

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0105

研究課題名（和文）再構成して探る小胞輸送の基本原則

研究課題名（英文）Analysis of the basic mechanism of membrane traffic by use of the in vitro reconstitution system

研究代表者

佐藤 健（Sato, Ken）

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00303602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上に小胞体からの輸送小胞の形成反応を再現した独自の実験系により、この反応に関わる因子群の動態の解析を行った。

その結果、COPIIコートの集積過程において、この反応を調節するSar1とSec12の新たな動態を明らかにし、小胞体出口部位の形成を担うSec16がCOPIIコートが形成するクラスターにSar1のGTP加水分解サイクル依存的に取り込まれることを明らかにした。また、生細胞内で小胞体が形成する網目構造を人工膜と精製タンパク質を用いて顕微鏡下に再現する実験系の構築に成功し、この網目構造上にSec16が生細胞内と同様に自己集合することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞に普遍的に備わる小胞輸送と呼ばれる物質輸送について、特に小胞体からゴルジ体への輸送反応を試験管内で再現する新規の実験系を構築するとともに、この反応の制御機構の一端を明らかにした。本研究で解明を目指す小胞輸送の基本原則は、ヒトなど高等真核生物を含めすべての真核生物に普遍的なものである。小胞輸送は細胞機能に広く関わる基礎現象であるため、例えばこれまで原因不明であった疾患の原因が小胞輸送機能の損傷にあるものが最近続々と報告されてきている。そのため小胞輸送の仕組みを解明することは、現代細胞生物学の重要なテーマであるのみならず、創薬や疾患治療への応用への展開にも大きく寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Molecular dynamics of COPII components were analyzed by using microscopy combined with an artificial planar lipid bilayer, and the novel dynamics of Sar1 and Sec12, which regulate COPII coat assembly, and the Sar1 GTPase cycle-dependent Sec16 incorporation into the COPII-cargo clusters were found. Furthermore, we reconstituted and visualized the tubular endoplasmic reticulum network with purified components under a microscope, and confirmed the self-assembly of Sec16 on this tubular membrane network.

研究分野：細胞内輸送

キーワード：小胞体 COPII 低分子量GTPase 小胞輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜に“くぼみ”をつくり、そこに物質を閉じ込めて細胞内に取り込むエンドサイトーシスや、オルガネラ膜を変形(突起)させて小胞の出芽を促すとともに、そこに物質を閉じ込めて別のオルガネラや細胞外へと送り出すエキソサイトーシスは、小胞輸送と呼ばれる一連の反応であり、真核細胞内におけるダイナミックな物質輸送システムである。小胞輸送では、主として直径50~100ナノメートルの小さな膜小胞が輸送担体(輸送小胞)として用いられ、この輸送小胞の形成はコートタンパク質と低分子量GTPaseを中心とする因子群が担っている。輸送小胞の形成は、ドナーとなるオルガネラ膜上でコートタンパク質が低分子量GTPaseによって制御されながら重合するのを駆動力としており、細胞内のすべての小胞輸送経路において基本メカニズムは共通していると考えられている。特に細胞内で最大の表面積を占める小胞体は、各オルガネラで機能するタンパク質や分泌タンパク質など、細胞内の全タンパク質の約三分の一を輸送小胞に乗せて送り出す小胞輸送の活発なオルガネラである。小胞体から形成される輸送小胞はCOPIIコートと呼ばれるコートタンパク質によって覆われていることから「COPII小胞」と称される。研究代表者は、これまで出芽酵母を主な材料として、COPII小胞の形成過程に焦点をあて、積み荷タンパク質が厳密な分子選別を受けてCOPII小胞へと濃縮されるメカニズムの解明において重要な成果を挙げてきた。輸送小胞に取り込む分子の選別メカニズムの概略が見えてきたいま、輸送小胞形成自体の基本特性に目を転じると、輸送小胞形成に関わるタンパク質因子群が膜上でダイナミックな相互作用を通じて輸送小胞を形成する過程、特にダイナミクスについての知見は驚くほど少ない。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では小胞輸送における輸送小胞形成反応に注目し、試験管内再構成系や人工脂質平面膜計測系を駆使して、輸送小胞形成に関わる因子群のダイナミクスについて解析を行い、それを通じて小胞輸送の基本原則の徹底的な理解を目指す。特に、蛍光標識したコートタンパク質、低分子量GTPase、およびグアニンヌクレオチド交換因子等の、輸送小胞形成を直接駆動する因子群の輸送小胞形成過程におけるダイナミクスをリアルタイムでモニターして、それぞれの因子の時空間的な動態の情報を得る。また、膜上で輸送小胞が形成される際に足場として機能するとともに、輸送小胞の形成を統合的に制御していることが示唆されている足場タンパク質Sec16のアセンブリーやコートタンパク質との相互作用、その際に低分子量GTPaseのGTPase活性等におよぼす影響を解析し、小胞形成が起こる位置や頻度が決定されるメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) COPII小胞の形成を駆動する因子群、および足場タンパク質のイメージング解析の準備  
本研究ではCOPII小胞の形成そのものを駆動するCOPIIコート(Sec13/31、Sec23/24)と低分子量GTPase(Sar1)、およびその制御を担う因子(グアニンヌクレオチド交換因子Sec12)、さらにこれらの因子を制御している足場タンパク質Sec16について、反応過程における各因子の動態を可視化する。平成29年度は、人工脂質平面膜系で各因子を可視化するための蛍光標識したCOPIIコート、Sar1、Sec12、Sec16の調製法、および人工脂質平面膜系に導入する実験系を確立させる。既に確立させた積み荷タンパク質の蛍光標識では、システイン残基を介した化学修飾法を用いており、同様の手法で活性を保持したSar1の蛍光標識に成功している。COPIIコートとSec12、Sec16については、活性発現にシステイン残基が必須であるため、タグ特異的に蛍光標識が可能なSNAPタグ、Haloタグによる蛍光標識を検討し、作成したものについて輸送活性の検定を行う。また、これらの蛍光標識が困難であれば、別の化学修飾法やGFP誘導体などの蛍光タンパク質による標識を検討する。

#### (2) 試験管内再構成系を用いた足場タンパク質の機能解析

ER膜上でCOPII小胞形成の足場形成に関与することが示唆されているSec16について、精製Sec16をCOPII小胞形成の試験管内再構成系に導入して機能解析を行う。これまでSec16は、COPIIコートの各サブユニットや、Sar1と直接相互作用することによってSar1のGTPase活性を調節していることを明らかにしている。しかし、COPIIコートが膜上でアセンブリーする過程で、Sec16がどのように各因子と相互作用し、どのようなタイミングで解離しているのかについては不明である。COPII小胞形成の完全再構成系を用いることにより、一連の反応過程でSec16が及ぼす影響について各サブステップごとに詳細に解析を行う。また、各サブステップにおけるSar1のGTPase活性を測定し、Sec16がSar1の反応制御に及ぼす影響について検討する。

#### (3) COPII小胞の形成を駆動する因子群のダイナミクス解析

前年度までに確立させた方法で蛍光標識したCOPIIコート、Sar1、Sec12、Sec16を調製し、人工脂質平面膜に加えてCOPII小胞形成過程におけるそれぞれの因子のダイナミクスを観察・計測する。特にCOPIIコートのアセンブリーとSar1との時空間的関係を定量的に調べることにより、COPIIコートが膜上で連結される反応がSar1によってどのように制御されているのかを精密に解析していく。さらに、Sar1と同時にグアニンヌクレオチド交換因子である

Sec12 との時空間的關係を詳細に解析することによって、COPII 小胞形成過程における Sar1 の活性化と不活性化のタイミングの分子メカニズムを明らかにしていく。

#### (4) COPII 小胞の形成過程における足場タンパク質のダイナミクス解析

試験管内における COPII 小胞の形成に必要なミニマムコンポーネントは、COPII コート (Sec13/31、Sec23/24) と Sar1 のみであり、足場タンパク質 Sec16 は必須ではない。ところが、細胞内における ER-ゴルジ体間の小胞輸送には Sec16 は必須の因子である。このことから、ミニマムコンポーネントによる COPII 小胞の形成反応と、足場タンパク質 Sec16 が COPII 小胞形成反応に及ぼす影響との関係が、この分野における大きな謎の一つとして残っている。そこで、上記の人工脂質平面膜を用いたミニマムコンポーネントによる COPII 小胞形成反応に Sec16 を加えて、COPII 小胞形成過程における Sec16 自身のダイナミクスや、Sec16 存在下における COPII コートや Sar1 のダイナミクスをミニマムコンポーネントのみによる反応と比較することにより、COPII コートの集積過程における Sec16 の役割や、ER 膜上で Sec16 により ER exit site の形成が駆動されるメカニズムを明らかにする。

#### 4. 研究成果

顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上に、精製因子のみによって COPII 小胞の形成反応を再現した独自の実験系を用いて、ターゲットとする各因子を蛍光標識して可視化することにより、COPII 小胞形成反応過程における、それぞれの因子の動態を検出して解析を行った。

その結果、COPII コートの膜へのリクルートの際には低分子量 GTPase である Sar1 が必須であるものの、その後、Sar1 はすぐに膜から解離してしまうことが明らかとなり、膜上で一旦連結された COPII コートは、Sar1 が解離した状態でも安定に存在できるという新たなメカニズムが明らかとなった。また、低分子量 GTPase である Sar1 の活性化を行うものの、COPII 小胞には取り込まれないヌクレオチド交換因子 Sec12 について、この因子は他の積み荷タンパク質とは異なり、GTP 非依存的に COPII 小胞に取り込まれないことを明らかにした。

また、ER からの COPII 小胞の形成は、小胞体出口部位 (ER exit sites) と呼ばれるサブコンパートメントにおいてのみ行われていると考えられており、この ER exit sites が受ける高度な制御によって輸送反応が時空間的に制御されていることが示唆されている。この ER exit sites の形成に深く関与することが示唆されている足場タンパク質 Sec16 について、人工脂質平面膜上における動態を解析したところ、COPII コートが膜上で連結して形成するクラスターに Sec16 が効率よく取り込まれることを明らかにした。さらに、この Sec16 の取り込みは、Sar1 の GTP 加水分解サイクルに依存した現象であることが明らかとなり、COPII 小胞形成過程において、Sec16 が Sar1 の GTP 加水分解活性に直接関与していることを示唆する新たな知見が得られた。

さらに、生きた細胞内における COPII 小胞形成の環境により近い状態をつくり出すために、細胞内において ER が形成する網目構造を、人工膜と精製タンパク質を用いて顕微鏡下に再現する実験系の構築を行った。その結果、網目形成と維持に関わる 2 つの膜タンパク質を再構成したプロテオリポソームを用いて、GTP 依存的に網目を形成、可視化することに成功した。また、この網目構造に蛍光標識した精製 Sec16 を加えたところ、生細胞内の Sec16 と同様に、網目構造上に Sec16 がドット状に自己集合することを見出した。この実験系が構築できたことにより、これまで平面膜の上でしか観察、解析が行えなかった COPII 小胞形成のダイナミクスについて、生きた細胞内の網目構造の ER 膜上の環境により近い状態でのダイナミクス解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasaki, H., Yorimitsu, T., Sato, K.	4. 巻 130
2. 論文標題 Microscopy analysis of reconstituted COPII coat polymerization and Sec16 dynamics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 2893-2902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1242/jcs.203844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依光朋宏、佐藤健
2. 発表標題 ERの形態によるCOPIIタンパク質の機能制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥川純一、依光朋宏、佐藤 健
2. 発表標題 COPIIコート因子のリン酸化/脱リン酸化による小胞輸送制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----