

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657123

研究課題名（和文） 光照射により生細胞内の小胞輸送反応を制御するシステムの構築

研究課題名（英文） Construction of system that controls vesicular transport reaction in living cells by light irradiation

研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00303602

研究成果の概要（和文）：真核細胞内の小胞輸送反応について、この反応を駆動する因子に光依存的に大きな構造変化を起こすフォトリポピン PHOT1 を融合させることにより、光照射によって酵母細胞内の小胞輸送反応を光制御するシステムの構築を試みた。小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御する Sar1 をターゲットとして PHOT1-Sar1-mCherry の融合タンパク質を作成し酵母細胞内で発現させたものの、現在まで光照射による活性制御には至っていない。

研究成果の概要（英文）：To control the vesicular transport reaction by light irradiation in living yeast cells, PHOT1 that induce light-dependent conformational change was fused to the factor that mediates this reaction. Sar1 was selected as a target for controlling ER-to-Golgi vesicular transport, and although PHOT1-Sar1-mCherry fusion protein was expressed in yeast cells, light-dependent regulation has not been observed so far.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

「シグナル仮説」の提唱から30余年が過ぎ、細胞内のさまざまなオルガネラへのタンパク質の輸送にはタンパク質自身もつシグナルとそれを認識するレセプター、そして輸送装置の働きが重要であるという概念は完全に確立した。現在は、タンパク質の細胞内輸送・局在化のメカニズムについて、さまざまな細胞というシステムの中で総合的に理解することが求められている。

真核細胞内における代表的な物質輸送システムである小胞輸送は、「輸送小胞」とよばれる小さな膜小胞を介してオルガネラ間でタンパク質や脂質のやりとりを行っている。この反応は、供与オルガネラ膜からの輸

送小胞の出芽、輸送小胞の細胞内移動、標的オルガネラ膜への膜融合という一連の過程から成り立っており、この中で研究代表者は輸送小胞形成反応について、出芽酵母を材料として独自の試験管内再構成系を用いて分子メカニズムの解析を行ってきた。特に小胞輸送の出発点である小胞体からの輸送小胞形成反応について、この反応で中心的な役割を担う低分子量 GTPase が、GTP の加水分解サイクルによって輸送するタンパク質の選別と濃縮を行っていることを明らかにし、分子選別の長年の謎を解いた (*Nature Struct. & Mol. Biol.* 2005, *EMBO J.* 2009)。

2. 研究の目的

試験管内再構成系による解析から輸送小胞形成の素反応の概略が見えてきたいま、生きた細胞内での反応に目を転じて解析することが求められている。しかし、小胞輸送に関わるほとんどの因子は生育に必須であるため、遺伝子破壊や変異導入による *in vivo* 解析が困難である。そこで、小胞輸送に関わる因子間の相互作用を生細胞中で人為的に制御することができれば、*in vitro* 解析により明らかとなっている任意の反応を細胞内で阻害して解析を行うことができる。そこで本研究では、青色光により構造変化を起こすタンパク質に小胞体からの輸送小胞形成反応を駆動するタンパク質を融合させ、光照射によりタンパク質間相互作用を制御することにより、生きた酵母細胞内における小胞輸送反応を光で制御するシステムの構築を目指す。本研究で開発するシステムは、遺伝子導入が可能なすべての生物種に適用可能な細胞機能制御法であり、実現されれば汎用性の高い基盤技術として細胞生物学分野に限らず、ライフサイエンス分野に広く普及することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 光センサータンパク質の分子設計と発現精製：

生細胞中での光照射による制御には植物由来の光センサータンパク質であるフォトトロピンを用いる。フォトトロピンは植物が青色光に反応して光屈性や葉緑体光定位運動、気孔開口、葉の伸長といった反応を制御するセンサータンパク質であり、その詳細な光情報変換機構が既に明らかになっている。フォトトロピンは分子内に LOV と呼ばれる光受容ドメインを持ち、これに結合する J α と呼ばれる隣接ドメインが、青色光を受けると解離して大きな構造変化を起こす。このタンパク質を用いる最大の特徴として、フォトトロピンの光に応答した構造変化は、LOV ドメインに結合したフラビンに依存しているため、このタンパク質の遺伝子を異種生物内の細胞で発現させた場合にも、同様の特性を持ったタンパク質が生合成されることが期待できることであり、また制御に用いる光も生体への影響が少ない可視光（青色光）であることが挙げられる。

出芽酵母の小胞体からの輸送小胞形成反応は大きく分けて、低分子量 GTPase Sar1p の Sec12p による活性化、それに引き続くコートタンパク質 Sec23/24p のリクルートと輸送基質タンパク質の結合による出芽前駆複合体の形成、コートタンパク質 Sec13/31p による出芽前駆複合体どうしの架橋という一連の反応から成り立っており、各ステップにおいて関わる因子どうしの相互作用が生化

学的に詳細に解析されている。具体的には、Sar1p-Sec12p、Sar1p-Sec23p、Sar1p-Sec23p-Sec31p、Sec23/24p-Sec13/31p といった低分子量 GTPase Sar1p を中心とする小胞体膜上での複合体形成が輸送小胞形成過程において順次形成されていく。これらの複合体のうち、Sar1p-Sec12p を除くすべての複合体について既に結晶構造が明らかになっているため、それらの情報を元にして、同じく結晶構造が既に明らかになっているエン麦由来のフォトトロピンの光反応性ドメインを融合することにより、光照射による構造変化に応じて複合体形成に影響を及ぼすような融合タンパク質の分子設計を行う。低分子量 GTPase Sar1p を中心として、反応に関与する上記の因子すべてについて、考えられ得るあらゆるパターンでの融合タンパク質の作成を行う。設計を行った光センサー融合タンパク質について発現系を構築し、試験管内再構成系での評価を目的とした精製を行う。低分子量 GTPase Sar1p およびその活性化因子 Sec12p については大腸菌、Sec23/24p および Sec13/31p については酵母、あるいは大腸菌での発現系が既に確立しており、いずれの生物種で発現・精製を行った場合についても光反応性ドメインへのフラビンの結合が期待できる。また、実際に精製した融合タンパク質に光受容を行うフラビンが結合しているかについて、分光学的に確認を行う。

(2) 輸送小胞形成の試験管内再構成系による光センサー融合タンパク質の生化学的評価：

研究代表者らが独自に構築した輸送小胞形成の試験管内再構成系を用いて、1) で得られた光センサー融合タンパク質の機能評価を行う。この試験管内再構成系では、輸送小胞形成の各サブステップにおける各因子間の相互作用を FRET シグナルを指標としてリアルタイムで検出して解析することができるため、作成した光センサー融合タンパク質について光照射の有無により、目的とする分子間相互作用のオン/オフの制御が可能な融合タンパク質についての検索・選定を徹底的に行う。

(3) 光センサー融合タンパク質の酵母細胞への導入：

試験管内再構成系において選定した光センサー融合タンパク質について、対応する出芽酵母の温度感受性変異株を用いた機能相補実験を行い、細胞内での機能を確認する。機能が確認できたものについて、その遺伝子を酵母のゲノム上の対応する野生型遺伝子と置換した株の作成を行う。また、試験管内再構成系での機能解析において、光照射時に反応が阻害を受けるタイプの分子と、光照射

時にのみ反応が進行するタイプの分子に分類されるが、後者のタイプの場合は培養中常に細胞への青色光の照射が必要であり細胞に与える影響が大きい。そのため、前者の光照射時に反応が阻害されるタイプの分子について優先的に解析を進める。また、選定した光センサー融合タンパク質を、細胞内で可視化して動態解析を行うことを目的として、蛍光タンパク質の融合を行う。光制御に青色光を用いるため、できるだけこれに影響を受けないように、光センサー融合タンパク質の可視化には mCherry 等の赤色蛍光タンパク質を検討する。

(4) 光センサー融合タンパク質を発現した酵母生細胞における小胞輸送反応の光制御の検討：

(3) で作成した酵母株について、光照射による生きた酵母細胞内での輸送小胞形成反応の光制御について検討を行う。光制御のための青色光 (473 nm) と、タンパク質可視化のための黄色光 (561 nm) の 2 色のレーザーを独立に操作して励起できる現有の共焦点顕微鏡を用いて解析を行う。用いる細胞が直径 5 マイクロメートル程度の出芽酵母であるため、通常、蛍光観察で使用するレーザー強度で十分細胞深部まで光が到達するものと考えられる。顕微鏡下において青色光による活性制御を行いながら、黄色光による光センサー融合タンパク質の細胞内動態の解析を行い、小胞輸送活性については蛍光タンパク質を融合させた輸送基質タンパク質の小胞体への蓄積を指標として検討を行う。

また、本研究で開発するシステムは、青色光の照射範囲をコントロールすることによって、空間的な機能制御も可能である。小胞体膜上で輸送小胞の出芽は、蛍光標識したコートタンパク質によってドット状に染色される「小胞体出口部位」と呼ばれる特異的なコンパートメントから行われる。酵母細胞内において小胞体からの小胞輸送反応が阻害されると、この小胞体出口部位の消失が起こることが知られているため、これを指標として光照射による小胞輸送反応の部位特異的制御についても検討を行う。

4. 研究成果

エンバク種子より光センサータンパク質であるフォトリロピン PHOT1 をコードする cDNA をクローニングした。小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送の活性制御のターゲットとして、出芽酵母における小胞体からの輸送小胞形成反応において中心的な役割を果たす低分子量 GTPase Sar1p を選定した。この Sar1p が小胞体膜と結合する N 末端部位に、PHOT1 中の光受容部位である LOV ドメインとそれに

隣接する J アルファヘリックス領域をさまざまな領域で融合させ、さらにアフィニティ精製用の GST を融合させた GST-PHOT1-Sar1p をデザインした。このタンパク質をコードする大腸菌発現用ベクターを作成し、発現精製用の大腸菌株に形質転換して GST-PHOT1-Sar1p の発現、精製を行った。精製した GST-PHOT1-Sar1p について、部位特異的プロテアーゼにより GST 部分を取り除いた PHOT1-Sar1p の精製標品を得ることができた。また、得られた PHOT1-Sar1p について分光学的な解析を行ったところ、この分子にフラビンの結合が示唆されるデータが得られた。精製 PHOT1-Sar1p を用いて、試験管内再構成系によりリポソーム膜への結合と、Sec23p による GAP 活性の測定を行ったところ、弱いながらも膜への結合活性と、Sec23p による GAP 活性が検出された。

試験管内再構成系によって得られた情報を元に、酵母細胞内における小胞輸送反応の光制御についても、低分子量 GTPase Sar1p を活性制御のターゲットとして、Sar1p が小胞体膜と結合する N 末端に PHOT1 中の光受容部位である LOV ドメインとそれに隣接する J アルファヘリックス領域をさまざまな領域で融合させ、さらに細胞内局在の検出用として C 末端に蛍光タンパク質 mCherry を融合させた PHOT1-Sar1p-mCherry をデザインした。これを酵母細胞内で自身のプロモーターから発現させる系を構築した。いくつかの融合タンパク質については、形質転換体が得られなかったことから、それらの融合タンパク質はドミナントネガティブに作用している可能性が考えられる。生育を示した株について、共焦点レーザー走査顕微鏡による観察から PHOT1-Sar1p-mCherry の小胞体膜上への局在は検出できるものの、その大部分は細胞質中への発現であった。また、その局在は青色光の照射によっても変化は観察されなかった。今後は、PHOT1 と Sar1p との融合部位の検討や、Sar1p 以外のターゲットを選定して実験をデザインする必要がある。

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 3 件)

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

(2) Yoshibori, M., Yorimitsu, T., Sato, K.
“Involvement of the penta-EF-hand protein Pef1p in the Ca²⁺-dependent regulation of COPII subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*” PLoS ONE, 査読有, 7, 2012, e40765.
doi:10.1371/journal.pone.0040765

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

〔学会発表〕（計1件）

- ① 佐藤 健：「再構成と可視化による膜交通の分子機構の解明」公開シンポジウム「タンパク質の細胞内交通整理」（招待講演）
2012年9月10日 東京大学 伊藤謝恩ホール

〔その他〕

ホームページ等

<http://kensato01.c.u-tokyo.ac.jp/~kensato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：00303602