

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440110

研究課題名(和文)小胞体の膜形態による機能的サブコンパートメント形成機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of functional sub-compartment formation in the endoplasmic reticulum by membrane structure

研究代表者

黒川 量雄 (Kurokawa, Kazuo)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・専任研究員

研究者番号：40333504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体で合成されたタンパク質は、積荷としてCOP 小胞により小胞体の出芽領域(ERES)からゴルジ体へと運ばれます。全ての真核生物で共通するこの機構を理解するために、本研究では、ERES形成の分子機構について研究を進めました。従来の光学顕微鏡を超える速度と解像度をもつ顕微鏡SCLIMにより、COP 小胞形成を司る膜局率を制御する分子、Sar1はERESに集積することが明らかになりました。そこではSar1はCOP 小胞の膜の端の小胞体膜とつながっている領域に限局して局在することも判明しました。さらにこのSar1の局在がSar1自身の活性化・不活性化サイクルにより制御されることも明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：One third of the proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and transported as cargo by transported vesicles (COPII vesicles) from the ER exit sites (ERES) to the Golgi apparatus. This mechanism is conserved in all eukaryotic cells. In this research, we aimed to elucidate the molecular mechanism of ERES formation. By using the high-speed and high-resolution microscope SCLIM exceeding conventional fluorescent microscopy, we examined the localization of Sar1, which is a key regulator for COPII vesicle formation and has a function of membrane bending. Sar1 showed some accumulation in ERES. High-resolution 3D observation indicated that Sar1 localized at the rims of the COPII vesicle membranes which were connected to the ER, but was excluded from the rest of the COPII vesicle membranes. Additionally, we showed that the reversible membrane association of Sar1 GTPase leads to its localization being restricted to the rims of COPII-coated membranes in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体サブコンパートメント ERES COPII小胞 Sar1

1. 研究開始当初の背景

細胞内で合成される多種多様なタンパク質は、その機能を果たすために固有の目的地に正しく運ばれる必要がある。また、時と共にそれらのタンパク質は、その居場所を変化させ、機能を果たしていく。細胞は、無数のタンパク質の挙動を正確に制御する輸送機構を保持しており、この輸送機構のなかでも特に重要なものの1つが、オルガネラ間を小さな膜小胞等を介して結ぶ膜交通である。小胞輸送とも呼ばれる膜交通は、小胞の出芽、繫留、融合などを通じてタンパク質を選別し輸送する過程でありタンパク質輸送機構の重要な鍵であり、現在まで精力的に研究が進められてきた。この膜交通におけるタンパク質の選別が最初におこなわれる場が小胞体である。小胞体は、連続した膜構造であるにも関わらず、タンパク質を選別し輸送する場であるCOPII小胞が集積する出芽領域(ERES)のような機能的なサブコンパートメントを含んでいる。しかしながら、ダイナミックに形態を変化させる動的かつ連続した膜構造である小胞体にどのようにしてこれらの機能的なサブコンパートメントが形成され、維持されるのかは明らかになっておらず、細胞生物学において重要な課題であり、非常に注目されている(Chen et al., *Cur Opin. Cell Biol.*2013)。

2. 研究の目的

本研究代表者は小胞体上に形成される輸送小胞の出芽領域(ERES)が小胞体膜の高い曲率領域に依存すること、すなわち、小胞体の膜形態が機能的なサブコンパートメント形成に関与することを明らかにしてきた。本研究では、輸送小胞の出芽領域が小胞体膜の高い曲率領域に形成される分子機構の解明を目指す。また、その他の機能的なサブコンパートメントの形成への小胞体膜形態の関与についても解析する。

3. 研究の方法

本研究では、超高感度高速のライブイメージング顕微鏡を用い、生きた酵母細胞の小胞体膜形態の立体的な構造とその変化を小胞体膜局在タンパク質群により可視化し、それとともに機能的なサブコンパートメントで働く分子群の局在を同時に2次元タイムラプス、3次元タイムラプス観察することで小胞体の膜構造による機能的なサブコンパートメント形成の関与を明らかにする。また、種々の温度感受性変異株や一過的な活性変異タンパク質発現誘導などと組み合わせることでその分子機構にまで迫る。本研究では、1)輸送小胞の出芽領域(ERES)形成の分子機構の解明、2)小胞体膜形態と他の機能的サブコンパートメント形成の解析、を中心に計画を進める。

4. 研究成果

COP小胞の形成開始には活性化したSar1が必要である。一方、Sar1が不活性化しないとその後のCOP小胞がゴルジ体シス槽へとつなぎ留められて膜融合できない。現在までにSar1は小胞体膜に広く分布することが分かっていたが、これまでの光学顕微鏡での観察では解像度が低く詳細な3次元局在解析も行われていなかったため、ERESに集まったCOP小胞のどこにSar1が局在するのかは不明であった。

そこで本研究では、超高速高感度高速ライブイメージング顕微鏡SCLIMを用いて生細胞内のSar1の詳細な局在を解析した。2次元タイムラプス解析により小胞体膜上でのSar1局在を解析した結果、ERESではSar1が他の小胞体膜上よりもより集積していることを初めて明らかにした。さらに、Sar1はCOPIIコートタンパク質の集積に先んじてERESに集積することも明らかとなった。次にCOPII小胞膜のどこにSar1が局在しているかを解析した。Sec13-mRFPで標識されるCOP小胞はSar1-GFPが分布する小胞体膜の上であり、一部の領域でのみSar1-GFPとSec13-mRFPのシグナルが重なっていること

が判明した。そこで高解像度 3 次元局在解析を行った結果、Sar1-GFP が COPII 小胞の小胞体膜と COP 小胞の膜の端の小胞体膜とつながっている領域に局在し、その領域以外の COP 小胞の膜には局在しないこと、すなわち限られた領域に「限局」することが明らかとなった。次にこの Sar1 の限局した局在の分子機構を解析した。Sar1 は、GTP と結合した活性化状態ではその構造が変化して、Sar1 の N 末端が小胞体膜に刺さることで小胞体膜へ結合し、Sar1 の GTPase 活性により GTP が GDP に加水分解されると、小胞体膜から遊離する。そこで Sar1 の活性化型変異体を酵母細胞に導入し COPII コートタンパク質ならびに活性化型 Sar1 の 3 次元局在を解析した。その結果、活性化型 Sar1 は巨大な COPII コートタンパク質が集積する異常な膜構造の形成を促し、かつその根元のみならず全体に局在したことが明らかになり、そのことから Sar1 の小胞の根元への限局した局在は Sar1-GTP の加水分解によりもたらされることが示された。Sar1-GTP の加水分解は GAP である COP コートタンパク質 Sec23 によりもたらされまた Sec31 は Sec23 の GAP 活性を促進する。一方、この一連の GAP 活性を ERES に局在する Sec16 が抑制することが明らかとなってきた。そこで sec16 温度感受性機能欠損株を用いて、ERES への Sar1 集積への Sec16 機能を解析した。その結果、Sec16 の機能欠損により Sar1 の ERES への集積と著しく阻害される、すなわち COPII 小胞と小胞体膜の結合部への Sar1 の局在が阻害されることが明らかとなった。このとき COPII 小胞の形成も抑制されるが、一部残存している COPII 小胞の根元には Sar1 が集積していることも判明した。以上のことから小胞体の ERES ならびに COPII 小胞膜上の微小領域における Sar1 の GTP/GDP サイクル制御と Sar1 の膜結合により Sar1 の限局した局在が制御され、それにより COPII 小胞の形成が制御されるモデルが示

唆された。

一方で、Sar1 以外の膜局率を制御する分子群と ERES 形成制御との関連や小胞体膜形態の他の機能的サブコンパートメント形成への関与については、これらが優位に関連している結果は、現在のところ得られていない。

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. Kurokawa K*, Suda Y, and Nakano A. (2016). Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes in vivo. *J Cell Sci.* 129: 3231-3237. DOI: 10.1242/jcs.189423. (Selected IN THIS ISSUE, *J Cell Sci* 2016 129: e1701) *Corresponding author. 査読有
2. Ishii M, Suda Y, Kurokawa K*, and Nakano A*. (2016). COPI is essential for Golgi cisternal maturation and dynamics. *J Cell Sci.* 129: 3251-3261. DOI: 10.1242/jcs.193367. (Selected IN THIS ISSUE, *J Cell Sci* 2016 129: e1702) *Co-corresponding author. 査読有
3. 黒川量雄、中野明彦 (2016) 「ゴルジ体によるタンパク質輸送機構」生物物理 56 (4), 201-206. 査読有
4. Iwai M, Yokono M, Kurokawa K, Ichikawa A, and Nakano, A. (2016) Live-cell visualization of excitation energy dynamics in chloroplast thylakoid structures. *Sci Rep.* 6:29940. DOI: 10.1038/srep29940. 査読有
5. 黒川量雄 (2014) 「超解像ライブイメージング-細胞内膜交通の新しいモデル-」現代化学 523 号, 38-42. 査読無
6. Kurokawa K*, Okamoto M and Nakano A. (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit cites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature Commun.* 5:3653. DOI: 10.1038/ncomms4653. (Recommended in

- Faculty of 1000) *Corresponding author. 査読有
〔学会発表〕(計 12 件)
1. Kazuo Kurokawa (session organizer). “4D imaging of membrane trafficking in living *Saccharomyces cerevisiae*.” Imaging technology, 14th International Congress on Yeasts. (Awazi Yumebutai, September 14, 2016, Hyogo, Japan)
 2. 黒川量雄, 石井みどり, 中野明彦. 「積荷タンパク質のゴルジ体槽間輸送機構」酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会. (2016 年 9 月 11 日, シーサイドホテル舞子ピラ神戸アジサイホール, 兵庫・神戸)
 3. 黒川量雄 (invited speaker). 「小胞体ゴルジ体間、ゴルジ体槽間のタンパク質輸送のイメージング」日本遺伝学会第 88 回大会. (2016 年 9 月 7 日, 日本大学国際関係学部三島駅北校舎, 静岡・三島)
 4. 黒川量雄 (selected speaker), 石井みどり, 中野明彦. 「積荷タンパク質のゴルジ体槽間輸送機構」第 68 回日本細胞生物学会大会. (2016 年 6 月 16 日, 京都テルサ, 京都・京都)
 5. Kazuo Kurokawa (selected speaker), Yasuyuki Suda, Akihiko Nakano. “Sar1 concentrates on the neck of COPII-coated vesicle in vivo” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会. (2015 年 12 月 1 日, 神戸国際会議場, 兵庫・神戸)
 6. Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano “Sar1 concentrates on the neck region of COPII-coated vesicle at the endoplasmic reticulum exit sites in vivo”, Cell Biology of Yeast, Cold Spring Harbor Laboratory. (November 4, 2015, Cold spring harbor, NY, USA)
 7. Midori Ishii, Yasuyuki Suda, Kazuo Kurokawa and Akihiko Nakano “Studies on the molecular mechanism of cisternal maturation in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, Cell Biology of Yeast, Cold Spring Harbor Laboratory. (November 4, 2015, Cold spring harbor, NY, USA)
 8. 石井みどり, 須田恭之, 黒川量雄, 中野明彦. 「ゴルジ体槽成熟における COPI タンパク質の解析」酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会. (2015 年 9 月 1 日, 広島大学, 広島・東広島)
 9. 黒川量雄 (symposium organizer), 中野明彦. 「細胞内膜交通の高速高感度高解像度イメージング」第 67 回日本細胞生物学会大会. (2015 年 7 月 2 日, タワーホール船堀, 江戸川・東京)
 10. 石井みどり(selected speaker), 須田恭之, 黒川量雄, 中野明彦. 「*Saccharomyces cerevisiae* のゴルジ体槽成熟における COPI の機能解析」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, 江戸川・東京)
 11. 黒川量雄, 中野明彦. 「小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送機構の解明」酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会. (2014 年 9 月 2 日, 東京大学, 東京・文京)
 12. 黒川量雄 (selected speaker), 中野明彦. 「積荷タンパク質は cis-Golgi と ERES の接触により小胞体からゴルジ体へ輸送される」第 66 回日本細胞生物学会大会 (2014 年 6 月 11 日, 奈良県新公会堂, 東大寺総合文化センター, 奈良・奈良)
- 〔その他〕
ホームページ等
http://www.riken.jp/research/labs/rap/extr_photonics/live_cell_superresolution_img/
(プレスリリース)
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160902_1/
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160902_2/

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160715_1/
http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414_2

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒川 量雄 (KUROKAWA, Kazuo)

理化学研究所・光量子工学研究領域・専任
研究員

研究者番号： 4 0 3 3 3 5 0 4

(4)研究協力者

石井 みどり (ISHII, Midori)