

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580386

研究課題名（和文） 新たなプローブを用いたゴルジ体-小胞体間輸送の解析

研究課題名（英文） The Analysis of the retrograde pathway from the Golgi to the ER by using newly developed probe.

研究代表者

橋本 仁志 (HASHIMOTO HITOSHI)

福島県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：50372826

研究成果の概要（和文）：細胞の小胞体で新たに合成された分泌タンパク質は、正常なものを選び出して、小胞体からゴルジ体へと運ばれていく。しかし、ゴルジ体で異常が検知された場合は逆行輸送経路を用いて小胞体へと運び戻される。この過程を顕微鏡下でリアルタイムで観察することができる新しいシステムを開発した。さらにこのシステムを利用して、この逆行輸送経路を制御する一連のタンパク質を同定し、その仕組みの解明に成功した。

研究成果の概要（英文）：Secretory proteins are synthesized on the endoplasmic reticulum membranes. Only properly folded proteins can be packed into transport vesicles and transported to the Golgi apparatus. When the proteins are recognized as mal-folded proteins, they are captured and brought back to the ER via so-called retrograde pathways. In this study, we developed a new system by which you can observe and record the movement on this retrograde pathways in real time. And by using this system, we identified a series of proteins that control the retrograde pathways and revealed one aspect of this very complexed transport mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

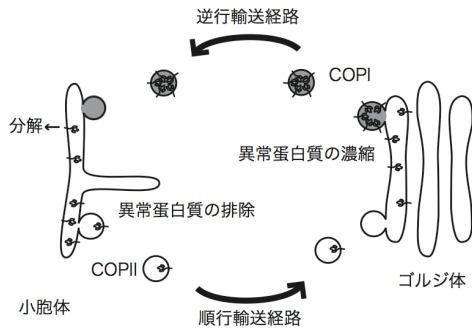
科研費の分科・細目：境界農学・応用細胞分生物学

キーワード：オルガネラ工学

1. 研究開始当初の背景

小胞体で合成された分泌タンパク質、膜タンパク質はその機能すべき場所に正確に輸送される必要がある。またこの際、まだ的確にフォールディングされていなかったり変性してしまった異常な構造をしたタンパク質は、小胞体およびゴルジ体といった分泌の初期過程において取り除かれなければならない

い。このような異常タンパク質は小胞体において蓄積すると小胞体外への排出機構を用いて細胞質へと移送された後、プロテアソームを用いて分解される。異常タンパク質を認識および排出する装置は小胞体に存在するため、その選別機構は小胞体からタンパク質を運びだすために必要な COPII というコートタンパク質を用いるステップと、ゴルジ体



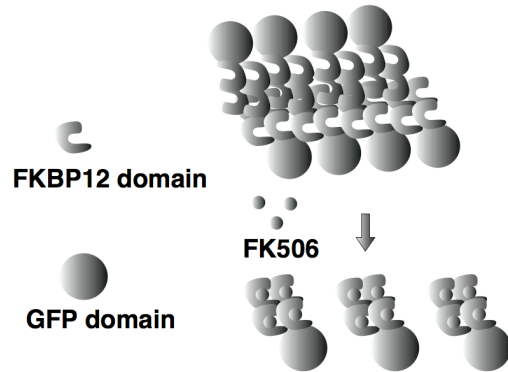
からタンパク質を小胞体に戻すために必要な COPI というコートタンパク質を用いるステップの 2ヶ所に存在していると考えられる。つまり COPII のステップでは異常タンパク質を排除する機構が、そして COPI のステップでは異常タンパク質を認識して取り込む機構があると想定される。

これまでの小胞輸送の研究では正常なタンパク質をいかに運び出すかということについて焦点を当てて研究されてきており、カーゴ受容体の存在など多くのことが明らかになっている。ところが、異常タンパク質の選別についてはまだまだわからないことが多い。特にゴルジ体から小胞体への逆行輸送の経路についてはほとんどわかっていないといつてよい。そこで本研究ではこの経路を中心に異常タンパク質の排除機構を解明することとした。

最初のステップである小胞体における積荷タンパク質の選別が重要であることは間違いないが、それだけでは充分でないことは、COPI 経路を阻害したときにゴルジ体のタンパク質だけでなく、小胞体のタンパク質や小胞体で分解される異常タンパク質が、核付近のゴルジ体様構造体に未選別で集積してくることから明らかである（未発表データ）。また小胞体において分解される異常タンパク質は一旦ゴルジ体へ運ばれることが分解のために必要であることがわかっている。これらの点からゴルジ体には積極的に異常タンパク質を小胞体へと送り返す機構が存在すると考えられる。

一方で筆者は、ゴルジ体のタンパク質を薬剤を用いて強制的に小胞体へと送り返すと、異常タンパク質の分解が促進されることを発見した（筆者未発表データ）。これは異常タンパク質が小胞体から出ることができないために長く滞在することになり分解が早くなるという説明と、通常ゴルジ体に存在する分解に関与する機構が小胞体に移動することにより分解がより効率的に行われるという説明の 2つが考えられる。どちらの場合でも細胞は異常タンパク質をすぐに分解するのではなく、シャペロンなどの助けを借り

て正常にフォールディングするまである程度の時間待つためのシステムを備えていると考えられる。これらのことからゴルジ体からの逆行輸送経路の解明は異常タンパク質の細胞内での分解のスピードを制御する機構の理解につながる。



そこで筆者は FKBP12 という蛋白質と FK506 という低分子化合物の結合特性を利用した系を応用することを発案した。FKBP12 は FK504 が存在しないとオリゴマーを形成するが、FK506 を加えると直ちに解離する。この特性を用いて、本来分泌される蛋白質に FKBP12 を融合させた蛋白質を発現させると、FK506 を加えない条件下では巨大なオリゴマーの凝集体を形成し小胞体にとどまるが、FK506 を加えると直ちに解離して細胞外へと分泌されるようになる、という系が 2000 年に報告された [1]。我々は FKBP12 を小胞体とゴルジ体の間を行き来する蛋白質に融合させることにより、FK506 を用いてその局在と輸送を制御することができると思う。

2. 研究の目的

逆行輸送そのものはその存在は証明されており、それに関わるであろう因子もいくつか同定されている。そこで申請者の研究は特に次のような具体的な目標を設定した。

(1) 逆行輸送経路の視覚化および定量化

逆行輸送に関わる因子の解析のために、その経路そのものを何らかの方法で視覚化する必要がある。そのためのアッセイ法を開発する。また、そのアッセイ法を定量化するための手法を開発する。

(2) 異常タンパク質の逆行輸送経路の視覚化および定量化

異常タンパク質を積荷タンパク質として、(1) のアッセイを応用する。このことにより、逆行輸送系全体ではなく、異常タンパク質の動態を観察することができる。

(3) 逆行輸送における選別機構に関わる因子の同定

上記のアッセイを用いて実際にこれらの経路に関わる因子の同定を行う。

(4) 逆行輸送の因子を用いた異常蛋白質分解速度の制御

(3) により同定した因子がどのように異常タンパク質の分解と関わるのかをいくつかのアッセイ法により調べる。

つまりまず逆行輸送経路の観察方法を確立し、その効率を変化させる因子をピックアップする。その影響を一つずつ丁寧に調べることにより、それぞれの因子の逆行輸送における具体的な役割を同定する。限られた期間内に全てを明らかにすることは難しいため、逆行輸送経路を構成する蛋白質の相関関係をいくつか明らかにすることを当面の目標とする、

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

HeLa 細胞は DMEM+5%FCS で培養した。安定発現株の培養には puromycin および Blasticidin S を適量添加して用いた。AP21998 (ARIAD) を FM4 領域の凝集解離に用いた。

(2) プラスミドの構築

FM4-hGH を含む DNA 配列は ARIAD 社から供与いただいた pC4S1-FM4-FCS-hGH から PCR 法により増幅して用いた。発現のためのプラスミドに FM4-hGH および cfGFP2 または cfGFP2KDEL の配列をそれぞれ PCR 法により増幅し pCX4-pur にクローン化して用いた。GST 融合タンパク質の細胞内での発現には GST および Rab2 の変異体の配列を PCR 法により増幅して pCX4-pur にクローン化したプラスミドを用いた。タンパク質複合体の精製の際にはこのプラスミドを HeLa 細胞に組み込んだ安定発現株を作製して用いた。その他、Rab2GTP, GDP, TBC1D16-myc, TBC1D25-myc, TBC1D16 Δ N, TBC1D16 Δ C, GFP-Rab1, -Rab2, -Rab33B, -Rab6, -Rab43, -Rab30, 等を発現するためのプラスミドはそれぞれの配列を cDNA より PCR 法により増幅し、pCX4-pur プラスミドにクローン化して用いた。

(3) 顕微鏡観察

間接免疫蛍光染色は、細胞を 4% paraformaldehyde で 20 分間固定した後、0.1% の saponin PBS+Block Ace 溶液で permeabilize し、適切に希釈した 1 次抗体溶液と 30 分、その後 AlexaFluordyes の付加された 2 次抗体とインキュベートして行った。その後カバーガラスをマウンティング溶液

を用いてマウントし、コンフォーカル顕微鏡 LSM510 で観察を行った。

(4) タンパク質複合体の精製

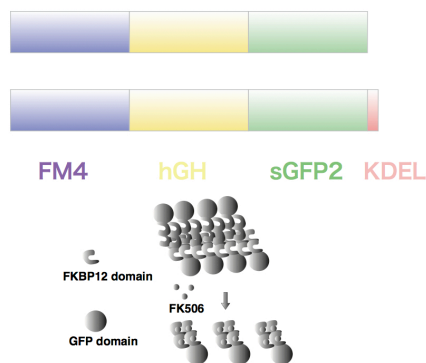
GST 融合タンパク質を発現している細胞を Binding buffer (20 mM Hepes(7.4), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100) に懸濁し 13K rpm, 15min で遠心した上清画分に Glutathion Beads を加えて 1 時間インキュベートした後、Binding buffer で 5 回洗浄し、Elution buffer (100 mM Tris, 10 mM Glutathion) で溶出した。

4. 研究成果

(1) 細胞内輸送を可視化するツールの作製と発現

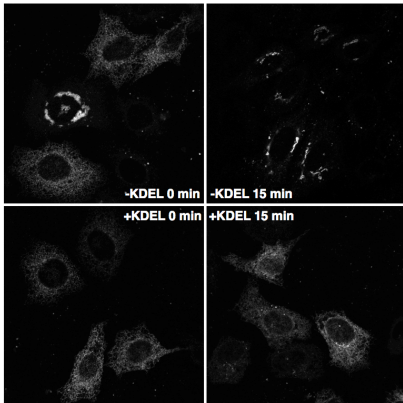
細胞内輸送をリアルタイムに観察するためには、輸送されるタンパク質を蛍光で標識する必要がある。また、時間経過に伴う輸送タンパク質の振る舞いを経時的に観察するために、ある時点までは小胞体に蓄積させておき、何らかのきっかけによりその輸送が開始されるような仕組みが必要である。そこで筆者は輸送されるタンパク質としてヒト成長ホルモン(hGH)を、また蛍光標識のために緑色蛍光蛋白質 sGFP2 を、また薬剤添加により凝集が解除されることが知られている FK506BP のある領域をタンデムに 4 つ並べた配列(FM4)を融合タンパク質として細胞内で発現させることを考えた。また、逆行輸送経路をたどるタンパク質の共通配列 KDEL シグナルを付加したのも同時に作製し、その振る舞いを比較することにした。

そこでこれらの DNA 断片をそれぞれ PCR 法により増幅し、クローニングした後、細胞内発現用ベクター pCX4-pur のマルチクローニングサイトに順に組み込み、細胞内でこれらのレポータータンパク質(蛍光プローブ)を発現させるためのプラスミドを作製した。



次にこれらのプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションすることで細胞内に導入し発現させた。するとどちらのプラスミドを導入した場合にも AP21998 という FK506 様の化合物を加えなかった場合、図にあるよう

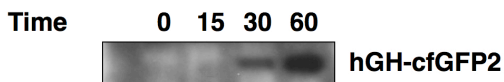
に小胞体内に蓄積した。このとき凝集体を形成しているために、小胞体の像をより詳しく観察すると細かいドット上の構造体が蓄積していることがわかる。



薬剤を添加すると1分後にはこの凝集体は解離し、ドット上の構造はほとんど見えなくなる。そして、KDELを持たないプローブは徐々に小胞体からゴルジ体へと輸送されるための小胞に移動を始め、その後5分後にはほぼ完全にゴルジ体への移行を完了する。さらに45分ほど経過するとほとんどのタンパク質が細胞外へと輸送され、ゴルジ体からは消失する。

一方で KDEL を付加した蛍光プローブは凝集体から解離した後、一旦輸送小胞に移動するがすぐに逆行輸送経路により小胞体へと送り返されるために、その局在は主に小胞体となる。

実際に輸送されてきたタンパク質を定量的に解析するため、培地中にあるプローブの量を生化学的に検出することを試みた。薬剤添加直前に培地を交換し、一定時間経過後に培地を回収し、その培地中に含まれる蛍光プローブタンパク質の量をウェスタンブロッティング法により観察した。



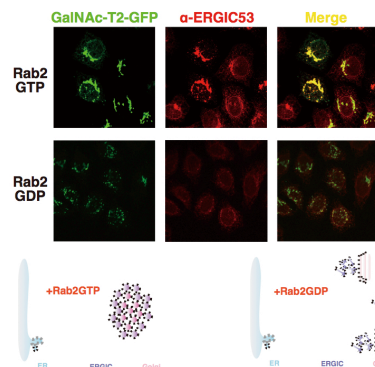
すると輸送開始後30分頃からタンパク質が細胞外に分泌され始め、60分後には大部分のプローブタンパク質が細胞外に輸送され分泌を完了することがわかった。

(2) 逆行輸送経路に関わる因子の同定

逆行輸送経路に関わる因子としては COPI と呼ばれるコートマーが知られているが、その他の因子や、その働きを制御する因子についてはほとんど知られていない。そこで本研究では逆行輸送経路に関わるであろうことは予測されているが、その具体的な機能についてほとんどわかっていない Rab2 を中心にして解析を進めることとした。

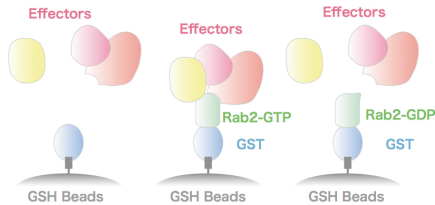
Rab2 は小胞体—ゴルジ体間に存在する GTP 結合タンパク質で小胞体—ゴルジ体間の小胞輸送に関わるとされている。そこで、その働きを知るために細胞内で活性化型および不活性化型の Rab2 を発現させ、ゴルジ体や ERGIC がどのように変化するかをまず蛍光顕微鏡を用いて調べた。すると活性化型の変異体を発現させた場合、ゴルジ体および ERGIC が細かな小胞を形成し、細胞内でほぼ同じような場所に局在するようになることがわかった。これはおそらく、逆行輸送のための小胞は形成されるものの、Rab2 が GTP 型に固定されているためにカーゴの選別などが適切に行われず、そのために逆行輸送装置も稼働せずに蓄積しているものと考えられる。同じようなフェノタイプが COPI 因子のノックダウンによっても観察されることから、やはり Rab2 は COPI の機能、つまり逆行輸送経路の制御に重要な役割を担っていると予想される。

一方で GDP 結合型、つまり不活性化型の Rab2 を細胞内で過剰に発現させた場合、ゴルジ体は断片化し、本来核近傍にあるものが ER Exit Site の周囲に蓄積することがわかった。通常は小胞体上で形成された輸送小胞は ER Exit Site から ERGIC およびゴルジ体の存在する領域へ、微小管およびモータータンパク質を用いて核近傍へと移動するが、この過程のどこかに Rab2 が関与しているものと考えられる。

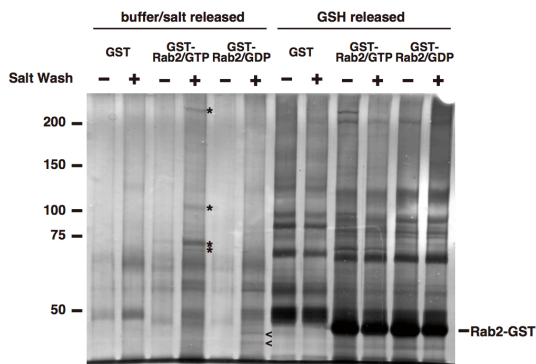


そこで次に、ではこの Rab2 がどのように逆行輸送経路を制御しているのかを分子レベルで調べるために、Rab2 と特異的に結合するタンパク質の探索を行うこととした。方法としては細胞内で GST タグの付いた Rab2GTP および Rab2GDP 結合型を発現、大量培養し、その破砕液から GST タグを利用して、Rab2 複合体の単離をすることとした。対照として、

GST 融合タンパク質を発現しない細胞、不活性型である Rab2GDP を発現している細胞を用い、Rab2GTP を発現している細胞でのみ結合してくるタンパク質の取得を目指した。



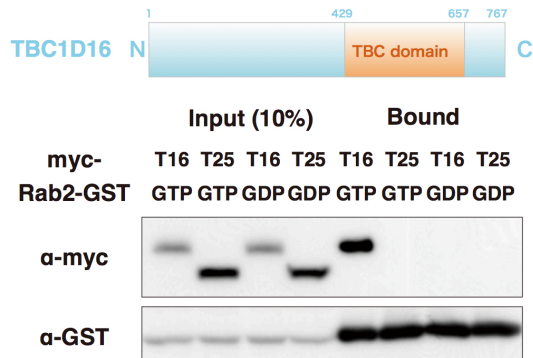
図が Rab2 の活性型に結合するタンパク質のバンドである。*でマークしたタンパク質が GTP 型のみ結合が見られたタンパク質であり、△が GDP 型のみ結合していたタンパク質である。そこでこれらのフラクションを質量分析により含まれているタンパク質の



同定を行った。

すると GTP 型のみ結合するタンパク質として Golgin-45 および TBC1D16 という二種類のタンパク質を同定することができた。

TBC1D16 というのは TBCdomain (tre-2/UPS6, BUB2, cdc16) を持つタンパク質ファミリーの一員で、RabGAP の一つであると考えられる。つまり、ある Rab タンパク質

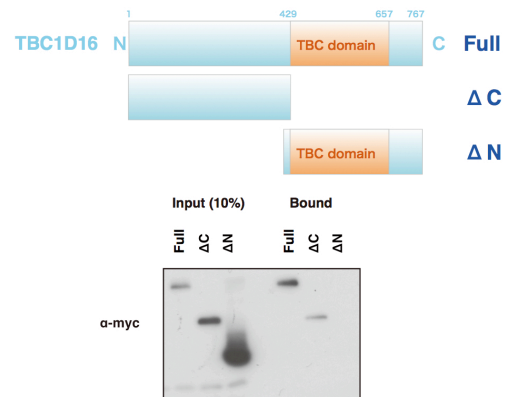


と結合してその GTP を加水分解することによって不活性型に変化させる活性を持つ。

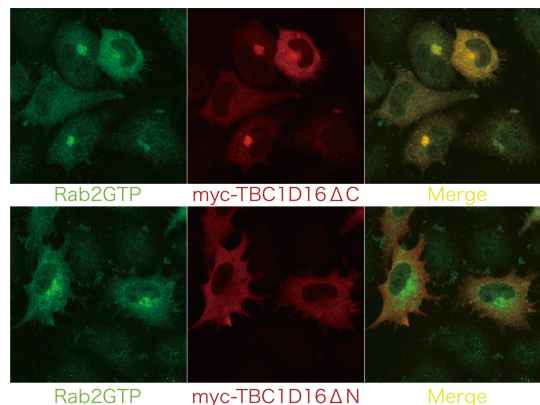
まず TBC1D が実際に Rab2 と特異的に結合するかどうかを HeLa 細胞内で発現させて単離してくるにより、確認した。

図に示したように、TBC1D16 は Rab2 の GTP 結合型にのみ結合した。また Rab2 は TBC1D25 とは結合しなかったことから、Rab2 と TBC1D16 との間の結合は非常に特異的であることが証明された。

TBC1D16 には C 末端側の TBC domain を含む領域と N 末端側の TBC domain を含まない領域がある。そこで Rab2 はこれらのうちのどちらの領域と結合するのかを先ほどと同様の方法を用いて調べた。すると驚いたことに TBC domain を含まない N 末端側の領域と結合することがわかり、Rab2 にとって TBC1D16 はエフェクタータンパク質であって、Rab2 の GAP そのものではないことが示唆された。

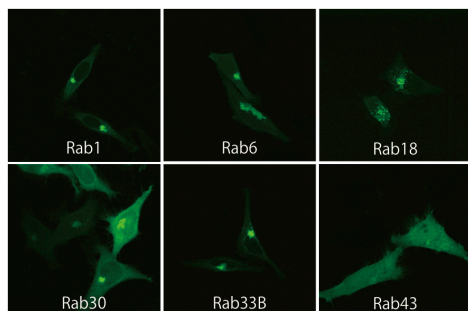


この結合をさらに確認するために、細胞内で二種のタンパク質を発現させて、その共存在を確認した。すると図のように、TBC1D16 の N 末端側の領域は GTP 型の Rab2 との共存在を示したが、C 末端側は常に細胞質に拡散しており、実際に細胞内でもこれら二つのタンパク質は結合することがわかった。



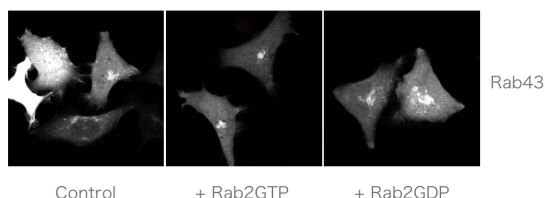
それでは、Rab2 はこの TBC1D16 という RabGAP を膜上に連れてくることにより、どの Rab の活性を制御しているのであろうか？これをしらべるためにゴルジ体に局在する Rab タンパク質を GFP で蛍光標識して発現させ、

そこに Rab2GTP と TBC1D16 を強制発現させた時の Rab の局在の変化を観察した。すると Rab30 と Rab43 の局在が Rab2 の発現により、より細胞質へと移行したことから、TBC1D16 はこれらの GAP として機能していて、強制的に発現されることによりこれらの Rab を不活



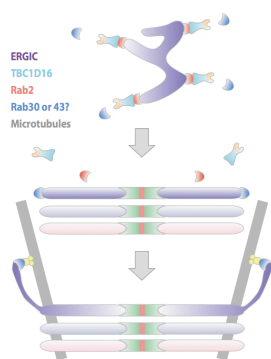
性型へと変換し、ゴルジ体の膜から解離させて細胞質へ移行させていると考えられる。

この仮説を裏付けるかのように、Rab2 の GDP 型を強制発現させた場合に Rab43 は活性化し、チューブ状の構造をゴルジ体から形成し、盛んに輸送を行う様子を観察することができた。このことからやはり、Rab2 は活性化されると、Rab43 や Rab30 といったタンパク質を TBC1D16 を結合することにより不活性化してその膜から遠ざけているが、一旦その役割を終え不活性化されると、Rab43 や Rab30 が活性化されることができるようになり次



のステップの輸送を開始するようになると考えられる。

以上の解析により細胞内のタンパク質輸送機構のうち特に小胞体ーゴルジ体間の輸送について、新たなタンパク質の関与が証明され、今後のさらなる解析により、詳細な機構が明らかになっていくと考えられる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[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

橋本 仁志 (HASHIOTO HITOSHI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50372826

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

和田 郁夫 (WADA IKUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40182969

初沢 清隆 (HATSUZAWA KIYOTAKA)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 20256655