

機関番号：32659

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570190

研究課題名 (和文) 小胞体サブコンパートメント(ER exit site)の構築機構

研究課題名 (英文) Organization of Endoplasmic reticulum exit sites

研究代表者 谷 佳津子 (TANI KATSUKO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40266896

研究成果の概要 (和文) : ER exit site (ERES) は、COPII 輸送小胞が形成される小胞体膜ドメインである。本研究では、ERES の構築機構および機能を明らかとすることを目的に、ERES 構成因子である p125 と Sec16A・B に関して解析を行った。p125 ノックアウトマウスを作製し、その解析から、p125 と精子形成の関連を示した。また、Sec16B が小胞体からペルオキシソームへのタンパク質輸送に関わる因子であることを明らかとした。

研究成果の概要 (英文) : The ER exit site (ERES) is an ER subdomain, in which COPII-coated vesicles are formed. To elucidate the organization and functions of the ERES, we analyzed three components localized in the ERES, p125 and Sec16A and B. We generated p125-KO mice and found that p125 is required for spermiogenesis. We also demonstrated that Sec16B, but not Sec16A, is involved in the protein transport from the ER to peroxisomes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌系タンパク質輸送のスタート地点であり、新たに合成されたタンパク質は立体構造が形成された後、選別されて輸送経路へと入る。小胞体におけるタンパク質の選別と輸送は ER exit site とよばれるドメインで起こる。この過程には COPII コートタンパク質 (Sec23/Sec24、Sec13/Sec31、低分子量 GTP 結合タンパク質 Sar1 から成る) が関与してお

り、コートタンパク質は輸送されるべきタンパク質を選別する機能と、小胞体膜を変形させる機能を合わせ持つと考えられている。ER exit site は他の小胞体膜とは異なった性質を示し、特別なタンパク質と脂質が集積して構築されていると考えられるが、その構築原理はまだよくわかっていない。

我々は Sec23 に結合するタンパク質の精製を行い、2 つの Sec23 結合タンパク質 (p125

および p250) を同定した (Tani et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20505)。p125 はホスファチジン酸に選択性の高いホスホリパーゼ A₁ (Higgs et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 5468) に類似したドメインを持つタンパク質であり、これまでの研究によって以下のことが明らかとなっていた。

a) N 末端のプロリンリッチ領域を介して Sec23 と結合する (Mizoguchi et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 144)。この領域を KIAA0725p (ゴルジ体に存在する p125 のホモログ) (Nakajima et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 11329) に連結させると、キメラタンパク質は ER exit site に局在するようになることから、N 末端領域はターゲティングにも重要である (Shimoi et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 10141)。

b) ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) と結合する (いずれも未発表)。

c) 小胞体からの搬送のための選別シグナルのひとつジフェニルアラニン・モチーフに結合する (Nufer et al. (2002) *J. Cell Sci.* 115, 619)。

d) Sar1 の GTP-GDP サイクルに依存して ER exit site に局在し、その過剰発現や発現抑制は ER exit site の細胞内分布に変化を引き起こす (Shimoi et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 10141)。

COPII コートタンパク質は酵母から動物まで普遍的に存在するが、p125 は脊椎動物以上の生物にしか存在しない。従って、p125 は動物固有の ER exit site 構成因子であり、ER exit site の構築といった細胞の基本的な機能以外に、動物細胞に特有な機能、例えば、動物細胞特有なタンパク質の選別などに働く可能性が考えられた。

さらに我々は、p250 が EST クローン KIAA0310 がコードするタンパク質であることを明らかにし、このタンパク質も p125 と同様に ER exit site の構築に関与することを示した。KIAA0310p は、出芽酵母において ER exit site の構築に働く Sec16p と有意なアミノ酸相同性を示し、また酵母 Sec16p と同様に種々の COPII コート成分と結合することから、動物における Sec16 オルソログであると考えられた。この動物細胞の Sec16 の発見は、申請者らを含めて 3 つのグループがほぼ同時期に報告し (Iinuma et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 17632; Bhattacharyya & Glick (2007) *Mol. Biol. Cell* 18, 839; Watson et al. (2006) *Traffic* 7, 1678)、現在では Sec16A と呼ばれている。

動物には Sec16A のホモログが存在し、それは KIAA1928 でコードされるタンパク質

で、現在では Sec16B と呼ばれている。予備実験から、Sec16B も Sec16A と同様に COPII コートのサブユニットと結合することが判明していた。また培養細胞に遺伝子導入により発現させた Sec16B は ER exit site マーカーである Sec31 と共局在した。また、RNAi 法で Sec16B をノックダウンすると、Sec16A の場合と同様に ER exit site の構造が乱れ、このタンパク質も ER exit site の構築に貢献していると思われた。

2. 研究の目的

本研究では、これまで進めて来た研究を発展させ、p125 および Sec16A、さらにそのホモログである Sec16B に関して、生化学、細胞生物学、遺伝子ノックアウトといった手法を用いて解析を行い、動物細胞における ER exit site の構築機構および機能に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

p125 については、ノックアウトマウスの作製による個体レベルでの機能解析を中心とし、加えて細胞レベル、タンパク質レベルで解析を行った。Sec16A および Sec16B については、細胞レベルで機能解析を行い、小胞体からの輸送における 2 つのタンパク質の役割を比較した。

1) p125 の解析

①コンディショナルノックアウト用ベクターを作製し、FLOX/FLOXマウスを得た。Creリコンビナーゼを発現するマウスとの交配により p125 ノックアウトマウスを作製し、状態を観察した。

②p125 ノックアウトマウスにおいて雄性不妊傾向が見られたので、その精子形成過程を解析した。

③p125 ノックアウトマウスからマウス胎児繊維芽細胞を樹立し、輸送活性を中心に解析した。

④HeLa 細胞において RNAi 法により p125 をノックダウンし、ER exit site の構築への影響を解析した。

2) Sec16A と Sec16B の解析

①Sec16B に対する抗体を作製した。

②Sec16B と COPII コートのサブユニットとの結合解析を行った。

③ペルオキシソーム形成と Sec16B の関わり

に関して解析した。

4. 研究成果

1) p125 の解析

①p125 ノックアウトマウスを作製した。p125 ノックマウスは野生型マウスと比較して外見上変化がないが、雄マウスに関して生殖能力の低下が認められた。一方、雌マウスではそのようなことは見られず、精子形成に欠陥があることが予想された。

②成熟精子の観察から、ノックアウトマウスの精子では受精に必要な精子固有のオルガネラであるアクロソームが正常に形成されていないことがわかった。精子形成過程を調べたところ、ノックアウトマウスの精原細胞・精細胞では ER exit site とゴルジ体の構造異常が観察され、また、小胞体ストレスによって誘導を受ける Grp94 の量がわずかに増加していた。アクロソームには PNA で染色される糖タンパク質が蓄積することがよく知られているが、ノックアウトマウスでは PNA によって染色される糖タンパク質の局在異常が観察された。これらの結果より p125 ノックアウトマウスでは精原細胞・精細胞において小胞体からの輸送障害が生じ、アクロソームの形成不全による不妊につながる可能性が考えられた。

③p125 ノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞を作製した。この細胞と野生型マウスから作製した細胞における I 型コラーゲンの分泌を比較したところ、p125 ノックアウトマウス由来の細胞では、小胞体からの輸送に遅れが見られた。この遅れはレトロウイルスを用いて p125 を発現させることにより回復した。また、このときリパーゼのコンセンサス配列内のセリンをアラニンに変換した変異 p125 でも同様に輸送の回復が見られたことから、p125 は脂質代謝因子として機能するのではなく、構造的因子として輸送に寄与する可能性が考えられた。次に、VSVG タンパク質の小胞体からの輸送を解析した。大量の VSVG が輸送基質として存在する場合、p125 ノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞では VSVG が細胞内に蓄積し、会合体を形成することがわかった。VSVG の量が低い場合にはこの現象は見られず、その輸送に野生型細胞との間で違いは見られなかった。このことは、p125 ノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞では、大量の輸送基質に対応する能力が低下していることを示す。

④ER exit site は輸送タンパク質量の変化に応答して、数と大きさが調節される。HeLa 細胞において p125 を RNAi 法でノックダウンす

ると、この応答が低下することがわかった。この結果は p125 が ER exit site の基質応答に関与する因子であることを示す。

2) Sec16A と Sec16B の解析

①ヒト Sec16B の部分配列を用いて抗体を作製した。作製した抗体はウエスタンブロッティングで内在性の Sec16B を認識した。

②Sec16B の各種欠失変異体を作製し COPII 小胞のコートタンパク質と結合する部位を解析した。その結果、Sec16A と特に高い相同性を持つ中央領域でコートタンパク質と結合することがわかった。

③RNAi 法を用いて Sec16B を HeLa 細胞で発現抑制すると、ミトコンドリアとペルオキシソームの形態に影響がでることがわかった。両オルガネラの変化は Sec16A を発現抑制したときには見られず、Sec16A と Sec16B とは異なる機能を有する可能性が考えられた。

Sec16B の発現を抑制すると、ペルオキシソーム膜形成に関与する Pex16 タンパク質が小胞体に蓄積することがわかった。さらに Sec16B の発現を抑制すると、ペルオキシソーム膜形成に関与する Pex3 の量が減少すること、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加することによりその減少が回復することがわかった。これらの結果は、Sec16B が PEX16 および Pex3 のペルオキシソームへの局在に関わる因子である可能性を示す。さらに Pex3 の場合は Sec16B 発現抑制時に小胞体に蓄積したタンパク質がユビキチンプロテアソーム系によって分解されると考えられた。そこで、photoactivatable-GFP と融合させた Pex16 を使い、生細胞で Pex16 の輸送解析を行った。その結果、Sec16B 発現抑制時には Pex16 が小胞体に蓄積することを示す結果を得た。これらの結果は、Sec16B が小胞体-ペルオキシソーム間の輸送に関わる因子であることを示唆する。

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 7 件)

1. Arimitsu, N., Kogure, T., Baba, T., Nakao, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Yamamoto, A., Nakanishi, H., Taguchi, R., Tagaya, M., and Tani, K. p125/Sec23-interacting protein (Sec23ip) is required for spermiogenesis. *FEBS Lett* in press 査読有

2. Sato, S., Inoue, H., Kogure, T., Tagaya, M., and Tani, K. Golgi-localized KIAA0725p regulates membrane trafficking from the Golgi apparatus to the plasma membrane in mammalian cells. *FEBS Lett.* **584**, 4389-4395 (2010) 査読有
3. Inuma, T., Aoki, T., Arasaki, K., Hirose, H., Yamamoto, A., Samata, R., Hauri, H. P., Arimitsu, N., Tagaya, M., and Tani, K. Role of syntaxin 18 in the organization of endoplasmic reticulum subdomains. *J. Cell Sci.* **122**, 1680-1690 (2009) 査読有
4. Nagahama, M., Ohnishi, M., Kawate, Y., Matsui, T., Miyake, H., Yuasa, K., Tani, K., Tagaya, M., and Tsuji, A. UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 303-308 (2009). 査読有
5. Nagata, M., Ito, T., Arimitsu, N., Koyama, H., and Sekimizu, K. Transcription arrest relief by S-II/TFIIS during gene expression in erythroblast differentiation. *Genes Cells.* **14**, 371-80. (2009) 査読有
6. Farhan, H., Weiss, M., Tani, K., Kaufman, R. J., and Hauri, H. P. Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *EMBO J.* **27**, 2043-2054 (2008) 査読有
7. Wakana, Y., Takai, S., Nakajima, K., Tani, K., Yamamoto, A., Watson, P., Stephens, D., Hauri, H.-P., and Tagaya, M. Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtannuclear compartment related to ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1825-1836 (2008) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 木樽 猛、有光 なぎさ、中尾 和貴、浜本 洋、関水 和久、山本 章嗣、多賀谷 光男、谷 佳津子、小胞体出芽部位局在タンパク質 iPLA₁-β/p125 の精子形成への関与、第 62 回日本細胞生物学大会、2010/5、大阪
2. Inoue, H., Sato, S., Kogure, T.,

- Arimitsu, N., Tagaya, M., and Tani, K. KIAA0725p/DDHD2, a mammalian Golgi-associated phospholipase A₁, regulates membrane trafficking from the Golgi apparatus to the plasma membrane. Sapporo International Cancer Symposium 2010 "Membrane traffic and Cancer", 2010/6, Sapporo
3. 馬場崇、有光なぎさ、多賀谷光男、谷佳津子、PA-PLA1/iPLA1αの精子形成過程における発現時期の同定、第 82 回日本生化学会大会、2009/10、神戸
4. 米川周佑、中島寿基、井上弘樹、多賀谷光男、谷佳津子、Sec16B はミトコンドリアおよびペルオキシソームの形態形成に関与する、第 82 回日本生化学会大会、2009/10、神戸
5. 金沢仁志、中村昌、佐藤精一、谷佳津子、NESH(Abi-3)を含む WAVE 複合体の解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008/12、神戸

[その他]
ホームページ等
<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~cellsig/index.html>

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
谷 佳津子
(TANI KATSUKO)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：40266896
 - (2) 研究分担者
有光なぎさ
(ARIMITSU NAGISA)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：40408688
 - (3) 連携研究者
()
研究者番号：