules were generated in living cells and observed the localization of YIF1A and YIPF5, which implicated in the membrane traffic.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：膜輸送

1. 研究開始当初の背景

細胞内膜系間の物流システムとして小胞を介した輸送メカニズムについて詳細に解析が進められており、輸送小胞が形成されるための引き金となるシグナル、被覆タンパク質群の会合や引き続いての小胞形成、被覆タンパク質の解離や輸送などそれぞれの過程

および各過程における調節の分子機序が次第に同定されつつあった。

一方で、細胞内膜系から伸展するチューブ状の構造が以前からさまざまな内膜系（細胞内小器官）においてしばしば報告されており、小胞輸送と同様に内膜系間の物質輸送に関

わることが想定されていた。

しかしながら、いずれの細胞内小器官においても、定常状態ではあまりチューブの形成がみられないことから、細胞内膜系からのチューブがいつどのように形成されるか、またその機能など不明な点が多く、詳細な解析が待たれていた。

2. 研究の目的

細胞内の物質輸送の仕組みについて新たな視点を得るために、これまで不明瞭だったチューブによる輸送について関連分子の機能解析を通じて分子メカニズムの解明を目指す。

このために下記の点に着目して研究を進める。

(1) 生細胞内でのチューブ形成を観察しやすいモデル系を作成する。チューブの形成は複数の細胞内小器官で観察されているが、特に細胞内輸送の中心であるゴルジ体近傍においてはゴルジ体の離散を伴ったダイナミックな膜構造の変化が見られる。また、ゴルジ体-小胞体間の初期分泌経路においては、輸送をトレースするための材料が整っており、小管の形成の有無による輸送の影響が評価しやすいことからモデル系を設計するのに適切であると予想した。

そこで、初期分泌経路においてしばしば観察されるゴルジ体から伸展するチューブ状の構造体について、人工的に作り出し視覚的に捉えることを目指す。

(2) チューブ上へ局在化するタンパク質を探索し、細胞内物質輸送への影響を明らかにする。

(3) 細胞内輸送に関わることが知られている各種タンパク質および細胞内小器官のマーカータンパク質について、チューブ構造への局在化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内膜系からのチューブ形成モデルとして HeLa 細胞のゴルジ体膜を用い、薬剤処理によりゴルジ体からのチューブ形成をおこさせる。

低分子量 G タンパク質 Arf1 の関与がこれまでに示唆されているため、この活性に影響を及ぼす薬剤を用いてチューブを形成するか観察し検討した。

(2) 細胞内輸送に関連が示唆されるタンパク質分子であり、かつ膜タンパク質である YIF1A, YIPF5 に着目し、機能解析を通じて細胞内膜系からのチューブとの関わりを観察した。

具体的には、上記の方法により形成されたチューブへの局在および、細胞から siRNA 処理によりノックダウンした際の細胞内輸送への関与をプローブを用いて解析した。

(3) 上記の方法により細胞内にチューブ構造を形成させ、細胞内輸送に関わることが知られている各種タンパク質および細胞内小器官のマーカータンパク質がチューブ上に局在するか観察する。

4. 研究成果

(1) 人工的にゴルジ体近傍において生細胞内で膜チューブの形成を観察できる条件について検討した。定常状態の細胞においてチューブ状の構造物はほとんど観察されないため、生細胞に薬剤処理を施すことでより観察に適した状態を作り出した。

Arf GTPase の阻害という観点から brefeldinA、フッ化アルミニウム等の薬剤処理を行った。また、低温処理によって輸送を変化させ観察した。

それぞれの状態で細胞を観察した結果、適当な時間これらの条件下培養することで、ゴルジ体を中心とした激しいチューブ構造の形成が見られた。いずれの条件もゴルジ体-小胞体間の輸送に働きかけることが知られており、正常な輸送機構が妨げられた結果代替経路が促進されているものと考えられる。従ってこの条件下においてチューブ上に集積する分子について探索し機能を検討することで本研究の目的達成につながると考え、下記の通り小胞輸送に関わるタンパク質分子に着目して解析を進めた。

(2) 小胞輸送と並列して、あるいは代替経路として膜によるチューブ構造が形成されるということを想定したため、チューブ上には行き先となる膜への融合装置が膜タンパク質として埋め込まれていることが予想される。

そこで、輸送膜間の融合に機能する Rab GTPase に着目し、その結合タンパク質として酵母においてクローニングされた YIPF5, YIF1A の局在および機能解析を前述の条件下で行った。

①まず、両タンパク質の抗体を作成し、細胞内局在を解析した。

各種細胞内小器官のマーカータンパク質と共染色により局在を比較したところ、両タンパク質分子は定常状態においては小胞体-小胞体/ゴルジ体中間区画-ゴルジ体、特にゴルジ体においてはシス側にわたって広く顆粒状に分布した。

引き続き、小胞体-ゴルジ体間の輸送をさまざまな試薬で阻害して両タンパク質の局在を解析したところ、輸送小胞あるいはゴルジ中間区画に集まっている様子が観察されたことから、両者は小胞体-ゴルジ体間を小胞輸送により周回するタンパク質であることが分かった。

また、細胞を回収し、密度勾配遠心法にて各細胞内小器官を分画した結果、上記の細胞染色の結果と同様に、YIPF5, YIF1A が小胞体からゴルジ体にかけて分布するタンパク質であることが示された。

すなわち、YIPF5, YIF1A はいずれも定常状態において初期分泌経路に局在しており、それぞれの区画間を小胞輸送されるタンパク質であるという点から、本研究を進めるにあたって良いマーカー分子になると考えられる。

②酵母において両タンパク質が複合体を形成していることが示唆されており、互いの相互作用を免疫沈降により検討した。ジギトニンで可溶化した細胞溶解液中でYIPF5, YIF1A が互いに相互作用をしているという結果が得られた。また、同様の結果は非変性条件下の電気泳動においても確認でき、複数の会合状態をとることが示唆された。

③YIPF5, YIF1A は、酵母において Rab1 の結合タンパク質としてクローニングされた Yip1A のヒトホモログで、輸送小胞膜どうしの融合に関わることが予想される。また、rab1 の小管膜上への局在が報告されていることから、両タンパク質のチューブへの局在を解析した。

Hela 細胞を用い、brefeldinA、フッ化アルミニウム、低温処理などを施すことでゴルジ体膜からのチューブ形成を引き起こし、YIPF5, YIF1A の局在を解析した。その結果、両タンパクはいずれもゴルジ体近傍に生じるチューブ構造にシスゴルジマーカーとともに局在した。

④YIPF5, YIF1A の細胞内輸送に対する影響を

調べるため、siRNA 処理をした。YIPF5, YIF1A の siRNA 処理を施した細胞における各細胞内小器官を観察したところ、ゴルジ体のリボン状構造が崩壊した。

ゴルジ体は細胞内輸送の中心であり様々な小器官との膜を介したやりとりを行っている。膜輸送のバランスが崩れることでゴルジ体の構造が崩壊するということが知られており、YIPF5, YIF1A がゴルジ体を中心とした膜輸送の過程に関与していることが示唆された。

⑤YIPF5, YIF1A の細胞内輸送に対する影響の詳細を検討するため、各種輸送の関連するマーカー分子の局在を YIPF5, YIF1A siRNA 処理細胞において調べた。

その結果、逆行性輸送およびゴルジ体層板間の輸送小胞被覆タンパク質である beta-COP の局在が細胞質に分布するようになり、逆行性の輸送に貢献することが示唆された。また、細胞を界面活性剤で処理することでセミインタクト細胞とし、細胞質成分などの添加により細胞内輸送を再現する実験系において、YIP1A が特にゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関わっていること示す結果が得られた。

本研究において、細胞内においてゴルジ体近傍から生じるチューブ構造を可視化し、局在するタンパク質について機能解析を行った。チューブ構造に着目して解析を進めるという特殊な立ち位置で研究を展開しており、本研究の結果は国際誌に報告した。

ただし、当初目的としていたチューブ構造の形成に関して本研究では解析が不十分であるため、今後、YIPF5, YIF1A の機能について引き続き詳細な解析を進めていくとともに、ゴルジ膜からチューブ構造が形成される様子を時系列を追って解析することで、より具体的な成果が得られる物と考えられる。今後の展望としては、実際に積み荷がチューブを経由して次地点へと移動するかなど、生理的な積み荷やその利用される契機について検証を進めていくことで、現在小胞を用いた輸送システムが主流と言われている中で全く別の視点からの解析が可能になると期待される。

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 2 件）

①F Kano, S Yamauchi, Y Yoshida ほか 4 名、
Yip1A regulates the COPI-independent
retrograde transport from the Golgi
complex to the ER、査読有り、122 巻、2009
年、2218-2227

②Y Yoshida, K Suzuki, A Yamamoto ほか 12
名、*YIPF5* and *YIF1A* recycle between the ER
and the Golgi apparatus and are involved
in the maintenance of the Golgi structure、
査読有り、314 巻、2008 年、3427-3443

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 祐美 (YOSHIDA YUMI)

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員

研究者番号：10452096

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：