

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570239

研究課題名(和文) 高等動物におけるCOPII小胞輸送システムの新機能

研究課題名(英文) Roles of COPII-mediated vesicular transport in higher animals

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：COPII小胞は分泌経路において小胞体からの輸送を仲介する輸送小胞である。本研究では、COPII小胞コートタンパク質と結合するp125とSec16Bの機能を解析した。その結果、p125はCOPIIコートの内層と外層の会合に働く可能性が示唆された。また、Sec16Bはペルオキシソーム膜タンパク質Pex16の小胞体からペルオキシソームへの輸送に関わることを、この輸送はCOPII小胞が形成される小胞体ドメインである小胞体出芽部位以外の領域でおこる可能性が示唆された。Sec16Bは脂肪滴形成にも関わる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Coat protein complex II (COPII)-coated vesicles mediate protein transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus. In this study, we analyzed functions of two COPII-interacting proteins, p125 and Sec16B. We found that loss of p125 reduced the interaction between Sec23 (an inner layer component of COPII) and Sec31 (an outer layer component of COPII), suggesting a role in the assembly of COPII. We also demonstrated that Sec16B is involved in the transport of Pex16, a peroxisomal membrane protein, from the ER to peroxisomes. Our results with mutant Sec16B proteins suggest that ER exit sites, which are an ER subdomain where COPII vesicles are formed, are not involved in this process. In addition, we found that Sec16B might be involved in lipid droplet biogenesis in HeLa cells.

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 ペルオキシソーム p125 Sec16B

1. 研究開始当初の背景

小胞体、ゴルジ体、細胞膜などに局在するタンパク質や分泌タンパク質は、合成後小胞体に組み込まれ、小胞輸送によって細胞内を移動する。輸送のスタート地点である小胞体では、タンパク質は小胞体出芽部位と呼ばれる領域から、COPII コートタンパク質で被覆された小胞 (COPII 小胞) に乗り込みゴルジ体へと輸送される。COPII 小胞のコートタンパク質は Sec23/Sec24、Sec13/Sec31、低分子量 GTP 結合タンパク質 Sar1 から成る。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。我々は Sec23 に特異的に結合するタンパク質として p125 と p250/Sec16A を見出した (Tani et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20505)。

我々は、p125 が N 末端側のプロリンリッチ領域で Sec23p と結合すること (Mizoguchi et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 144)、小胞体からの輸送のための積み荷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こと (Nufer et al. (2002) *J. Cell Sci.* 115, 619)、Sar1 の GTP-GDP サイクルに依存して小胞体出芽部位に局在し、過剰発現や発現抑制によって小胞体出芽部位の細胞内分布に変化を引き起こすこと (Shimoi et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 10141) を明らかとした。p125 は高等動物にしか存在しない。p125 の生理機能を明らかとするため、ノックアウトマウスを作製した。p125 ノックアウトマウスは外見上顕著な欠陥は見られないが、雄性不妊の傾向が観察された。p125 ノックアウトマウスの精子を調べたところ、受精に必要な構造体であるアクロソームが欠損している精子が多く存在することがわかった。

p250 は酵母において小胞体からの輸送に働く Sec16p の動物オルソログである。動物の Sec16 タンパク質の発見は、我々 (Iinuma et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 17632) を含めて 3 つのグループがほぼ同時期に報告し、p250 は現在 Sec16A と呼ばれている。動物細胞には Sec16A に高い相同性を持つ Sec16B が存在し、Sec16A と同様に COPII コートタンパク質と結合する。我々は、HeLa 細胞において、siRNA により Sec16B の発現を抑制すると、ペルオキシソームが伸長し、ペルオキシソーム膜タンパク質である Pex16 が小胞体に蓄積することを見出した。この現象は Sec16A の発現抑制ではほとんど見られなかった。RNAi 耐性の Sec16B を発現させることにより、Pex16 の局在およびペルオキシソーム形態は回復した。ペルオキシソームは分裂によってのみ増殖すると考えられていたが、近年、ペルオキシソーム膜タンパク質の一部が小胞体を経由して局在化することが報告され、その形成への小胞体の関与が指摘されてきている (Hoepfner et al. (2005) *Cell* 122, 85-95; Kim et al. (2006) *J. Cell Biol.*

173, 521)。我々は、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働く可能性を考えた。

2. 研究の目的

COPII 小胞の構造・形成機構は酵母から動物までよく保存されている。しかし、動物細胞の種類は多種多様であること、また細胞のおかれる状況も大きく異なることを考えると、動物固有の COPII 輸送システムあるいはその調節機構が存在する可能性が考えられた。本申請研究ではこれまでの研究を進展させ、p125 と Sec16B に関して解析を行い、両者の機能を明らかとすることにより、高等動物における COPII 輸送システムの機能および調節に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p125 について以下の解析を行った。

p125 ノックアウトマウスに関して、精巣以外の臓器を解析した。

p125 の欠損が COPII コートタンパク質間の相互作用に与える影響を解析した。

(2) Sec16B について以下の解析を行った。

Sec16B の構造と機能の相関を解析した。

ペルオキシソーム膜タンパク質 Pex11 の局在化への Sec16B の関与について解析した。

ペルオキシソームタンパク質を含む輸送小胞の単離を試みた。

ペルオキシソーム以外のオルガネラ形成への Sec16B の関与について解析した。

4. 研究成果

(1) p125 の解析

p125 ノックアウトマウスの精巣以外の臓器の組織切片、血中ホルモン、骨代謝を解析したが、異常は検出できなかった。p125 は細胞内型ホスホリパーゼ A₁ ファミリーに属し、このファミリーに属する PA-PLA₁ と KIAA0725p はヒト遺伝性対麻痺の原因遺伝子であることが報告されている。p125 ノックアウトマウスの下肢機能を解析したが、対麻痺様の症状は見られなかった。

p125 ノックアウトマウスの脳抽出液、精巣抽出液、胎児繊維芽細胞抽出液を用い、COPII コートタンパク質間の相互作用を免疫沈降により解析した。その結果、p125 の欠損は COPII コートの内層を形成する Sec23 と外層を形成する Sec31 タンパク質の結合を著しく弱めること、一方 Sec23 と Sec16A との結合には影響しないことがわかった。この結果は、p125 が COPII コートの内層と外層の連結に働く可能性を示唆する。

(2) Sec16B の解析

Sec16B を発現抑制した HeLa 細胞に変異 Sec16B タンパク質を発現させ、その効果を調べた。その結果、Sec16A には存在しない C 末端領域を含む Sec16B 変異体 (272~1061 アミ

ノ酸)が、ペルオキシソームへの影響を回復させることがわかった。この変異体は小胞体出芽部位には局在しないことから、小胞体出芽部位以外の領域がペルオキシソーム形成に関わる可能性が考えられた。

Sec16B の働きが、全てのペルオキシソーム膜タンパク質に同様であるのかを調べるために、ペルオキシソーム膜タンパク質 Pex11 の局在を解析した。GFP を付加した Pex11 を安定発現する HeLa 細胞を作製し、Sec16B 発現抑制の影響を観察した結果、Pex16 の場合とは異なり、GFP-Pex11 の局在に変化は見られなかった。この結果は、Sec16B が全てのペルオキシソーム膜タンパク質に等しく寄与するのではなく、タンパク質の種類によって異なる可能性を示す。

Schekman らのグループ(米国・カリフォルニア大学・バークレー校)と Subramani らのグループ(米国・カリフォルニア大学・サンディエゴ校)は、酵母を用いて、小胞体からペルオキシソームに向う輸送小胞を単離した(Lam et al. (2010) Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 21523, Agrawal et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 9113)。彼らの系に習い、HeLa 細胞を用いて小胞の形成・単離を試みた。COPII 小胞が形成される条件下で解析を行ったが、ペルオキシソームタンパク質を含む小胞の存在は検出できなかった。実験条件、検出感度の向上などの検討が必要であると考えられる。

最近の報告は、小胞体が分泌経路以外の様々なオルガネラの形成に関わることを示している。ペルオキシソーム以外のオルガネラへの Sec16B 発現抑制の影響を解析した。その結果、HeLa 細胞における Sec16B の発現抑制は、脂肪滴形成を促進することがわかった。この現象は Sec16A の発現抑制では見られなかった。Sec16B は脂肪滴形成にも関わる可能性が考えられた。

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 8 件)

1. Baba, T., Kashiwagi, Y., Arimitsu, N., Kogure, T., Edo, A., Maruyama, T., Nakao, K., Nakanishi, H., Kinoshita, M., Frohman, M.A., Yamamoto, A., and Tani, K. (2014) Phosphatidic acid (PA)- preferring phospholipase A₁ regulates mitochondrial dynamics. *J. Biol. Chem.* 289, 11497-11511. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M113.531921.
2. Baba, T., Yamamoto, A., Tagaya, M., and Tani, K. (2013) A lysophospholipid acyltransferase antagonist, CI-976, creates novel membrane tubules marked by intracellular phospholipase A₁

KIAA0725p. *Mol Cell Biochem.* 376, 151-161. 査読有

DOI:10.1007/s11010-013-1563-4.

3. 谷佳津子, 米川周佑 (2013) ペルオキシソーム膜タンパク質の小胞体を介した輸送、*生化学* 85, 30-33. 査読無
4. 多賀谷光男, 谷佳津子, 新崎恒平 (2013) オルガネラ接触部位:多様な機能と疾患、*実験医学* 31, 1791-1797. 査読無
5. Inoue, H., Baba, T., Sato, S., Ohtsuki, R., Takemori, A., Watanabe, T., Tagaya, M., and Tani, K. (2012) Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A₁ KIAA0725p *Biochim Biophys Acta.* 1823, 930-939. 査読有 DOI:10.1016/j.bbr.2011.03.031.
6. Tani, K., Kogure, T., and Inoue, H. (2012) The intracellular phospholipase A₁ protein family. *Biomol Concepts.* 3, 471-478. 査読有 DOI: 10.1515/bmc-2012-0014.
7. Tani, K., Tagaya, M., Yonekawa, S., and Baba, T. (2011) Dual function of Sec16B: Endoplasmic reticulum-derived protein secretion and peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Cell Logist.* 1, 164-167. 査読有 DOI:10.4161/cl.1.4.18341.
8. Yonekawa, S., Furuno, A., Baba, T., Fujiki, Y., Ogasawara, Y., Yamamoto, A., Tagaya, M., and Tani, K. (2011) Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 12746-12751. 査読有 DOI:10.1073/pnas.1103283108.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 馬場崇、江戸歩実、小笠原裕太、山本章嗣、谷佳津子、Phosphatidic acid-preferring phospholipase A₁(PA-PLA₁)/DDHD1 はミトコンドリアの形態形成に関与する、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜
2. 谷佳津子、馬場崇、山本章嗣、小胞体からのタンパク質輸送における 2 つの Sec16 タンパク質の機能、第 85 回日本生化学会大会、2012/12、福岡
3. 馬場崇、江戸歩実、有光なぎさ、多賀谷光男、谷佳津子、Phosphatidic acid-preferring phospholipase A₁(PA-PLA₁)の精子形成への関与、第 85 回日本生化学会大会、2012/12、福岡
4. 須藤貴是、菅綾乃、西谷太一、谷佳津子、細胞の突起形成における NESH(Abi-3)の役割の解析、第 85 回日本生化学会大

- 会、2012/12、福岡
5. 柏木ゆり子、馬場崇、谷佳津子、小胞体からのタンパク質輸送において Sec16B は Sec16A とは異なる役割を持つ、第 85 回日本生化学会大会、2012/12、福岡
 6. Yonekawa, S., Furuno, A., Baba, T., Fujiki, Y., Tagaya, M., and Tani, K. Sec16B is involved in the ER export of the peroxisomal membrane biogenesis factor Pex16 in mammalian cells. 第 63 回日本細胞生物学会大会、2011/6、北海道
 7. 竹森亜弥、井上弘樹、馬場崇、大槻竜也、渡邊卓也、多賀谷光男、谷佳津子、細胞内型ホスホリパーゼ A₁ の SAM-DDHD ドメインはホスファチジルイノシトールリン酸の結合とホスホリパーゼ A₁ 活性に必須の領域である、第 84 回日本生化学会大会、2011/9、京都
 8. 木樽猛、柏木ゆり子、川井彩花、馬場崇、谷佳津子、COP 小胞輸送における p125/Sec23IP の役割、第 84 回日本生化学会大会、2011/9、京都
 9. Yonekawa, S., Furuno, A., Baba, T., Fujiki, Y., Ogasawara, Y., Yamamoto, A., Tagaya, M., and Tani, K. Sec16B is involved in the ER export of the peroxisomal membrane proteins Pex3 and Pex16 in mammalian cells. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011/12, Denver, CO, USA

〔図書〕(計 1 件)

1. Tani, K., Baba, T., and Inoue, K. (2014) The Structures and Functions of Intracellular Phospholipase A₁ Family Proteins. Phospholipases in Health and Disease, Eds; Tappia, P. S, and Dhalla, N. S. Springer Science+Business Media New York, 87-99
DOI:10.1007/978-1-4939-0464-8_5,

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：