

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840031

研究課題名(和文)小胞体における輸送小胞形成部位の構築と制御機構の解析

研究課題名(英文)Formation and organization of ER exit site

研究代表者

依光 朋宏(YORIMITSU, Tomohiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：00534364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体からゴルジ体への物質輸送を担うCOPII小胞は小胞体膜上のERESと呼ばれる領域で形成される。小胞形成反応ではSar1 GTPaseの調節が重要である。また、この輸送系の必須因子であるSec16がERES構築に働くことが示唆されている。本研究ではSec16の機能解析を行った。Sec16 N末端領域がGTPaseを活性化することを発見した。また、同定したGTPase活性化領域はERESの構築といった機能に重要であった。さらにそのN末端領域の働きにより小胞形成反応が促進された。以上の結果からSec16によるERESの構築また小胞形成反応の調節に関わる新たなメカニズムについての知見を得た。

研究成果の概要(英文)：COPII-coated vesicle carriers, which mediate transport of cargo molecules from the ER to the Golgi complex, are formed at specific domains of the ER membranes, called ER exit sites (ERESs). Regulation of Sar1 GTPase activity is an important process for COPII vesicle formation. Sec16 is essential for ER-Golgi transport and suggested to play a crucial role in ERES formation. Here I investigated Sec16 function and shed light on new mechanistic insights. I find that the N-terminal region of Sec16 can activate Sar1 GTPase. The domain for GTPase activation is identified in the N-terminal region and found to be required for Sec16 function in membrane association and ERES formation. Moreover, I report that the N-terminal region is able to facilitate COPII-mediated vesicle formation. These results provide novel regulatory mechanisms of how Sec16 organizes ERES and potentiates COPII action for vesicle formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 輸送小胞 COPII GTPase

1. 研究開始当初の背景

真核細胞において、小胞体からゴルジ体へのタンパク質等の物質輸送は輸送小胞 COPII 小胞により行われる。COPII 小胞は小胞体膜上の ER Exit Sites (ERES) と呼ばれる特異的な領域で形成される。ERES は COPII 小胞形成の基盤となる構造体であると考えられている。しかし、ERES の構築また COPII 小胞がこのような特異的な領域から形成される機能的意義やその調節機構は不明である。これらの疑問の解明が当分野の重要な課題となっている。

一方、COPII 小胞形成についての基本的な分子機構は明らかにされている (Matsuoka et al., Cell 1998, Antonny et al., Nat Cell Biol., 2001)。まず低分子量 GTPase Sar1 が GDP 結合型から GTP 型へ変換され膜に結合する。次に COPII コートタンパク質複合体 Sec23/24 が膜上に集合し Sec23/24/カーゴ/Sar1 複合体 (prebudding complex) が形成される。さらに膜に集合したもう一つの COPII コート Sec13/31 の架橋により prebudding complex を重合し小胞が形成される。最終的に膜上から出芽することにより 2 層のコート (Sec23/24 (内側)、Sec13/31 (外側)) で覆われた COPII 小胞の形成が完了する。この反応過程において、COPII コートタンパク質の安定な膜上への集積には Sar1 GTPase 活性の制御が重要なステップとなる。この GTPase の活性化は COPII コートの持つ GAP 活性により行われるが、その調節因子の存在が長年推定されていた。先行研究により Sec16 が GTPase を負に制御する調節因子として働くことを明らかにした (Yorimitsu & Sato, Mol Biol Cell 2012)。

生体内において Sec16 は COPII 小胞の形成に必須な因子であり、また ERES に局在する。Sec16 は全ての COPII コートと相互作用すること、また ERES 構築に関わる重様な役割を持つことが示唆されている (Kaiser & Schekman Cell 1990, Shaywitz et al., J Biol Chem 1997, Connerly et al., Curr Biol 2005)。その機能的重要性が長年示唆されていたにも関わらず、他の COPII 小胞形成因子と比較して Sec16 の機能解析は著しく遅れていた。特に ERES 構築に関わる分子メカニズムは依然未知のままであった。

先行研究により Sec16 の領域欠損変異体を用いその ERES 形成機能の解析を行った。Sec16 は出芽酵母の生育に必須で遺伝子欠損株は致死であるため、その生育を相補しない変異体では解析が不可能である。この問題を克服するために、その発現が野生株に比べ恒常的に約 1/10 まで低下している変異体 (sec16^{depl} 株) を作成した。sec16^{depl} 株は野生型に比べ遅いが生育可能である。また COPII 小胞輸送は阻害され、さらに ERES の形成も異常であった。Sec16 の各領域欠損変異体を sec16^{depl} 株で発現させると、N 末端領域を含む断片でその生育、COPII 小胞輸送、さらに

ERES の形成の回復が見られた。以上の結果より、N 末端領域には ERES の構築また COPII 小胞の形成に関わる特異的で重要な機能があることが示唆された。

2. 研究の目的

Sec16 の N 末端領域には COPII タンパク質との相互作用部位が同定されているが、その機能的意義はまだ明らかにされていない。そこで上記の先行研究結果をさらに発展させることにより、その意義を明らかにする。そして Sec16 の新たな分子機能に関する結果を得ることにより、Sec16 による ERES の構築ならびに ERES における COPII 小胞形成の調節に関わるメカニズムについての新たな知見を得る。

3. 研究の方法

(1) Sec16 断片の精製

GST 融合プラスミドから N 末端 735 残基からなる Sec16 断片 (N735) を発現させたプロテアーゼ欠損大腸菌株の抽出液からグルタチオンセファロースビーズを用いアフィニティ精製を行った。また N735 由来の種々の短い断片も同様に精製を行った。またバディングアッセイに用いる各 Sec16 断片を MBP 融合タンパク質として発現させた出芽酵母からアミロースレジンを用い精製した。

(2) 再構成実験系を用いた Sec16 N 末端領域の機能解析

精製 Sec16 N 末端断片の存在下もしくは非存在下で、精製 COPII 因子、人工脂質膜ならびにグアニンヌクレオチドを混合した。反応液における Sar1 の GTP 結合型から GDP 結合型への構造変化に伴うトリプトファン (Trp) 残基由来の蛍光強度の変化を蛍光分光光度計を用い測定した。

(3) 生体内における Sec16 変異体の機能の解析

Sec16 変異体を酵母細胞で発現させその機能解析を行った。COPII 小胞輸送を輸送機質である CPY の小胞体型の蓄積をウエスタンブロットティングにより調べた。また ERES 形成について蛍光タンパク質を融合した COPII コートの細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察することにより調べた。さらに細胞抽出液を遠心分離により分画し Sec16 変異体の膜結合を調べた。

(4) 単離マイクロソームを用いたバディングアッセイ

精製 COPII 因子、GTP ならびに単離マイクロソーム含む反応液に各精製 Sec16 断片を加え、小胞形成反応を行った。小胞画分を遠心分離により回収し、カーゴタンパク質 (Sec22、Sed5) の検出をウエスタンブロットティングにより行った。

4. 研究成果

(1) Sec16 断片の精製

in vitro 実験系で使用するための Sec16 断片の精製を試みた。その結果、大腸菌ならびに酵母両方から以下に示す高純度な精製産物を得ることができた。カッコ内はアミノ酸残基を示す。

大腸菌由来: N735 (1-735aa)、N500 (1-500aa)、 Δ 565N735 (566-735aa)、 Δ 565N655 (566-735aa)

酵母由来: N (1-991aa)、N-CCD (1-1420aa)、CCD-N (992-2195aa)、C (1421-2195aa)、CCD (992-1420aa)

(2) Sec16 N 末端領域は Sar1 GTPase の活性化を行う

まず N735 断片を用い COPII コートによる Sar1 GTPase 活性化への影響を in vitro 再構成実験系で調べるつもりであった。しかし、N735 断片を加えた反応液では、前反応で行う Sar1 自身による GDP から GTP 結合へのグアニンヌクレオチド交換反応が阻害されることが明らかとなった。このような阻害は非加水分解 GTP アナログである GMP-PNP を用いた実験では見られなかった。そこでグアニンヌクレオチド交換反応終了後に N735 断片を加えその影響を調べた。GTP を用いた実験では、COPII コートによるものよりも弱い顕著な Sar1 GTPase の活性化を示す結果が得られた。一方、このような活性化は GMP-PNP を用いた実験では見られなかった。さらにその活性化領域を詳細に調べるために、N735 由来の N500、 Δ 565N735、 Δ 565N655 断片で実験を行った。その結果、唯一 Δ 565N735 が GTPase の活性化を顕著に行ったため、Sec16 のアミノ酸 566-735 の領域に活性化部位があることが示唆された。この領域を Sar1-GTPase activating element (SGAE) と名付けた。以上の結果から Sec16 はその N 末端領域で Sar1 と相互作用しその GTPase を活性化することが初めて示された。このことから、当初の予測とは異なったが、Sec16 は Sar1 による GTP 加水分解反応を負だけでなく正の制御も行うという新たな分子機能モデルを提唱することができた。

(3) SGAE は Sec16 の膜結合ならびに ERES の構築機能に参与する。

再構成実験系の結果を発展させるために、SGAE を欠損した変異体 Sec16 Δ SGAE 酵母細胞で発現させ、生体内における SGAE の機能解析を行った。Sec16 の欠損 (sec16 Δ) 細胞は致死になるが、Sec16 Δ SGAE を発現させることによりその生育が野生型と同レベルで回復された。次に、Sec16 Δ SGAE を発現する sec16 Δ 細胞を用いその機能解析を行った。CPY をマーカーとした小胞体-ゴルジ体間輸送、ならびに ERES の構築については野生型と同様の結果が得られた。しかし、GFP を融合した Sec16 Δ SGAE の局在を蛍光顕微鏡で観察したところ野生型に比べ細胞質への局在が観察された。この観察結果をさらに調べるために、細胞抽出液を遠心分離することにより

Sec16 Δ SGAE の局在を調べた。野生型は沈殿画分に見られるが Sec16 Δ SGAE は沈殿画分だけでなく上清画分にも顕著に検出された。これらの結果から Sec16 Δ SGAE は膜への結合能が弱いことが示唆された。

Sec16 は Central conserved domain (CCD) を介して膜に結合することが先行研究結果より示唆されており、CCD を欠損した Sec16 Δ CCD 変異体でも Sec16 Δ SGAE と同様の結果が先行研究により得られていた。そこで、SGAE と CCD の両方を欠損した変異体 Sec16 Δ SGAE Δ CCD を作成しその機能解析を行った。Sec16 Δ SGAE Δ CCD を発現する sec16 Δ 細胞は、その生育速度が野生型に比べ低下し、小胞体-ゴルジ体間輸送も阻害されていることが明らかとなった。また蛍光顕微鏡による観察から、ERES 形成は阻害され Sec16 Δ SGAE Δ CCD 自身も Sec16 Δ SGAE や Sec16 Δ CCD と比較しても高レベルで細胞質への局在することが明らかとなった。さらに細胞分画を行ったところ Sec16 Δ SGAE Δ CCD はほぼ全て上清画分に検出され蛍光顕微鏡によるものと同様の結果が得られた。以上の結果から、SGAE と CCD の2つの領域は協調して働き Sec16 の膜への結合機能機能に参与することが示唆された。このことは未だ明らかとなっていない ERES 構築に関わる Sec16 の分子機構の解明へとつながる重要な発見である。

(4) Sec16 は N 末端領域の働きにより COPII コートによる小胞形成を促進する

COPII コートによる小胞形成反応は単離マイクロソームを用いた再構成実験系により再現できる。この実験系に精製 Sec16 を加えることにより小胞形成が促進されることが、alpha-factor をカーゴ基質として用いた実験で唯一報告されていた (Supek et al., J Cell Biol 2002)。本研究においても、Sec22、Sed5 といった他の基質を指標にした場合にも Sec16 による小胞形成反応の促進が起こることを明らかにした。次に、この小胞形成促進活性は Sec16 のどの部分に担われているかを調べるために、酵母から精製した Sec16 由来の5種類の断片(N、N-CCD、CCD-N、C、CCD)を用い実験を行った。その結果、N-CCD を反応に加えた時にのみ小胞形成の促進が引き起こされ、他の4種では影響が見られなかった。先行研究により N-CCD は酵母細胞中での機能解析においても ERES の構築、小胞体からの輸送を引き起こし、また N-CCD 自身も ERES に局在することがわかっていた。以上の結果から、ERES 中で N 末端領域にある相互作用領域を介して COPII コートを刺激し、その働きを促進することによりカーゴを積み込んだ小胞の形成反応を効率的に引き起こすことを示唆された。このことより、ERES における Sec16 の COPII コートに対する作用機序にかかわる新たなメカニズムについてのモデルを提唱することができた。

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 4件)

1. Sakaguchi, A., Sato, M., Sato, K., Gengyo-Ando, K., Yorimitsu, T., Nakai, J., Hara, T., Sato, K. & Sato, K.
REI-1 is a guanine nucleotide exchange factor regulating RAB-11 localization and function in *C. elegans* embryos
Developmental Cell (2015) 35:211-221, 10.1016/j.devcel.2015.09.013 査読有

2. Iwasaki, H., Yorimitsu, T. & Sato, K.
Distribution of Sec24 isoforms to each ER exit site is dynamically regulated in *Saccharomyces cerevisiae*
FEBS Letters (2015) 589:1234-1239 10.1016/j.febslet.2015.04.006 査読有

3. Yorimitsu, T., Sato, K. & Takeuchi, K.
Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants
Frontiers in Plant Science (2014) 5:411 10.3389/fpls.2014.00411 査読有

4. Kodera, C., Yorimitsu, T. & Sato, K.
Sec23 homolog Nel1 is a novel GTPase-activating protein for Sar1 but does not function as a subunit of the COPII coat
Journal of Biological Chemistry (2014) 289:21423-21432 10.1074/jbc.M114.553917 査読有

[学会発表](計 4件)

1. 依光 朋宏、佐藤 健
COPII 小胞カーゴの ER exit sites への集積と Sec16 機能の関連性
第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日
仙台国際センター(宮城県仙台市)

2. 依光 朋宏、佐藤 健
Sec16 N 末端領域による COPII タンパク質の制御と COPII 小胞の形成機構
BMB2015 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

3. 依光 朋宏、佐藤 健
小胞体における COPII 小胞形成部位 ER Exit sites の機能と制御
第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日 タワーホール船堀(東京都江戸川区)

4. 依光 朋宏、佐藤 健
小胞体における COPII 小胞形成部位 ER Exit sites の機能と制御
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16

日 国立京都国際会館(京都府京都市)

出願状況(計 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 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

依光 朋宏(YORIMITSU, Tomohiro)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 00534364

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()