

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25年 5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770121

研究課題名（和文） 小胞体出口部位 ERES における COPII 小胞形成機構の解析

研究課題名（英文） Mechanisms of COPII vesicle formation at ER exit sites

研究代表者

依光 朋宏（YORIMITSU TOMOHIRO）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：00534364

研究成果の概要（和文）：小胞体からの物質輸送を担う COPII 小胞は小胞体膜上の小胞体出口部位 ERES で形成される。Sec16 は COPII 小胞の形成ならびに ERES の構築に必須因子である。本研究ではその機能解析を行い、Sec16 は膜上で自己集合により複合体を形成していることを明らかにした。また Sec16 は COPII コートタンパク質による低分子量 GTPase Sar1 の GTP 加水分解の活性化を制御していること明らかにした。

研究成果の概要（英文）：COPII vesicles are formed at the ER exit sites, which mediate the ER-to-Golgi traffic. Sec16 acts as a key factor for ERES formation as well as COPII-mediated transport. Here we have shown that Sec16 is self-assembled to form a homooligomer on the membranes. In addition, we find that Sec16 negatively regulates activation of Sar1 GTP hydrolysis by COPII coat proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：小胞体、小胞輸送、COPII 小胞、ERES

1. 研究開始当初の背景

真核生物は小胞体、ゴルジ体、リソソーム等の膜で囲まれた細胞小器官を持っており、それぞれの細胞小器官が特異的な機能を担っている。細胞小器官の間では、その機能を正常に果たすためにタンパク質などの物質や情報が行き来している。このような物質、情報のやり取りには直径 50-100 nm の「輸送小胞」が用いられている。小胞体からゴルジ体

への輸送は小胞体膜由来の COPII 小胞を介して行われる。COPII 小胞は、膜上に集合した低分子量 GTPase Sar1 と COPII コートタンパク質の働きにより形成される。積荷となるタンパク質は COPII コートと結合することにより COPII 小胞に取り込まれる。Sar1 の GTPase 活性化は COPII コートの GTPase-activating protein (GAP) 活性により制御されている。COPII コートサブユニット Sec23 が Sar1 に対

する GAP 活性を持つのに対し、COPII コートサブユニット Sec31 は Sec23 に結合しその GAP 活性を促進する。これらの一連の COPII 小胞形成の反応過程は、出芽酵母を材料として、COPII コートタンパク質、Sar1, ヌクレオチド (GTP) と積荷タンパク質の最小因子と人工脂質膜のみから成る完全再構成系で再現することができる。一方、細胞内において COPII 小胞の形成は小胞体膜上の小胞体出口部位 (ER exit sites, ERES) で行われる。このような特異的な領域から COPII 小胞が形成される機能的意義やその調節機構、また小胞体膜上で ERES が規定、構築されるメカニズムは明らかにされていない。一方、小胞体膜表在性タンパク質 Sec16 は生体内での COPII 小胞形成の必須因子であり、ERES の構築に関しても重要な役割を果たしていることが示されている。しかしながら、その重要性にも関わらず再構成実験系を用いた解析が難しいことなどから Sec16 の機能解析はあまり進まず分子レベルでの機能はほとんど未知のままであった。このため Sec16 の分子機能を調べることは ERES における COPII 小胞形成の制御機構、また ERES 構築機構を理解するための大きな突破口になりうるということが期待された。

2. 研究の目的

Sec16 を含む COPII 小胞形成に関わるタンパク質を用いた完全再構成実験系を主な手法として、その分子機能がほとんどわかっていない Sec16 の解析を行う。COPII 小胞の形成に必須な反応である COPII コートの膜への集積、Sar1 の GTPase 活性制御機構など一連の COPII 小胞形成の反応過程において Sec16 がどのような役割を持つのかを詳細に調べる。これらの解析結果から従来の細胞生物学、生化学的手法では得ることのできなかつた COPII 小胞の形成の制御に関わる Sec16 の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Sec16 ならびに COPII コートタンパク質、Sar1 を大腸菌もしくは酵母で発現させ、それぞれを精製する。精製タンパク質、ヌクレオチド、人工脂質から成る最小因子を用いた完全再構成実験系で COPII 小胞の形成に関わる反応

を再現し、その解析を行った。また Sec16 の機能領域の探索を Sec16 の領域欠損変異体を用いた相補アッセイ、Yeast two-hybrid 法さらにプルダウンアッセイにより行った。

4. 研究成果

(1) COPII コートの GAP 活性の制御

Sar1 は GTP 結合型から GDP 結合型へ構造変化すると、その分子中のトリプトファン残基由来の蛍光強度が低下する。この変化を蛍光分光光度計で測定することによりリアルタイムで Sar1 の GTP 加水分解の活性化を調べることができるため、Sec16 による COPII コートの GAP 活性に対する影響を完全再構成実験系で調べた。その結果、Sec16 存在下の実験系では Sec31 による Sec23 の GAP 活性の促進化を阻害することがわかった。一方、以前に示された結果同様、Sar1 自身の GTPase 活性また Sec23 の GAP 活性そのものには影響を与えなかった。この結果より、Sec16 は COPII コートタンパク質を介した Sar1 の GTP 加水分解の活性化を負に制御していることを明らかにした。

(2) COPII コートの膜結合の安定化

Sec16 の GAP 活性促進化の阻害の機能的意義を調べるために、Sec16 による COPII コートの膜への結合に対する影響を光散乱光強度の変化を指標に完全再構成実験系を用いて調べた。Sar1, GTP、人工脂質膜小胞の反応液に COPII コートタンパク質を加えると、COPII コートが膜へ結合するに伴い光散乱光のシグナルが上昇するが、その後 Sar1 GTPase 活性化されるので COPII コートは膜から解離しシグナルは下降する。一方、Sec16 を加えた反応液では解離によるシグナルの下降が顕著に遅くなった。この結果より、Sec16 による Sar1 の GTPase 活性化の制御は、COPII コートの膜からの解離を阻害し膜への結合を安定化することに寄与している可能性を明らかにした。

(3) Sec16 の機能的領域の探索と同定

Sec16 はそれぞれの COPII コートと相互作用する。その機能的意義を明らかにするため、Sec16 の機能的領域の探索を行った。様々な領域を欠損する Sec16 変異体を作成し、生育を指標とした相補アッセイを行うと、C 末端領域と 500-560 番目のアミノ酸残基の N 末端

領域が生育に必須であり、さらに COPII 小胞輸送にも必要であることがわかった。次にこれらの領域の機能の詳細を調べるために COPII コートとの相互作用への関与を Yeast two-hybrid 法と精製タンパク質を用いた in vitro プルダウンアッセイで調べた。その結果 C 末端領域は Sec23 と、N 末端 500-560 番目アミノ酸領域は Sec31 と相互作用することを示し、Sec16 と COPII コート間の相互作用は COPII 小胞輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(4) Sec16 C 末端領域による COPII コート GAP 活性の制御機構

Sec16 C 末端領域と Sec23 の相互作用が先に述べた Sec16 による COPII コートの GAP 活性制御に関与しているのかを調べた。精製 C 末端領域を加え COPII コートによる Sar1 の GTPase 活性化を測定すると、全長 Sec16 と同様に、Sec23 の GAP 活性には影響を与えず Sec31 による GAP 活性の促進が阻害された。

さらに、Sec23 相互作用領域が欠損した精製 C 末端領域ではこのような阻害は見られなかったことから、C 末端領域を介した Sec23 との相互作用が直接 Sec16 の GAP 活性の制御に関わっていることを明らかにした。この制御メカニズムの詳細を調べるために、Sec16 C 末端領域による COPII コートの膜結合への影響を調べた。その結果、精製 C 末端領域は膜に結合した Sec23 だけでなく Sar1 にも結合することが明らかになった。一方、C 末端領域存在下では Sec31 の膜への結合が阻害されることがわかった。この結果により C 末端領域は Sec23 と結合することにより Sec31 が Sec23 と相互作用することを阻害していることが示唆された。以上の結果より、COPII コートの Sar1 GTPase 活性化の調節に関する Sec16 の分子メカニズムを明らかにした。

(5) Sec16 の膜結合メカニズム

Sec16 による ERES 構築機構を調べるために、人工脂質平面膜実験系への Sec16 の再構成を試み Sec16 の膜局在メカニズムを調べた。精製した蛍光タンパク質融合 Sec16 を再構成した人工脂質平面膜を全反射蛍光顕微鏡で観察すると、Sec16 が複数の蛍光タンパク質由来のドットとして膜上に可視化された。これらのドット構造体は一分子の Sec16 で構成されるのか、もしくは複数の Sec16 の集合によるものかを調べるために、それぞれのドットの退色パターンの測定を行った。ドットは複

数回（少なくとも 5 回以上）のステップで退色していくことがわかった。この結果は複数

（少なくとも 5 個以上）の Sec16 が膜上で集合することによりドットを形成していることを示している。さらにドットの蛍光輝度を測定しヒストグラムを作成すると、その分布はガウシアン分布とほぼ一致することがわかった。この結果は Sec16 はランダムではなく規則的に集合してドットを形成していることを示唆するものである。これらの結果をさらに確かめるために、酵母細胞内で 2 種類の別々のタグを融合した Sec16 発現させプルダウンアッセイを行った。その結果、再構成実験系だけでなく生体内でも Sec16 同士が互いに相互作用していることを明らかにすることができた。以上の結果より、Sec16 は細胞内において小胞体膜上で自己集合することにより ERES の構築に関わっている可能性を示すことができた。

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 4 件）

1. Kakoi, S., Yorimitsu, T., Sato, K. (2013) COPII machinery cooperates with ER-localized Hsp40 to sequester misfolded membrane proteins into ER-associated compartment. *Mol Biol Cell* 24, 633-642, 10.1091/mbc.E12-08-0639 査読有

2. Yorimitsu, T., Sato, K. (2012) Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell* 23, 2930-2942, 10.1091/mbc.E12-05-0356 査読有

3. Yoshihori, M., Yorimitsu, T., Sato, K. (2012) Involvement of the Penta-EF-Hand Protein Pef1p in the Ca²⁺-Dependent Regulation of COPII Subunit Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7, e40765, 10.1371/journal.pone.0040765 査読有

4. Kodera, C., Yorimitsu, T., Nakano, A., Sato, K. (2011) Sed4p stimulates Sar1p GTP hydrolysis and promotes limited coat disassembly. *Traffic* 12, 591-599, 10.1111/j.1600-0854.2011.01173.x 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 依光 朋宏, ER exit sites における COPII 小胞形成の制御メカニズム、遺伝研

研究会 2012年3月21日 三島

2. 依光 朋宏、佐藤 健、Sec16 function in COPII vesicle formation at ER exit sites、第83回日本生化学大会 2011年9月23日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依光 朋宏 (YORIMITSU TOMOHIRO)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：00534361