

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24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770139

研究課題名（和文）

カルシウム結合タンパク質 ALG-2 による小胞体からの輸送小胞出芽の制御機構の解析

研究課題名（英文）

Studies on regulation of transport vesicle budding from endoplasmic reticulum by the calcium-binding protein ALG-2.

研究代表者

柴田 秀樹 (SHIBATA HIDEKI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30314470

研究成果の概要（和文）：Sec31A は、小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う COPII 小胞の構成タンパク質である。本研究ではカルシウム結合タンパク質 ALG-2 が Sec31A にカルシウム依存的に相互作用することの生理的意義の解明を目的とし、まず 13 アミノ酸からなる Sec31A の ALG-2 結合領域を同定した。次に、この領域が、Sec31A が小胞体の COPII 小胞出芽部位（小胞体出口部位）と強く結合するために必要であることを明らかにした。また、ALG-2 がカルシウム/リン脂質結合タンパク質アネキシン A11 を小胞体出口部位に動員することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Sec31A is an outer component of COPII coat of endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport vesicles. We previously found that the penta-EF-hand protein ALG-2 calcium-dependently interacts with Sec31A. In this study, we first narrowed the Sec31A region responsible for ALG-2 binding to 13 amino acids. Next, fluorescence recovery after photobleaching analysis revealed that the ALG-2 binding region constitutes a high affinity binding site of Sec31A for the ER membrane. Finally, the calcium/phospholipid binding protein annexin A11 was identified as a recruiting protein to the budding site of COPII by the adaptor function of ALG-2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、小胞輸送、カルシウム、COPII 小胞、タンパク質間相互作用、蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} (カルシウム) 濃度の上昇は、細胞分裂や細胞死、遺伝子発現の制御などの細胞応答を引き起こすが、これらの作用は細胞内に存在するカルシウム結合タンパク質を介して発揮される。私たちは以前に、5 つの EF-hand 構造の繰り返しを有するカルシウ

ム結合タンパク質 ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) が、小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う COPII 輸送小胞の被覆を構成するタンパク質 Sec31A に、カルシウム依存的に結合することを見出していた。この知見から、細胞内カルシウムの上昇を ALG-2 が感知し、Sec31A に結合することで分泌経路の初期段階を制御している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

カルシウムキレータを用いた実験により小胞体からゴルジ体への初期分泌経路においてカルシウムが必要であることが 1989 年に報告されているが、カルシウムを感知するタンパク質は同定されていない。本研究では、カルシウム結合タンパク質 ALG-2 が初期分泌経路を担う COPII 小胞の小胞体からの出芽を制御している可能性について検証し、その生理的意義を解明することを目的とした。具体的には、以下の項目について解析した。

(1) COPII 小胞の形成過程における ALG-2 の役割の検証

COPII 小胞は、小胞の被覆を構成するタンパク質複合体が細胞質から小胞体の COPII 小胞が出芽する特別な部位 (ER exit site、ここでは「小胞体出口部位」と表記する) へ動員されることで形成される。ALG-2 が直接相互作用する Sec31A は COPII 小胞の外被覆を構成するタンパク質である。そこで、Sec31A の小胞体出口部位への動員に対して ALG-2 が関与している可能性を、生細胞蛍光イメージング手法を用いて検証した。

(2) ALG-2 によって小胞体出口部位に動員されるタンパク質の探索

ALG-2 は、5 番目の EF-hand 構造を介してホモ二量体を形成する。私たちは、構造生物学的な解析結果から、ALG-2 二量体が 2 つの相互作用タンパク質を橋渡しするカルシウム依存的アダプターとして機能し得ることを提唱している。そこで、これまでに同定した複数の ALG-2 相互作用タンパク質について小胞体出口部位に動員される可能性を検討した。

(3) ALG-2 の発現抑制や機能不全が初期分泌経路に与える影響の検討

初期分泌経路を追跡可能な細胞株を樹立し、ALG-2 の発現抑制が小胞体からゴルジ体への小胞輸送に与える影響を観察した。

3. 研究の方法

(1) オーバーレイ法による Sec31A の ALG-2 結合領域の同定

タグを付加した Sec31A および Sec31A 変異体を動物培養細胞に発現させ、細胞溶解液からタグの抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE によって展開し、PVDF 膜に転写後、カルシウム存在下でビオチン標識した組換え体 ALG-2 と反応させ、タグ付きのタンパク質と ALG-2 との結合の有無を解析した。

(2) 生細胞を用いた Sec31A の小胞体出口部位との親和性に関する速度論的解析

緑色蛍光タンパク質を融合させた Sec31A および Sec31A 変異体を恒常的に発現する動物培養細胞株を樹立した。融合タンパク質が集積している斑点 (1 つの小胞体出口部位と考えられる) に強いレーザー光を照射し褪色させた後、その領域の蛍光回復を測定した (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP 解析)。蛍光の回復は褪色した融合タンパク質が周囲の蛍光を発する蛍光タンパク質と入れかわったことを示す。蛍光シグナル強度の回復曲線を解析することで、Sec31A 融合タンパク質と小胞体出口部位の結合親和性を算出した。

(3) ALG-2 によって小胞体出口部位に動員されるタンパク質の探索

動物培養細胞に、タグを付加した Sec31A あるいは ALG-2 結合領域を欠いた Sec31A 変異体を発現させ、細胞溶解液からカルシウムの存在下あるいは非存在下で、タグに親和性をもつビーズを用いて Sec31A を沈降させた (プルダウン解析)。沈降産物中の ALG-2 および ALG-2 相互作用タンパク質の有無を、それぞれの特異抗体を用いて解析した。

(4) VSV-G ts045-GFP による分泌経路の追跡

緑色蛍光タンパク質を融合させた水疱性口内炎ウイルスの温度感受性変異株の糖タンパク質 (VSV-G ts045-GFP) を恒常的に発現する動物培養細胞株を樹立した。この融合タンパク質は、細胞を高温 (39 °C) で培養すると小胞体に蓄積し、その後、低温 (32 °C) に移すことで、小胞体からゴルジ体、そして細胞膜へ向かう輸送が開始される。樹立した細胞株を用いて、この融合タンパク質の小胞輸送に対する ALG-2 の発現抑制の影響を観察した。

4. 研究成果

(1) Sec31A の ALG-2 結合領域の同定

Sec31A のプロリンに富んだ領域には、私たちがこれまでに同定した Alix および PLSCR3 の ALG-2 結合領域のアミノ酸配列と相同性のある領域が 2 ヶ所存在する (図 1A)。これらの領域を欠く Sec31A 変異体の ALG-2 との結合能を、ビオチン標識した組換え体 ALG-2 を用いたオーバーレイ法により解析した (図 1B)。その結果、Sec31A の 839 番目のアミノ酸から 851 番目のアミノ酸の領域が ALG-2 との結合に必要であった。また、この領域を緑色蛍光タンパク質との融合タ

ンパク質として動物培養細胞に発現させ ALG-2 との結合能を解析したところ、以前に同定した Alix の ALG-2 結合領域よりも強い結合が検出された (図 1C)。Sec31A のこの領域を ALG-2 結合領域 (ALG-2 binding region, ABS) と名付けた。



図 1. Sec31A の ALG-2 結合領域の同定
A. Sec31A のプロリンに富んだ領域には、これまでに同定された ALG-2 結合領域と相同性のある領域が 2 ヲ所存在する。B. C. ビオチン標識した ALG-2 を用いたオーバーレイ実験の結果。Sec31A のアミノ酸番号 839 番目から 851 番目の領域が ALG-2 との結合に必要かつ十分である。

(2) ALG-2 結合領域の欠損が Sec31A の小胞体出口部位の局在に与える影響

緑色蛍光タンパク質と融合させた ALG-2 結合領域の欠損体 Sec31A (Sec31A^{ΔABS}-GFP) は核周囲に斑点状の局在様式を呈し、野生型 Sec31A (Sec31A^{WT}-GFP) と大きな違いは観られなかった (図 2A)。小胞体出口部位に集積していると考えられる核周囲の斑点を FRAP 解析に供したところ、Sec31A^{WT}-GFP に比べ、Sec31A^{ΔABS}-GFP の蛍光回復に要する時間は有意に短縮された (図 2B, 2C)。野生型、欠損変異体それぞれ約 50 のデータを取得し、蛍光回復曲線を解析した結果、ALG-2 結合領域の欠損により Sec31A の小胞体出口部位との親和性の高い成分が減少していることが明らかとなった。よって、Sec31A は ALG-2 と相互作用することで小胞体出口部位に長い時間、滞在する可能性が

考えられた。

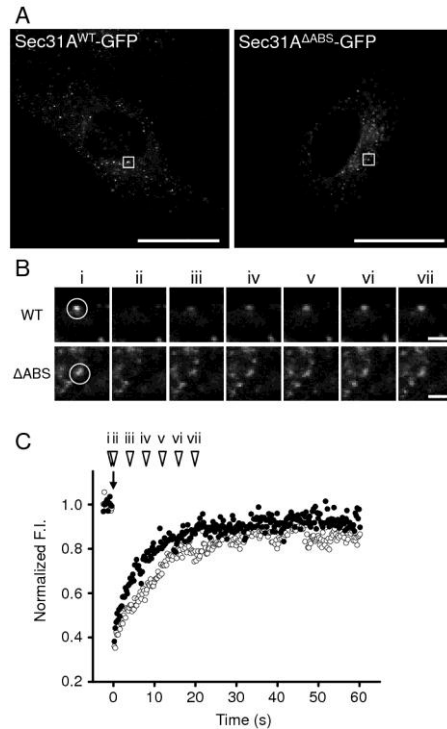


図 2. FRAP の解析例
Sec31A および ALG-2 結合領域を欠いた変異体 Sec31A の GFP 融合タンパク質を発現した細胞 (A) の斑点を一つ含む領域に強いレーザー光を照射し褪色させ (B-i の白線で囲んだ丸い領域)、その後の蛍光回復を測定した (B, C)。ALG-2 結合領域の欠損により蛍光の回復が早くなっている (C. ●, Sec31A^{ΔABS}-GFP; ○, Sec31A^{WT}-GFP)。F. I., 蛍光強度。Bars, (A) 20 μm, (B) 2 μm。

(3) 小胞体出口部位に動員される ALG-2 相互作用タンパク質の探索

タグを付加した Sec31A および Sec31A^{ΔABS} を用いたプルダウン実験の結果、ALG-2 の相互作用タンパク質の中で、アネキシン A11 がカルシウム依存的に Sec31A のプルダウン産物中に検出された。さらに、抗アネキシン A11 抗体を用いた免疫沈降実験により、アネキシン A11 が Sec31A とカルシウム依存的に相互作用することを確かめた。ALG-2 の発現抑制細胞では、アネキシン A11 の免疫沈降産物中に Sec31A は検出されなかったことから、アネキシン A11 と Sec31A の相互作用は ALG-2 が仲介していると考えられた。

(4) 小胞体からゴルジ体への輸送における ALG-2 の発現抑制の影響

分泌経路の追跡に汎用される水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質 VSV-G ts045 の

緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立し、ALG-2の発現抑制が小胞体からゴルジ体への輸送に与える影響を解析した。39℃で一晩培養し、この融合タンパク質を小胞体に蓄積させ、32℃に細胞を移した後に計時的に観察したところ、ゴルジ体様の局在様式を呈するまでの時間が、ALG-2の発現抑制細胞では有意に短縮していた。この結果は、ALG-2が小胞体からゴルジ体への輸送を負に制御していることを示している。

本研究により、カルシウムシグナルがALG-2を介して、COPII小胞の出芽を制御する分子メカニズムの一端が明らかとなった。ALG-2がリン脂質に結合するアネキシンA11を小胞体出口部位へ動員することから、小胞体出口部位の脂質構成を変化させている可能性も考えられ、さらに研究をすすめる予定である。

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 Masatoshi Maki, Yuki Maemoto, Yohei Osako, Hideki Shibata, Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca^{2+} -binding proteins. FEBS J., 査読有, 279, 2012, 1414-1421
- ② Masatoshi Maki, Hironori Suzuki, Hideki Shibata, Structure and function of ALG-2, a penta-EF-hand calcium-dependent adaptor protein. Sci. China Life Sci., 査読有, 54, 2011, 770-779
- ③ Hideki Shibata, Tatsutoshi Inuzuka, Haruna Yoshida, Hirofumi Sugiura, Ikuo Wada, Masatoshi Maki, The ALG-2 binding site in Sec31A influences the retention kinetics of Sec31A at the endoplasmic reticulum exit sites as revealed by live-cell time-lapse imaging. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 74, 2010, 1819-1826

[学会発表] (計10件)

- ① 柴田秀樹、細胞内物流システムを制御するカルシウム結合タンパク質に関する研究、2011年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会、2011年10月1日、京都大学
- ② Hideki Shibata et al. Suppressive role of annexin A11 in the early secretory

pathway. 6th International Conference on Annexins, 2011年8月29日, Residència d'Investigadors, Barcelona, Spain

- ③ 柴田秀樹 他、Sec31Aの小胞体の輸送小胞出芽部位の局在化におけるカルシウム結合蛋白質の必要性、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 (BMB2010)、2010年12月8日、神戸ポートピアホテル
- ④ Hideki Shibata et al. Recruitment of annexin A11 to endoplasmic reticulum exit sites is mediated by the adaptor function of the penta-EF-hand protein ALG-2. 11th Symposium of the European Calcium Society. 2010年9月8日, Warsaw Ochota Campus, Warsaw, Poland
- ⑤ 柴田秀樹 他、カルシウム結合蛋白質ALG-2とCOPII小胞構成蛋白質Sec31Aの生細胞蛍光イメージング解析、2010年度日本農芸化学会大会、2010年3月29日、東京大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 秀樹 (SHIBATA HIDEKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：30314470

(2) 研究協力者

牧 正敏 (MAKI MASATOSHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：40183610

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