

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293071

研究課題名(和文) SNAREタンパク質の品質管理、膜挿入、膜融合の統合的理解

研究課題名(英文) Integrated understanding of quality control, membrane insertion, and membrane fusion of SNARE proteins

研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA, TOSHIAKI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80359843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞輸送はホルモンや消化酵素の分泌、細胞増殖因子の取り込みなど種々の生命現象に極めて重要な役割を果たしている。全ての小胞輸送はSNAREタンパク質により規定されている。小胞におけるv-SNAREタンパク質とそのターゲット膜におけるt-SNAREタンパク質の量の違いにより、小胞融合速度が調節されている。私どもはSNAREタンパク質の膜挿入装置CAML複合体を発見している。そこで、膜挿入の調節機構を明らかにするために、CAMLに結合するタンパク質としてp47を発見した。さらに、SNAREモチーフを持たないSNAREタンパク質のひとつであるSec22Cの細胞内局在化機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Vesicle traffic plays important roles in various cellular events, such as exocytosis of hormone or digestive enzyme, and endocytosis of growth factor. SNARE proteins are essential for vesicle traffic. The amount of v-SNARE proteins on the vesicle and the amount of t-SNARE proteins on the target membrane regulate the speed of vesicle fusion. We have identified membrane insertion complex for SNARE proteins, CAML complex. To elucidate regulatory mechanism of membrane insertion of SNARE proteins, we identified p47 as a CAML-interacting protein. We also revealed subcellular localization mechanism of a SNARE protein lacking SNARE motif, Sec22c.

研究分野：医化学一般

キーワード：小胞輸送 SNAREタンパク質 品質管理 膜挿入 膜融合

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送は神経伝達物質の放出のみならず、ホルモンや消化酵素、血漿タンパクの分泌、ホルモンや細胞増殖因子の取り込み、細胞極性の形成など種々の生命現象に極めて重要な役割を果たしている。全ての小胞輸送は SNARE タンパク質により規定されている。SNARE タンパク質は小胞と細胞膜の融合を司るタンパク質ファミリーである。細胞内の分泌経路の種々のオルガネラに固有の分子種が存在しており、動物細胞では少なくとも36種類の存在が報告されている。小胞が運んでいる積み荷の違いによって、恒常的に融合が起こるもの、調節的に起こるものの二つに分けられている。また、積み荷の違いによって、小胞の融合速度が違うことが知られている。物流で一番重要なのは、宅急便に代表されるように迅速さであり、この速度の解明が重要である。

神経細胞が次の神経細胞に情報を伝えるシナプス伝達は、神経伝達物質の放出により行われている。神経伝達物質は、シナプス小胞が SNARE タンパク質の働きによりシナプス前膜へ融合することで放出される。シナプス小胞の膜融合反応は膜融合装置である3つの SNARE タンパク質により制御されている。シナプス小胞には v-SNARE である VAMP2 が存在し、前シナプス形質膜には t-SNARE であるシンタキシン-1 と SNAP-25 が存在する。VAMP2、シンタキシン-1、SNAP-25 が3者複合体・SNARE 複合体を形成し、膜融合反応が起こる。この SNARE 複合体の形成速度が膜融合反応の速度を決定する。私共は SNARE タンパク質を組み込んだ人工リポソームによる無細胞再構成実験系を開発した。SNARE タンパク質を組み込んだ人工リポソームのみの反応では、分オーダーと明らかに遅く、また Ca^{2+} に依存しなかった。そこで、組み込むタンパク質の量比や、他の因子などを検討した。その結果、他の因子などよりも、SNARE タンパク質のリポソームに組み込む量比の違いにより、融合速度が劇的に速くなることを見出した。これまで全てのシナプス小胞に等量の SNARE タンパク質が存在するように考えられていたが、実際は量比にそれぞれ違いがあり、融合する小胞、融合しない小胞などの種類があり、選別されていた。

2. 研究の目的

SNARE タンパク質は小胞輸送において必須の役割をしているが、SNARE タンパク質そのものも積み荷タンパク質として小胞輸送でシナプス前膜やシナプス小胞へと運ばれている。その膜輸送の開始点は、SNARE タンパク質の小胞体膜への埋め込みである。SNARE タンパク質など C 末端側に膜貫通領域をもつタンパク質は尾部アンカー型タンパク質とよばれ、トランスロコンを介さずに小胞体膜へ埋め込まれることが知られていたが、その分子実体やメカニズムはほとんど明らか

になっていなかった。尾部アンカー型タンパク質を小胞体膜に挿入する装置の探索を開始し、全く新しい膜挿入装置(二つの膜タンパク質と一つの可溶性タンパク質からなる装置、CAML 複合体)を発見した。この発見した膜挿入装置が、シナプス小胞上の SNARE タンパク質量を決め、融合速度を決めると考えられた。小胞体膜からは、小胞とターゲット膜の両方が形成される。すなわち、v-SNARE と t-SNARE の両方が小胞体膜に挿入され、それぞれの膜が分離される。しかし、1) どのようにして v-SNARE と t-SNARE の挿入される量がそれぞれ調節されるのか?、また2) どのようにして挿入された v-SNARE と t-SNARE が膜上で分離するのか?、全く不明である。このことは、私共が発見した膜挿入装置と協調して働く小胞体膜上に SNARE タンパク質の品質管理システムが存在していることを示している。培養細胞レベルの実験では、SNARE タンパク質の品質管理にともなう可逆的な反応や膜の構造変化を捉えられないため、本研究では、小胞体膜上での SNARE タンパク質の品質管理を再構成し、その分子メカニズムを明らかにする。そして、SNARE タンパク質の品質管理による小胞輸送、小胞融合反応を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の作成

GST または MBP を融合した CAML、WRB、p47、Sec22C 各種アイソフォーム、ARF4 野生型及び各種変異体を組み込んだ大腸菌発現プラスミドや組換えバキュロウイルスを作成し、組換えタンパク質を大腸菌や昆虫細胞で発現させ、gultathione sepharose レジンまたはアミロースレジンで精製した。

(2) 免疫染色による細胞内局在の検討

HeLa 細胞に HA タグをつけた p47 (HA-p47) をトランスフェクションし、抗 HA 抗体と小胞体マーカーである抗 PDI 抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して細胞内局在を検討した。同様に、HeLa 細胞に HA タグをつけた Sec22C の各アイソフォームをトランスフェクションし、抗 HA 抗体と小胞体マーカーである抗 PDI 抗体あるいはシスゴルジ網マーカーである抗 GM130 抗体を用いて蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して細胞内局在を検討した。

(3) 免疫共沈降による結合の検討

FLAG タグをつけた CAML (FLAG-CAML) および HA-p47 全長またはフラグメントを HEK293 細胞にトランスフェクションした。この細胞を 1% TritonX-100 を含むバッファーで抽出し、抗 FLAG 抗体を加え、FLAG-CAML を Protein G sepharose で免疫沈降した。サンプルを抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットティングして、HA-p47 が共沈降されているかどうかを検討した。同様に、HA タグをつけた Sec22C 各種アイソフォーム (HA-Sec22C 各種アイソフォーム) および FLAG タグをつけた

ARF4 (ARF4-FLAG) を HEK293 細胞にトランスフェクションした。この細胞を 2% TritonX-100 を含むバッファーで抽出し、抗 HA 抗体を加え、HA-Sec22C 各種アイソフォームを Protein G sepharose で免疫沈降した。サンプルを抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体でウェスタンブロットティングして、ARF4-FLAG が共沈降されているかどうかを検討した。

(4) 組換えタンパク質を用いた結合実験

GST-p47 を glutathione sepharose レジンに固相化し、これに MBP-CAML と様々な量の MBP-WRB を加えて混和し、洗浄後、サンプルを電気泳動で分離して GST-p47 への MBP-CAML の結合量の変化を調べた。

GST-ARF4 野生型または各種活性変異体を glutathione sepharose レジンに固相化し、GTP、GTP γ S または GDP を結合させた。これに MBP-Sec22C を加えて混和し、洗浄後、サンプルを電気泳動で分離して GST-ARF4 への MBP-Sec22C の結合を調べた。

(5) アフィニティー法による Sec22C 結合タンパク質の同定

strep タグをつけた 4 つの膜貫通領域のみを含む Sec22C の C 末フラグメント (strep-4TMDs) を安定に発現する HeLa 細胞 (strep-4TMDs-HeLa 細胞) を樹立した。strep-4TMDs-HeLa 細胞を 0.5% Triton X-100 を含むバッファーで抽出し、抽出液に Strep-Tactin レジンを加えて strep-タンパク質を結合させた。洗浄後、11mM desthiobiotin を含むバッファーでレジンに結合した strep-タンパク質を溶出させた。サンプルを SDS-PAGE で電気泳動し、銀染色した。strep-タンパク質とともに精製されたバンドの切り出し、質量分析で同定した。

4. 研究成果

(1) CAML 複合体の活性制御機構

SNARE タンパク質の膜挿入装置である CAML 複合体が、膜上の SNARE タンパク質量を決めている。そこで、CAML 複合体を調節する因子を探るために、以下の解析をした。

CAML 複合体を構成する CAML の全長タンパク質と WRB の全長タンパク質を精製した。CAML の全長タンパク質と WRB の全長タンパク質を人工リポソームに組込んだ。

HeLa 細胞の細胞膜のみを選択的に除去したセミインタクト細胞を用い、SNARE タンパク質の小胞体膜挿入を蛍光顕微鏡で検出、評価できる *in vitro* アッセイ系を開発した。

CAML に結合する新規膜タンパク質 p47 を同定した。p47 を HeLa 細胞にトランスフェクションして免疫染色したところ、p47 は小胞体膜に局在した。p47 の様々なフラグメントを用いて免疫沈降実験した結果、p47 は C 末膜貫通領域を介して CAML と結合した。組換えタンパク質を用いた結合実験の結果、p47 は CAML と WRB に競合的に結合した。抗 p47 抗体を用いて各臓器のライセートをウェスタンブロットティングした結果、p47 は精巣特異的に発現していた。精

巣の凍結切片を抗 p47 抗体で免疫染色した結果、p47 は精巣の中でも精原細胞に強く発現していた。上述のセミインタクト細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を用い、p47 が SNARE タンパク質の膜挿入に与える効果を検討したところ、p47 の過剰発現は膜挿入を抑制した。HeLa 細胞に p47、CAML、WRB をトランスフェクションして免疫染色したところ、p47 は小胞体膜において free の CAML と共局在したが、CAML 複合体とは共局在しなかった。以上の結果から、p47 は CAML 複合体の形成過程に関与しており、p47 による SNARE タンパク質の膜挿入の抑制的な制御は精子形成に重要な働きをしている可能性が示唆された (図 1)。

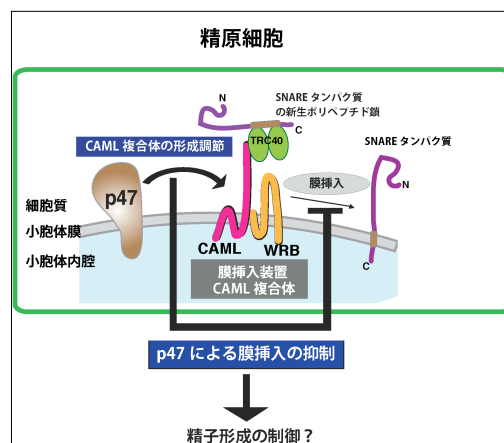


図 1 : p47 による CAML 複合体の活性制御と精子形成

(2) 膜貫通領域の数による SNARE タンパク質の細胞内局在制御機構

すべての小胞輸送はテイルアンカー型タンパク質である SNARE タンパク質により規定されている。SNARE タンパク質の一つに SNARE モチーフを持たない C 末端側に複数の膜貫通領域をもつ膜タンパク質 Sec22C がある。Sec22C には膜貫通領域の数異なるアイソフォームがあるが、生理的意義は不明である。各アイソフォームの性状解析を行い、膜貫通領域の個数変化の生理的意義の解明を試み、以下の結果を得た。

Sec22C の各アイソフォームを HeLa 細胞にトランスフェクションし、免疫染色により細胞内局在を検討した結果、膜貫通領域を 4 つもつ Sec22C アイソフォームはシスゴルジ網に局在し、膜貫通領域を 2 つ又は 1 つもつアイソフォームは小胞体に局在した。strep タグをつけた 4 つの膜貫通領域のみを含む Sec22C の C 末フラグメント (strep-4TMDs) を作成し、細胞内局在を検討した結果、strep-4TMDs はシスゴルジ網に局在した。以上の結果から、Sec22C は膜貫通領域の数を変化させることで細胞内局在を変化させていること (図 2)、シスゴルジ網への局在は C 末 4 つの膜貫通領域で十分であることが明らかになった。

シスゴルジ網へ局在するための分子メカニズムを明らかにするために、C 末 4 つの膜

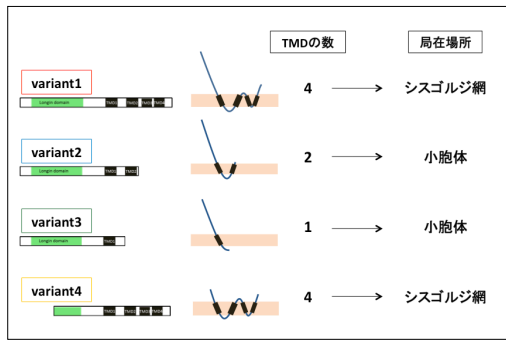


図2：膜貫通領域(TMD)の数と細胞内局在の関係

貫通領域に結合するタンパク質の探索を行った。strep-4TMDsを安定に発現するHeLa細胞(strep-4TMDs-HeLa細胞)からstrep-4TMDsをStrep-Tactinレジンを用いてプルダウンしたところ、分子量約21kDaのタンパク質が共精製された。このタンパク質を質量分析で定した結果、低分子量Gタンパク質ARF4であった。ARF4はシスゴルジ網でSec22Cと共局在した。ARF4とSec22Cアイソフォームの結合を免疫沈降法により検討したところ、ARF4は膜貫通領域を4つもつアイソフォームと結合したが、膜貫通領域を2つもつアイソフォームとは結合しなかった。strep-4TMDs-HeLa細胞においてARF4をsiRNAノックダウンすると、strep-4TMDsのシスゴルジ網への局在を減弱した。Sec22C全長タンパク質を安定に発現するHeLa細胞株にARF4の活性化型変異体を過剰発現すると、Sec22C全長タンパク質のシスゴルジ網への局在が障害された。他方、ARF4の野生型あるいは不活性化型変異体の過剰発現はシスゴルジ網への局在に影響を与えなかった。組換えタンパク質による結合実験の結果、ARF4の野生型、活性化型変異体、不活性化型変異体は同様に4つの膜貫通領域を持つSec22Cに直接結合した。4つの膜貫通領域のARF4結合ドメインを人工的に欠失させたSec22C変異体はゴルジ体ではなく、小胞体に局在した。以上の結果から、Sec22Cは膜貫通領域を介してARF4と結合することでシスゴルジ網に滞留していると考えられた(図3)。一般にARF4の活性化は小胞輸送に対して促進的に働くことが認識されているが、Sec22Cを含む一部のSNAREタンパク質の小胞輸送を抑制している可能性が考えられた。

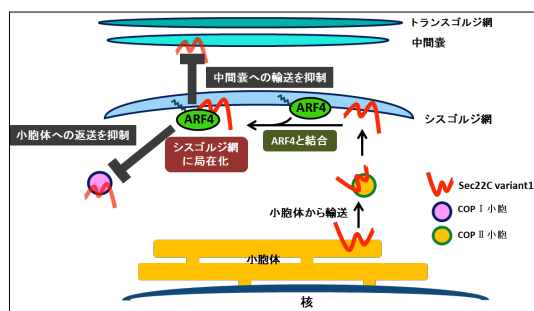


図3：ARF4によるSec22Cのシスゴルジ網局在化機構

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9件)

① Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

The peroxisome biogenesis factors posttranslationally target reticulon homology domain-containing proteins to the endoplasmic reticulum membrane.

Scientific Reports, 8 巻, 2322 (2018) 査読有
doi:10.1038/s41598-018-20797-0.

② Yamamoto, Y., Yurugi, C., and Sakisaka, T.

The number of the C-terminal transmembrane domains has the potency to specify subcellular localization of Sec22c.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 487 巻 2 号, 388-395 (2017) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.071.

③ O'Hare, M., Shadmand, M., Sulaiman, R.S., Sishla, K., Sakisaka, T., and Corson, T.W.

Kif14 overexpression accelerates murine retinoblastoma development.

Int. J. Cancer. 139 巻 8 号 1752-1758 (2016) 査読有
doi: 10.1002/ijc.30221.

④ Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.

The Emerging Role of Calcium-modulating Cyclophilin Ligand (CAML) in Posttranslational Insertion of Tail-anchored Proteins into the Endoplasmic Reticulum Membrane.

J. Biochem., 157 巻 6 号, 419-29 (2015) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvv035.

⑤ Fujiwara, Y., Goda, N., Tamashiro, T., Narita, H., Satomura, K., Tenno, T., Nakagawa, A., Oda, M., Suzuki, M., Sakisaka, T., Takai, Y., and Hiroaki, H.

Crystal structure of afadin PDZ domain-nectin-3 complex shows the structural plasticity of the ligand-binding site.

Protein Sci. 24 巻 3 号, 376-385 (2015) 査読有
doi: 10.1002/pro.2628

⑥ Yunus, J., Setsu, T., Kikkawa, S., Sakisaka, T., and Terashima, T.

Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the laggard mutant mouse.

Neuroscience 275 巻, 259-271 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.011.

⑦ Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y., and Sakisaka, T.

Identification and Characterization of TMEM33 as a Reticulon-binding Protein.

Kobe J. Med. Sci., 60: E57-E65 (2014) 査読有
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25612671

⑧ Hantan, D., Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.

VAP-B Binds to Rab3GAP1 at the ER: Its

Implication in Nuclear Envelope Formation through the ER-Golgi Intermediate Compartment.

Kobe J. Med. Sci., 60: E48-E56 (2014) 査読有
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25612670>

⑨ Yamamoto, Y., Yoshida, A., Miyazaki, N., Iwasaki K., and Sakisaka T.
Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion.
Biochem. J. 458 巻 1 号, 69-79 (2014) 査読有
doi: 10.1042/BJ20131186.

[学会発表] (計 8 件)

① 梶保 博昭、山本 泰憲、匂坂 敏朗
ユビキチンリガーゼ活性による小胞体の新しい形態調節機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2017 年 12 月 8 日, 9 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

② 山本 泰憲、匂坂 敏朗
ペルオキシソーム形成因子による小胞体膜変形タンパク質 reticulon の翻訳後膜挿入機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2017 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

③ 山本 泰憲、萬木 千聖、匂坂 敏朗
小胞輸送調節タンパク質 Sec22C は C 末膜貫通領域の数により細胞内局在を制御する
第 64 回日本生化学会 近畿支部例会
2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

④ 梶保 博昭、姜 山、山本 泰憲、匂坂 敏朗
ユビキチンリガーゼによる小胞体の形態制御機構
第 64 回日本生化学会 近畿支部例会
2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

⑤ 内田 安則、山本 泰憲、出来 宏晃、匂坂 敏朗
小胞体膜タンパク質による極長鎖脂肪酸合成の制御
第 64 回日本生化学会 近畿支部例会
2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

⑥ 匂坂 敏朗、寺島 俊雄
髄鞘低形成と皮質形成異常を示す新規突然変異マウス laggard
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2016 年 3 月 29 日 ビッグパレット福島 (福島県)

⑦ 山本 泰憲、匂坂 敏朗
小胞体の膜形態制御と翻訳後膜挿入の分子機構
第 87 回日本生化学会大会
2014 年 10 月 15 日 国立京都国際会館 (京都府)

⑧ 張 霞、山本 泰憲、浦出 剛史、匂坂 敏

朗

Reticulon 結合タンパク質 TMEM33 の同定と性状解析

第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3 日 神戸国際会議場 (兵庫県)

[図書] (計 2 件)

① 山本 泰憲、匂坂 敏朗
化学同人 DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『メンブレントラフィック』 PartIII: 高次生体機能を支えるメンブレントラフィック 10 章
神経伝達物質放出を支えるメンブレントラフィック 262(144-154) 2016 年

② Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.
Springer, Presynaptic Terminals 365 (129-140) 2015 年

[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
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
匂坂 敏朗 (SAKISAKA, Toshiaki)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80359843

(2) 研究分担者
山本 泰憲 (YAMAMOTO, Yasunori)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30467659

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
()