

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770163
 研究課題名（和文）小胞体膜タンパク質のダイナミクスと相互作用の時空間イメージング
 研究課題名（英文）Spatio-temporal imaging of ER membrane proteins' dynamics and their interaction
 研究代表者
 黒川 量雄 (Kurokawa Kazuo)
 独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員
 研究者番号：40333504

研究成果の概要（和文）：

小胞体における輸送小胞の形成に重要な役割を果たす Sar1p と Sec12p の相互作用と小胞体膜上での拡散を母細胞と新しく出芽した娘細胞で比較した。その結果、母細胞と娘細胞間でこれらの相互作用効率の違いはみられなかった。また Sec12p の拡散速度は、母細胞、娘細胞間で変わらないが、Sar1p は娘細胞で優位に拡散が遅いこと、さらに娘細胞のサイズに依存して調節されていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on the diffusion of and the interaction between Sar1p and Sec12p on the daughter and the mother ER in living yeast. There was no difference in their interaction and Sec12p diffusion between the daughter and the mother ER. However, Sar1p showed a slower diffusion on the daughter than on the mother. Furthermore, Sar1p diffusion rate depended on the size of daughter cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：小胞体膜タンパク質、ダイナミクス、相互作用、イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞内で合成される種々のタンパク質が、それぞれ機能すべき目的地に運ばれる細

胞内タンパク質輸送システムは時間的にも空間的にも高度に制御されているシステムである。種々のオルガネラや細胞膜を構成するタンパク質群および分泌タンパク質群は小胞体で合成さ

れ、そこから出芽する輸送小胞によってゴルジ体を経由して他のオルガネラや細胞膜に運ばれる。小胞体は静的なオルガネラではなく非常に動的にその形態を変化させるオルガネラである。しかし、この小胞体の形態形成機構やそのダイナミクスの制御に関してはまだまだ多くが不明である。出芽酵母の極性を持った増殖過程においては、元の細胞から出芽した新たな細胞に小胞体が連続したまま分配されるが、元の細胞と新たに生じた細胞間で小胞体膜タンパク質の移動を妨げる障壁が形成されることが明らかになった (Luedeke et al. J. Cell Biol. 2005)。このことは、小胞体自体の動的な形態変化とともに、小胞体膜タンパク質が新たに生じた細胞の小胞体と元の細胞の小胞体でそれぞれ異なるダイナミクスや活性、そして制御機構が存在しうることを示唆している。細胞内タンパク質輸送システムの出発点である輸送小胞の形成に関わる小胞体膜タンパク質も細胞周期進行に合わせて時間的空間的に制御されているかもしれない。

2. 研究の目的

遺伝情報全貌の概要が明らかにされ、産物であるタンパク質の機能をさまざまな細胞というシステムのなかで総合的に理解することが求められている今、従来の生化学に基づいた細胞を破壊して調べる研究手法に加えて、生きた細胞内でのタンパク質機能の時間的、空間的解析が重要である。私は、さまざまな蛍光タンパク質及びそれを用いた解析技術を駆使した研究をおこなってきた。Dronpa 等の蛍光タンパク質を用いて細胞内の微小空間で細胞性タンパク質のダイナミクスを比較することでタンパク質が機能する場を解析するという新たなアプローチも開発してきた。

そこで、本研究では、タンパク質のダイナミクスや相互作用を明らかにする上で極めて有効な手法であるイメージング技術を駆使することによって、出芽酵母の輸送小胞の形成に関わる小胞体膜タンパク質が細胞周期進行に合わせて時間的空間的にどのようなダイナミクスをもち、また相互作用しているかを明らかにしていく。出芽酵母は、他の生物系では得がたい精度の高い遺伝解析と自由度の高い遺伝子操作が可能であり、プローブを内在性のタンパク質と置き換えることによりイメージング解析においてしばしば問題となる過剰発現による内在性タンパク質とは異なるタンパク質の挙動を解析し

てしまう可能性や細胞内のシグナルをかく乱してしまう可能性を低く抑えることができる。小胞体から出芽する輸送小胞は、COPII 小胞と呼ばれ、この小胞の形成をつかさどるのが低分子量 G タンパク質 Sar1p、Sec23/24p と Sec13/31p サブ複合体であり、Sar1p の活性は、小胞体膜上に局在する活性化因子、Sec12p により制御される。また、SNARE や、p24 ファミリーなどの膜タンパク質の積荷も輸送小胞中で複合体を形成する。そこで本研究では、生きた細胞内でのこれらタンパク質のダイナミクスや相互作用を時間的空間的に解明する。

3. 研究の方法

本研究では、イメージング技術を利用した研究方法の中心としている。

(1) Dronpa 融合タンパク質の作製とこれを用いたイメージング

① Dronpa 融合タンパク質の作成

Dronpa 蛍光タンパク質は、強い励起光により速やかに退色し、405nm の光によって再び蛍光が回復する能力をもつ蛍光タンパク質である。また、Dronpa は、この蛍光の退色と回復、すなわち蛍光を on, off を繰り返し行うことができる蛍光タンパク質である。Sar1p、Sec12p などの小胞体膜局在タンパク質の C 末端側、もしくは N 末端側に Dronpa を融合した融合タンパク質を作製し、これを発現する出芽酵母を得た。

② 細胞内ダイナミクスの測定

得られた出芽酵母を用いて、まず細胞内の全 Dronpa 融合タンパク質の蛍光を退色させ、次に 405nm レーザーによって細胞内の任意の場所の Dronpa の蛍光を回復させ、その後の Dronpa 融合タンパク質の拡散を解析した。この実験は、所属研究室に設置されている共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を用いた。細胞膜近傍の小胞体、核膜近傍の小胞体での拡散速度の違いや細胞周期の進行に伴う変化を中心に解析した。

(2) Sar1p、Sec12p、Sec23/24 などの相互作用の研究

① FRET プローブの作成

細胞内でのタンパク質間相互作用を解析するために FRET プローブの作成をおこなう。FRET は、ある蛍光物質 (エネルギー供与体) の蛍光波長と他の蛍光物質 (エネルギー受容体) の励起波長に重なりがあり、それらの蛍光物質が非常に近接して存在し、かつ発色団の向きが適切に配置されたときに、エネルギー供与体の蛍光物質を励起した

際に、エネルギーが無放射遷移してエネルギー受容体から蛍光を示す現象である。緑色蛍光タンパク質 (GFP) の2つの変異体 CFP、YFP をそれぞれエネルギー供与体、エネルギー受容体として、これらとそれぞれのタンパク質の融合タンパク質を作製する。GFP はそれ自身が複合体を形成しやすいため、複合体を形成しない変異体 (monomeric タイプ CFP、YFP (mCFP、mYFP)) を利用する。mCFP、mYFP をそれぞれ Sar1p、Sec12p に融合させた融合タンパク質を発現するベクターを構築し、これらを同時に発現する出芽酵母細胞を得た。

② FRET イメージング

得られた出芽酵母を用いて、タンパク質同士の相互作用を FRET 効率の変化によって可視化する。フィルターホイールシステムによって CFP 及び YFP をそれぞれ励起でき、またそれぞれの蛍光と CFP を励起した際の YFP 蛍光波長由来の光を取得できる蛍光顕微鏡を用いた。FRET の観察では CFP 及び YFP から擬似 FRET シグナルが生じるため (CFP の蛍光が YFP のチャンネルに漏れるものと YFP が CFP の励起光で一部励起されて蛍光を生じるもの) この擬似 FRET 値を CFP 単独発現細胞、及び YFP 単独発現細胞を用いて測定し補正を行った上で正確な FRET の値を得た。

4. 研究成果

ER からゴルジ体への選択的な蛋白質の輸送は、COPII 小胞と呼ばれる小胞が重要な働きを果たしている。そこで、この COPII 小胞の構成因子である Sar1p とその活性化因子 Sec12p が、出芽酵母の極性増殖過程において、どのような動態を示すのかを解析した。

Sar1p、Sec12p とトランスロコンタンパク質 Sec61p と蛍光を on、off できる蛍光タンパク質 Dronpa との融合タンパク質を作製した。Dronpa 融合タンパク質を強い励起光により退色させた後、母細胞及び娘細胞それぞれの小胞体の任意の領域で蛍光回復させ、その後の蛍光を経時測定して、拡散を計測した。小胞体膜タンパク質である Sec12p、Sec61p は、母細胞と娘細胞間で障壁により、拡散が阻害されることが報告されているが、Sar1p も同様に母細胞、娘細胞間の拡散が抑制されており、小胞体上の拡散障壁によって母細胞と娘細胞でそれぞれ別々の動態で働くことが明らかとなった。

そこで、Sar1p、Sec12p、Sec61p の母細胞と娘細胞それぞれの小胞体上での拡散を解析した。その結果、Sec12p と Sec61p は、母細胞と娘細胞の小胞体で同様の速度での拡

散することが明らかになった。次に Sar1p の拡散を解析した。すると、Sar1p の拡散は、母細胞に比べて娘細胞で優位にその速度が遅くなることが明らかになった。

次に、細胞骨格系がこれらの小胞体膜上での拡散に影響しているかどうかを、薬剤処理によって解析した。ラトランキュリンA処理、およびノコダゾール処理によって、アクチン細胞骨格、マイクロチューブを壊し、母細胞、娘細胞における拡散速度を測定した。その結果、これら細胞骨格を破壊しても、Sar1p の母細胞、娘細胞間の拡散速度の違いは、維持されていた。

次に細胞周期の進行に伴う娘細胞の成長が、これらのタンパク質の拡散がどう変化するかを解析した。当然、Sec12p、Sec61p の拡散は、娘細胞の成長にかかわらず母細胞、娘細胞で差がない。一方、Sar1p は、娘細胞が成長し、母細胞と同様のサイズに達すると、その拡散速度が母細胞と同様にまで速くなることが判明した。このことから、細胞周期の進行に伴う娘細胞のサイズの変化に依存して、Sar1p の拡散速度も変化することが明らかになった。

Sec12p と Sar1p にそれぞれ mCFP と mYFP を結合した融合蛋白質を作成し、これらを発現する出芽酵母を用いて、小胞体膜上での Sec12p と Sar1p 相互作用を FRET イメージングにより可視化した。以前に報告したように Sec12p と Sar1p 相互作用母細胞及び娘細胞の小胞体上の FRET 効率は同程度であり、母細胞と娘細胞で Sec12p と Sar1p の複合体形成は、変わらないと考えられる。このことと、Sar1p の拡散が娘細胞で優位に遅いことから、娘細胞の Sar1p は、Sec12p 以外のタンパク質との相互作用によりその拡散が遅くなっていると考えられる。そこで、Sar1p と Sec23p との相互作用を可視化するためそれぞれに mCFP と mYFP を融合させ、FRET イメージングをおこなっている。しかしながら現在のところ優位な相互作用を可視化できていない。今後 FRET 効率が上がるようにそれぞれの融合タンパク質を改変していく。

本研究では、小胞輸送の最初のステップである COPII 小胞の形成をつかさどる Sar1p の小胞膜上のダイナミクスが、娘細胞の成長と密接に関連していることが明らかになった。娘細胞が成長するためには、骨格系に依存したゴルジ体以降の選択的なタンパク質輸送する経路が関与しているが、本研究は、小胞体からゴルジ体までの輸送においてもその極性が存在している可能性を示唆している。今後 COPII 小胞形成の母細胞、娘細胞間での違いなどを解析していくことにより、細胞の極性形成によるタンパク質のダイナミクスの制御機構へ迫っていけると考えられる。

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2件)

1. Yamashita M, Kurokawa K, Sato Y, Yamagata A, Mimura H, Yoshikawa A, Sato K, Nakano A, and Fukai S.

Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3.

Nat. Struct. & Mol. Biol. 17:180-186, 2010.

査読あり

2. Higashi M, Ishikawa C, Yu J, Toyoda A, Kawana H, Kurokawa K, Matsuda M, Kitagawa M, Harigaya K.

Human Mena associates with Rac1 small GTPase in glioblastoma cell lines.

Plos. One. 4(3):e4765. 2009.

査読あり

[学会発表] (計4件)

1. 黒川 量雄、中野明彦、「出芽酵母COPIIコートタンパク質の細胞内ダイナミクス」、日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸

2. 黒川量雄、「酵母Ypt GTPasesの時空間イメージング」、酵母遺伝学フォーラム、2009年7月29日、筑波

3. 黒川量雄、「イメージング技術を用いたYptの時空間情報解析」、酵母細胞研究会例会、2009年7月3日、船橋

4. 黒川量雄、中野明彦、「Ypt31p/32pとSec2pの相互作用の時空間イメージング」、BMB2008、2008年12月、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 量雄 (Kurokawa Kazuo)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員

研究者番号：40333504