

機関番号：12601
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20770151
 研究課題名 (和文) ゴルジ体→小胞体輸送セミインタクト細胞アッセイを用いた Yip1A の作用機序の解明
 研究課題名 (英文) Study of the function of Yip1A in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport by using semi-intact cell assay
 研究代表者
 加納 ふみ (KANO FUMI)
 東京大学・大学院総合文化研究科・助教
 研究者番号：10361594

研究成果の概要 (和文)：形質膜を透過性にした細胞アッセイシステム「セミインタクト細胞」を用いて、膜蛋白質 Yip1A の小胞輸送に関わる機能解析を行った。Yip1A は細胞内小器官間に起こる蛋白質輸送 (詳しくはゴルジ体→小胞体の輸送) を制御することを明らかにして論文として発表し、さらに Yip1A 結合蛋白質を同定することにより未だコンポーネントが明らかになっていないゴルジ体→小胞体輸送に関わる蛋白質群の抽出に成功した。

研究成果の概要 (英文)：We studied the function of Yip1A in the intracellular vesicular transport by establishing the assay for the transports in permeabilized cell “semi-intact cell” system. We found that Yip1A regulated the retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER), and the results were published in the Journal of Cell Science. We also identified the Yip1A interacting proteins, which would be the possible regulatory components for the Golgi-to-ER transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞輸送、セミインタクト細胞、ゴルジ体、小胞体、再構成、Yip1A、逆行輸送

1. 研究開始当初の背景

細胞内は脂質二重層からなるオルガネラによってコンパートメント化されており、各オルガネラはその機能に適したタンパク質・脂質組成や独自の形態を保っている。その一方で、小胞体、ゴルジ体といった分泌経路に位置するオルガネラ同士は小胞輸送によってつながっているため、タンパク質や脂質を交換しつつも、そのオルガネラ

特有のタンパク質・脂質組成や形態を維持して行かなくてはならない。そこには精妙な制御機構があり、輸送のバランスとオルガネラ形態は深くリンクしていると考えられている。その顕著な例が、ゴルジ体の形態変化である。ゴルジ体は小胞体で作られて運ばれてきた分泌タンパク質や膜蛋白質の修飾を行い、さらに目的地へと送り出す分泌経路の中間に位置するオルガネラであ

る。小胞体とは小胞体→ゴルジ体の方向の順行輸送とゴルジ体→小胞体の方向の逆行輸送によって結ばれている。小胞体からの輸送をドミナントネガティブ型 Sar1 タンパク質発現により COP II 小胞出芽を阻害すると、順行輸送が停止する一方で逆行輸送は継続する。この輸送の崩れにより、普段核の近傍に集まって層板構造を形成しているゴルジ体の構成物質が小胞体へと移行し、ゴルジ体は消失することになる。また、ゴルジ体は細胞分裂時には小胞化および小胞体への吸収という形態変化が観察されるが、これも輸送とカップルしている可能性が示唆されている。

申請者は長年形質膜を透過性にしたセミインタクト細胞を用いて、オルガネラの形態変化機構を研究してきた。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌毒素ストレプトリシン O (SLO) を細胞膜に作用させることにより直径 30nm の穴を形成させ、細胞内外が透過性になった細胞のことである。オルガネラや細胞骨格はインタクトに保持したまま、細胞質を流出させることができる。ここに（細胞を一個の試験管に見立てて）新たに外部より分画した細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベント（細胞内膜動過程、タンパク質間相互作用、タンパク質のターゲティングなど）を再構成できれば、その中で生起する生理現象を生物物理的、生化学的に解析できる。例えば、細胞に細胞分裂期に同調させた細胞から調製した細胞質（M 期細胞質）を導入することで、セミインタクト細胞内の環境を擬似的に「細胞分裂期の細胞内環境」にすることができる。今までに、細胞周期依存的に起こるゴルジ体の分解、ER exit sites（小胞体膜上にある COP II 小胞が出芽する膜ドメイン）の分散、小胞体の部分的切断と再融合、またブレフェルジン A によるゴルジ体のチューブ化と小胞体への融合過程を再構成してその分子機構の解明を行い、論文として発表している（JCB 1 報、MBC 2 報、Genes to Cells 2 報）。

また、現在までに申請者は、セミインタクト細胞を用いた小胞体→ゴルジ体間順行・逆行輸送の再構成系の確立に成功している。具体的には、まずゴルジ体膜蛋白質ガラクトシルトランスフェラーゼの 1-60 アミノ酸残基と GFP (green fluorescence protein) の融合タンパク質

GT-GFP を恒常的に発現する CHO (Chinese hamster ovary) 細胞株 CHO-GT を樹立する。GT-GFP は小胞体とゴルジ体間をリクルートし、顕微鏡下では主にゴルジ体、薄く小胞体はその蛍光により観察される。CHO-GT 細胞にストレプトリシン O を作用させセミインタクトにし、そこへ L5178Y 細胞より調製した細胞質と ATP 再生系を添加する。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ゴルジ体（あるいは小胞体）領域のみに強出力のレーザーを照射することにより、ゴルジ体（あるいは小胞体）領域に局在する GT-GFP の蛍光を消失（ブリーチ）させる。そのままインキュベーションを続けると、小胞体（あるいはゴルジ体）から蛍光を失っていない GT-GFP が小胞輸送によってゴルジ体（あるいは小胞体）領域へと運ばれてくる。その蛍光の回復の割合を求め、小胞体-ゴルジ体間の順行（あるいは逆行）輸送量として表すことが出来る。その再構成系を用いてゴルジ体→小胞体逆行輸送に必要な因子を探索した結果、興味深いことに ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) に局在する膜蛋白質 Yip1A が関与する可能性を見出した。さらに Yip1A を手がかりとして、酵母ツーハイブリッド法と逆行輸送過程の再構成系を駆使し、ゴルジ体→小胞体逆行輸送制御機構を明らかにする研究を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究ではこれまでのセミインタクト細胞アッセイの知見やノウハウの蓄積を基にしたゴルジ体胞体間小胞輸送過程の再構成系を樹立し、最近申請者がゴルジ体→小胞体輸送に関わる可能性があることを発見した ERGIC 局在膜蛋白質 Yip1A の機能を検定することを目的とする。具体的には、セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間小胞輸送再構成系により、Yip1A の輸送への関与を検定する。さらに Yip1A をベイトとした酵母ツーハイブリッド法 (Y2H 法) あるいは分割ユビキチン法 (SU 法) またはプルダウン法による Yip1A 結合タンパク質の同定を遂行し、確立した再構成系を用いた Yip1A 結合タンパク質の逆行輸送への関与の証明とその分子メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) セミインタクト細胞を用いたゴルジ体-小胞体間小胞輸送過程の再構成と Yip1A 蛋白質の輸送への関与の検討: 我々は既に小胞体-ゴルジ体間をリクルートするプローブ GT-GFP を恒常的に発現する細胞株 CHO-GT を樹立している。形質膜に穴を開けたセミインタクト CHO-GT 細胞に細胞質を加え、上記アッセイを行うことにより、ゴルジ体-小胞体間小胞輸送の再構成を行う。また、Yip1A の細胞質領域のリコンビナント蛋白質あるいは抗体を細胞質とともに導入することにより、ゴルジ体-小胞体間小胞輸送への効果を検討する。

(2) Yip1A 結合タンパク質の同定: マウス Yip1A の細胞質領域 (1-109 アミノ酸残基) をベイトにして酵母ツーハイブリッド法を、Yip1A の全長をベイトにして分割ユビキチン法を行い、Yip1A の細胞質領域あるいは全長に相互作用するタンパク質をマウス脳ライブラリーよりスクリーニングする。酵母ツーハイブリッド法、分割ユビキチン法ともに、当研究室でスクリーニングの実績があるため、蓄積されたノウハウを当申請研究に生かすことが出来る。

また、平行して Yip1A 細胞質領域の GST 融合リコンビナントタンパク質 GST-Yip1A を大腸菌を用いて作成し、プルダウン法による Yip1A 結合蛋白質の同定も進める。具体的には、GST-Yip1A をマウス肝臓細胞質とインキュベーション後に、グルタチオンビーズで GST-Yip1A およびその結合蛋白質群を回収する。SDS-PAGE 後クーマシー染色を行い、コントロールの GST でインキュベーションしたサンプルには存在せず GST-Yip1A のインキュベーションで特異的に現れる蛋白質のバンドを切り出し、MALDI-TOFF (共通施設にあり利用可) により同定する。Yip1A 細胞質領域あるいは全長に結合する候補タンパク質群を取得後、哺乳動物細胞内での Yip1A との結合を免疫沈降法により確認する。

(3) 小胞体-ゴルジ体間小胞輸送過程の再構成系を用いた Yip1A 結合タンパク質の逆行輸送への関与の証明とその分子メカニズムの解明

小胞体-ゴルジ体間小胞輸送アッセイを用いて、Yip1A 結合タンパク質の小胞輸送への関与を明らかにする。具体的な方法として

① Yip1A 結合タンパク質が細胞質タンパク質の場合: 候補タンパク質に対する抗体を用いて、セミインタクト細胞アッセイに添加する細胞質から当該タンパク質を免疫除去する。抗体は市販の抗体を使用する予

定である。除去した細胞質を用いて小胞輸送アッセイを行い、輸送への関与を検定する。さらに Yip1A と当該タンパク質の相互作用が輸送に重要であるかどうかを、Yip1A 結合領域のみのリコンビナントタンパク質を用いて検討する。つまり、平成 20 年度の④で同定した Yip1A 結合領域のみのリコンビナントタンパク質を大腸菌で作成・精製し、細胞質と共にセミインタクト細胞内に添加する。すると、加えたりコンビナントタンパク質は Yip1A に当該タンパク質に対して競合的に結合すると考えられる。この状態で輸送アッセイを行って輸送が阻害されるかどうかを確認することにより、Yip1A と当該タンパク質の相互作用の重要性を明らかにする。

② Yip1A 結合タンパク質が膜蛋白質の場合: RNAi 法により当該タンパク質を HeLa 細胞から除去する。除去された細胞に GT-GFP をコードするプラスミドをトランスフェクションし、上記に記した輸送アッセイを行う。また同時に当該タンパク質を RNAi により除去した細胞に蛍光標識されたシガトキシン (Stx) の B サブユニットを取り込ませ、その形質膜→ゴルジ体→小胞体の輸送キネティクスをコントロール細胞と比較する。精製・蛍光標識 StxB サブユニットの HeLa 細胞への取り込み、およびその輸送キネティクスの条件は、既に検討済みである。

4. 研究成果

セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間小胞輸送過程の再構成系を樹立した。特に、ゴルジ体→小胞体逆行輸送経路は、COPI 小胞依存的経路と非依存的経路が存在することが知られているが、本研究ではその 2 種類の経路それぞれを再構成することが出来た。COPI 非依存的なゴルジ体→小胞体逆行輸送経路は上記方法で述べたとおり GT-GFP をプローブとしているが、COPI 依存的経路は GFP 標識した ERGIC53 蛋白質をプローブとして用いることで再構成に成功した。構築した小胞体-ゴルジ体間小胞輸送アッセイを細胞質とともに Yip1A の細胞質領域のリコンビナント蛋白質を導入した条件下で行った結果、GST-Yip1A は小胞体→ゴルジ体順行輸送及び COPI 依存的なゴルジ体→小胞体逆行輸送過程は阻害しないが、COPI 非依存的なゴルジ体→小胞体逆行輸送を阻害することが明らかになった。更に COPI 非依存的経路に関与することが知られている Rab6 のゴルジ体へのターゲティングが Yip1A ノックダウン細胞で

は減少していることを見いだした。Rab6 は small GTPase Rab ファミリーに属し、GTP が結合した活性化型の時にオルガネラ膜に associate し分子スイッチとして機能することが知られている。よって、Yip1A は Rab6 のゴルジ体膜結合を制御することにより、COPI 非依存的なゴルジ体→小胞体逆行輸送に関与すると考えられる。以上の結果をまとめ、Journal of Cell Science 誌に投稿し受理された。

次に我々は Yip1A 結合蛋白質を同定することにより、今まで詳細が明らかにされていない COPI 非依存的なゴルジ体→小胞体逆行輸送過程の制御コンポーネントの解明を試みた。Yip1A の結合蛋白質の同定は研究計画で述べたとおり、①酵母ツーハイブリッド法 (Y2H 法) および分割ユビキチン法 (SU 法)、あるいは②GST-Yip1A を用いたプルダウン法の 2 種を行った。まず①Y2H 法および SU 法においては、バックグラウンドの高さなど様々な問題があったものの、SU 法により Yip1A 結合蛋白質の一つとして GRASP55 を同定した。GRASP55 はメディアルゴルジ層板に局在する膜表面性タンパク質で、ゴルジ体層板を近づけさせる (スタックさせる) 機能を持つことが報告されている。Yip1A ノックダウン細胞において、GRASP55 のメディアルゴルジ体への局在は影響がなく、かつゴルジ体そのものの形態も明らかな変化が見いだされなかったことから、Yip1A が GRASP55 への機能を制御する可能性は低いと考えられる。また GRASP55 ノックダウンによる小胞体-ゴルジ体間小胞輸送の阻害も検出されず、Yip1A が制御するゴルジ体→小胞体逆行輸送過程の GRASP55 の関与も明らかにはなっていない。

②GST-Yip1A の細胞質領域のリコンビナント蛋白質を用いたプルダウン法では、GST-Yip1A 特異的に結合する 2 つのバンドを見だし、MALDI-TOFF によりそれらが methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (Mthfd1), Formiminotransferase Cyclodeaminase (FTCD) であることを同定した。Mthfd1 および FTCD はともに葉酸代謝に関わるタンパク質であり、Yip1A の代謝への関与という意外な機能を示唆するものであるが、現在のところそれを指し示すデータは得られていない。また Mthfd1 および FTCD の小胞輸送過程への関与についても現在のところネガティブな結果しか得られておらず、Mthfd1 および FTCD がゴルジ体→小胞体逆行輸送過程に機能するとは言えない状況である。

以上の研究は、小胞体-ゴルジ体間小胞輸送

の再構成系の確立、特にゴルジ体→小胞体逆行輸送の再構成系を樹立したことに大きな意義があると考えられる。ゴルジ体→小胞体逆行輸送の再構成系は酵母においては確立されているものの、哺乳動物細胞においては本研究で初めて構築されたものである。ゴルジ体は酵母では細胞質にいくつかの固まりとして分散して存在するが、哺乳動物細胞においては核の一極に集まって一つの構造体を形成している。よって哺乳動物細胞におけるゴルジ体の役割やその制御メカニズムは酵母のものとは異なる点があると考えられており、本研究における哺乳動物細胞での輸送アッセイの構築は、哺乳動物細胞特有の分子機構を探索する上で重要な基盤技術になると考えられる。本アッセイで我々は Yip1A という機能未知のタンパク質が COPI 非依存的逆行輸送過程に関与することを見いだしたが、その結合タンパク質の同定による逆行輸送制御コンポーネントの解明は現在のところ狙い通りに進めることは出来なかった。今後はこれら Yip1A 結合タンパク質の小胞輸送過程への機能や、逆に Yip1A 結合タンパク質の機能への Yip1A の関与をより詳細に (例えば輸送カーゴタンパク質の選択性の有無や、代謝産物の定量解析など) 解析する予定である。

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 6 件)

① Kano F, Arai T, Matsuto M, Hayashi H, Sato M, Murata M. Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis. *Biochim Biophys Acta.-Mol. Cell Res.* 1813, 784-801, 2011

② Watanabe-Takahashi M, Sato T, Dohi T, Noguchi N, Kano F, Murata M, Hamabata T, Natori Y, Nishikawa K. An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin. *Infect Immun*, 78, 178-183, 2010

③ Adachi A, Kano F, Tsuboi T, Fujita M, Maeda Y, Murata M. Golgi-associated GSK3beta regulates the sorting process of post-Golgi membrane trafficking. *J. Cell Sci.*, 123, 3215-3225, 2010.

④ Adachi A, Kano F, Saïdo TC, Murata M

Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. *Genes to Cells*, 14, 355-369, 2009

⑤ Kano, F., Yamauchi, S., Yoshida, Y., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Nakamura, N., Murata, M. Yip1A regulates the retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 122, 2218-2227, 2009

⑥ Morikawa, R.K. , Aoki, J., Kano, F., Murata, M. , Yamamoto, A. , Tsujimoto, M. , Arai, H. Intracellular Phospholipase A1 iPLA1(gamma) is a Novel Factor Involved in COPI- and Rab6-Independent Retrograde Transport between the ER and the Golgi Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 26620-26630, 2009

[学会発表] (計 8 件)

① F. Kano, T. Arai, M. Matsuto, M. Murata. p38-dependent loss of phosphatidylinositol-3-phosphate at endosomes affects the retrograde transport of cholera toxin from cell surface to the Golgi BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010.12.8, 神戸ポートアイランド.

② 田口由起, 加納ふみ, 村田昌之. Molecular mechanisms for the targeting of Yip1A to ER-Golgi intermediate compartment BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010.12.7, 神戸ポートアイランド.

③ 加納ふみ, 荒井珠貴, 松戸真理子, 村田昌之. セミインタクト細胞リシール法を用いたシグナル伝達経路解析システムの構築. 細胞を創る研究会 3.0, 2010.11.12, 先端科学技術研究センター.

④ 松戸真理子, 加納ふみ, 荒井珠貴, 村田昌之. セミインタクト細胞を用いた Rab6A のゴルジ体へのターゲティングの再構成細胞を創る研究会 3.0, 2010.11.12, 先端科学技術研究センター.

⑤ F. Kano, T. Arai, M. Matsuto, M. Murata Establishment of semi-intact cell system and application of its resealing technique: a study of membrane dynamics, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010.9.21, 東北大学川内キャンパス.

⑥ 加納ふみ, 村田昌之. セミインタクト細胞を用いたオルガネラダイナミクスの分子機構解明 日本薬学会第 130 年会 2010.3.29 岡山大学 (招待講演)

⑦ 加納ふみ, Mechanistic Insights into Membrane Dynamics Using Semi-Intact Cell System, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009.10.1, 徳島文理大学 (招待講演)

⑧ 加納ふみ, 生命現象の可視化解析ツールとしてのセミインタクト細胞系, 日本化学会 第 3 回関東支部大会, 2009.9.1, 早稲田大学 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://muratalab.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 ふみ (KANO FUMI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 10361594

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: