

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580138

研究課題名(和文) 初期分泌経路におけるカルシウム振動シグナル変換機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of oscillatory calcium signaling and its decoding machinery in the early secretory pathway

研究代表者

柴田 秀樹 (Shibata, Hideki)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30314470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高等動物細胞の小胞体からゴルジ体への輸送経路(初期分泌経路)におけるカルシウム振動の役割の解明を目指した。Penta-EF-handタンパク質ALG-2とカルシウム依存性リン脂質結合タンパク質annexin A11(AnxA11)は、小胞体から出芽するCOPII小胞の出芽領域(ERES)にカルシウム振動に呼応して動員されるタンパク質であるが、これらの発現抑制による影響を検討し、ALG-2とAnxA11がSec31AのERES局在の安定化とERESの核近傍への分布を調節することを示した。また、ALG-2とAnxA11が小胞体からゴルジ体への輸送を負に制御することを見出し、報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on calcium-binding proteins that are recruited to the specialized region of endoplasmic reticulum, called ER exit site (ERES) and investigated their roles in the early secretory pathway in response to calcium oscillation. The penta-EF-hand protein ALG-2 is a calcium-dependent interacting protein for Sec31A, an outer coat component of COPII, and recruits a calcium-dependent phospholipid-binding protein annexin A11 (AnxA11) to the ERES. The siRNA-mediated knockdown experiments revealed that both ALG-2 and AnxA11 stabilize Sec31A at the ERES and regulate intracellular distribution of the ERES. In the knockdown cells, the transport of GFP-fused vesicular stomatitis virus ts045 glycoprotein from the ER to the Golgi was accelerated. These results suggest that AnxA11 regulates architectural and functional features of the ERES by coordinating with ALG-2 in response to calcium oscillation.

研究分野：応用生物化学

キーワード：シグナル伝達 カルシウム結合タンパク質 COPII小胞 小胞体 アネキシン

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の小胞体で新規に合成された分泌タンパク質は、小胞体から出芽する輸送小胞 COPII に積み込まれて、ゴルジ体へと輸送される。小胞体からゴルジ体へ至る初期分泌経路において、Ca<sup>2+</sup>の重要性が初めて報告されたのは1989年である。その後、初期分泌経路の中間コンパートメントである ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment; 別名 pre-Golgi compartment) からゴルジ体への輸送には Ca<sup>2+</sup>が必須であるのに対し、小胞体から ERGIC への輸送は Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇によって阻害されることが示された。初期分泌経路における Ca<sup>2+</sup>の複雑な作用を解明するためには、Ca<sup>2+</sup>センサーとなるカルシウム結合タンパク質の同定が待たれていた。

申請者らは、5つの EF-hand を連続して持つ penta-EF-hand カルシウム結合タンパク質 ALG-2 (apoptosis-linked gene 2; 遺伝子名 *PDCD6*) の生理機能を解析する過程で、ALG-2 が、Ca<sup>2+</sup>依存的に、COPII の外被覆を構成する Sec31A と相互作用することを見出し、2007年に報告した。ALG-2 は、ホモ二量体を形成し、それぞれの ALG-2 分子に Ca<sup>2+</sup>依存的に標的タンパク質が相互作用する疎水性ポケットが存在することから、ALG-2 ホモ二量体は Ca<sup>2+</sup>依存性アダプターとして機能することが想定された。実際に、エンドソーム経路では、ALG-2 が ESCRT-I (endosomal sorting complex required for transport-I) と ALIX の相互作用を Ca<sup>2+</sup>依存的に仲介していることを示している。初期分泌経路において、Sec31A の豊富に存在する、小胞体の COPII 小胞出芽領域 (ERES, endoplasmic reticulum exit site) に、ALG-2 を介して動員されるタンパク質を申請者らがこれまでに同定した ALG-2 相互作用タンパク質から探索したところ、Ca<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合タンパク質であるアネキシン A11 が候補として挙げられた。緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を融合させたアネキシン A11 (AnxA11-GFP) の細胞内局在を、HeLa 細胞を用いて生細胞観察した結果、ヒスタミン刺激によるカルシウム振動に同調して、AnxA11-GFP が Sec31A 陽性の ERES に集積する現象が観察された。これらのことから、ALG-2 とアネキシン A11 は、カルシウム振動を感知して、初期分泌経路を制御している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、複雑な翻訳後制御を受ける分泌タンパク質を大量に生産可能な培養細胞発現系を構築することを最終目標に、高等真核細胞の分泌経路の制御システムの分子基盤を明らかにすることを目的とした。特に、カルシウム振動シグナルに応答して初期分泌経路に動員されるカルシウム結合タンパク質に着目し、それらの生理的役割の解明を

指した。

## 3. 研究の方法

(1) FRAP (fluorescence recovery after photobleaching, 光褪色後蛍光回復法) による Sec31A の ERES 膜との親和性の速度論的解析

Sec31A は、細胞質から ERES 膜に動員されるタンパク質である。Sec31A の ERES 膜との親和性を解析するために、まず緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を C 末端側に融合させた Sec31A (Sec31A-GFP) を恒常的に発現する HT1080 細胞 (ヒト繊維肉腫細胞) をレトロウイルス感染法により作製した。同時に、ALG-2 を標的とする short-hairpin 型 RNA (shRNA) あるいは、コントロールとして、ホタルルシフェラーゼを標的とする shRNA を恒常的に発現する細胞を樹立した。

次に、これらの細胞をガラススペースディッシュ (IWAKI 社製) に播種し、ステージインキュベータ (東海ヒット社製) を設置した倒立型共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス社製、FV-1000D) を用いて蛍光画像を取得した。対物レンズは、開口数 1.35 の 60 倍油浸レンズ (UPLSAPO60XO) を用いた。光学ズームを 1.5 に設定し、192 ピクセル x 32 ピクセルの画像を 232 m 秒毎に取得した。Photobleaching は、Sec31A-GFP が形成する斑点を含む直径 11 ピクセルの領域を、488 nm のアルゴンレーザーの出力を 100% に設定し、7.5 m 秒間、トルネードモードを用いて照射することで行った。

Photobleaching した領域の平均蛍光強度値を顕微鏡付属のソフトウェア (FV10-ASW) により求め、細胞のない領域の平均値をバックグラウンドとして、差し引いた。次に、photobleaching 前の 10 枚の画像から得られた強度値の平均値で、各画像の強度値を規格化した。Photobleaching 後の画像から算出した値を、以下の数式であらわされる曲線に、Origin 8J ソフトウェアを用いて、フィッティングさせた。

$$F(t) = A_0 + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t})$$

A<sub>0</sub>: 回復曲線の縦距; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: 回復曲線の振幅に占める割合; k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> (k<sub>1</sub> > k<sub>2</sub>): 回復の速度定数

以下の計算式により、それぞれの fraction の割合を算出した。

Immobile fraction:  $(1 - A_0 - A_1 - A_2) / (1 - A_0)$ ;

Fast mobile fraction,  $A_1 / (1 - A_0)$ ;

Slow mobile fraction,  $A_2 / (1 - A_0)$

## (2) 間接蛍光抗体法

細胞をカバーガラス上に播種し、siRNA のトランスフェクション 72 時間後に、4% パラホルムアルデヒドを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に浸漬し、氷上あるいは室温で 1 時間静置して細胞を固定した。0.1 % Triton X-100 あるいは 30 μg/ml digitonin を含む PBS (phosphate buffered saline) 溶液に

5 分間浸し、膜透過処理を施した。0.1% gelatin を含む PBS 溶液 (0.1% gelatin/PBS) を用いてブロッキング後、適切な濃度の一次抗体を含む 0.1% gelatin/PBS 溶液と反応させた。次に蛍光色素が付加された二次抗体を含む 0.1% gelatin/PBS 溶液と反応させ、Mowiol 4-88 を含む溶液でマウントした。開口数 1.35 の 60 倍油浸レンズ (UPLSAPO60XO) を用いて、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV-1000D) により、蛍光画像を取得した。画像解析には、ソフトウェア Image J を用いた。

### (3) tsO45 G-GFP の小胞体から細胞膜への輸送の追跡

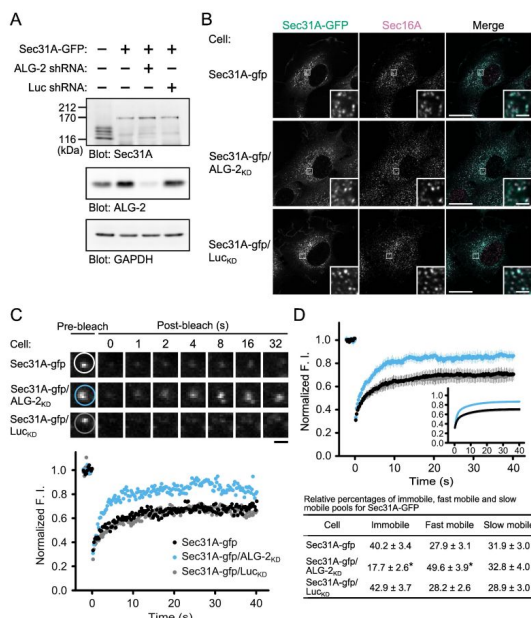
蛍光タンパク質 SGFP2 を融合させた水疱性口内炎ウイルス VSV tsO45 株の糖タンパク質 (tsO45 G-GFP) を恒常的に発現する HT1080 細胞を、レトロウイルス感染法により作製した。細胞を播種した 1 日後に、siRNA をトランスフェクションし、その 2 日後に細胞を 39 に設定したインキュベータに移し、24 時間培養した。その後、32 で培養し、継時的にサンプル化した。細胞の固定と免疫染色は(2)に示した方法で行った。

Endoglycosidase H (endo H) 耐性の解析は、回収した細胞を 0.5% SDS と 40 mM DTT を含む溶液で可溶化し、その溶液を 100 で 10 分間加熱処理をした。Endo H (NEB 社、P0703S) を添加し、37 で 12 時間以上、反応した。継時的に採取したサンプルを SDS-PAGE で展開後、抗 GFP 抗体 (MBL 社、598-7) により免疫プロットを行った。検出されたバンドは Image J により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) ALG-2 と AnxA11 は、Sec31A の ERES への安定な局在化に必要である

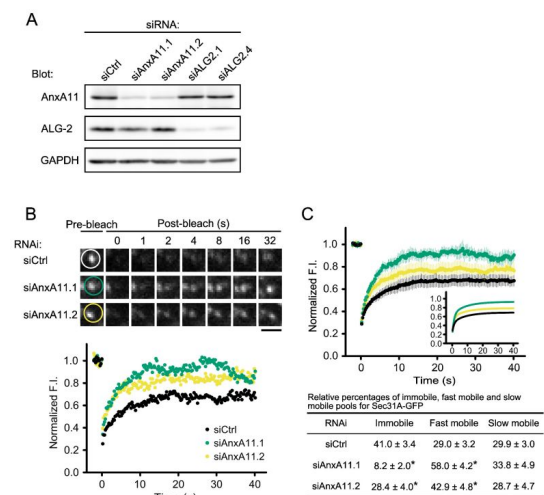
[図 1]



緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を融合させた Sec31A (Sec31A-GFP) を恒常的に発現する

HT1080 細胞を作製し (図 1A)、FRAP 解析を用いて Sec31A-GFP の ERES 膜との親和性を解析した。ALG-2 を標的とする shRNA の恒常発現細胞 (Sec31A-gfp/ALG-2<sub>KD</sub> 細胞) およびコントロールとなるホタルルシフェラーゼを標的とする shRNA の恒常発現細胞 (Sec31A-gfp/Luc<sub>KD</sub> 細胞) においても、親株細胞 (Sec31A-gfp 細胞) と同等に、Sec31A-GFP は細胞質に斑点状の局在様式を呈し、それらは Sec16A と共局在したことから ERES と考えられた (図 1B)。それぞれの細胞を用いて、FRAP 解析を行ったところ、ALG-2 発現抑制細胞において Sec31A-GFP の蛍光回復度の上昇が観察された (図 1C)。蛍光回復曲線の速度論的解析の結果、ALG-2 発現抑制により immobile fraction が有意に減少し、一方で、fast mobile fraction が有意に増加していた (図 1D)。これらの結果は、ALG-2 が Sec31A の ERES への安定な局在化に必要であることを示している。また、ALG-2 発現抑制細胞に shRNA 耐性の ALG-2 をコードする発現プラスミドを用いて、ALG-2 の発現を回復させると Sec31A-GFP の immobile fraction は回復した。興味深いことに、ALG-2 の 121 番目の Gly と 122 番目の Phe を欠くスプライシングアイソフォーム (ALG-2<sup>ΔGF122</sup>) の発現では、Sec31A-GFP の immobile fraction の回復は観察されなかった。

[図 2]



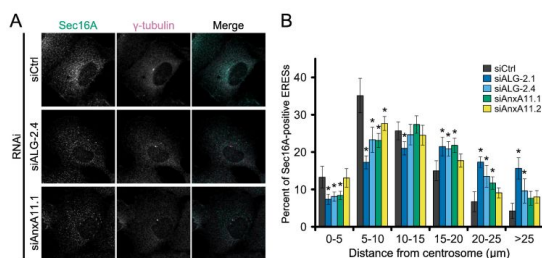
AnxA11 は ALG-2/Ca<sup>2+</sup> 依存的に Sec31A と会合するが、Sec31A-gfp 細胞を用いて AnxA11 を発現抑制後、FRAP 解析を行った。その結果、ALG-2 発現抑制効果と同様に、immobile fraction の有意な減少と fast mobile fraction の有意な増加が計測された (図 2)。よって、AnxA11 が、ALG-2 とともに、Sec31A の ERES 膜への安定な局在化に必要であることが考えられた。

### (2) ALG-2 と AnxA11 の発現抑制細胞の ERES は細胞質全体に分散する

図 1 と図 2 の FRAP 実験において、ALG-2 および AnxA11 の発現抑制により、

Sec31A-GFP が形成する斑点が細胞質全体に散在する傾向が観察された。そこで、ALG-2 と AnxA11 が ERES の局在様式を制御している可能性を検討するために、ALG-2 あるいは AnxA11 を発現抑制した HT1080 細胞を ERES マーカーである Sec16A と中心体マーカーである  $\gamma$ -tubulin の抗体を用いて染色し (図 3A)、Sec16A 陽性の斑点として観察される ERES と中心体の距離を計測し、ヒストグラムを作成した (図 3B)。

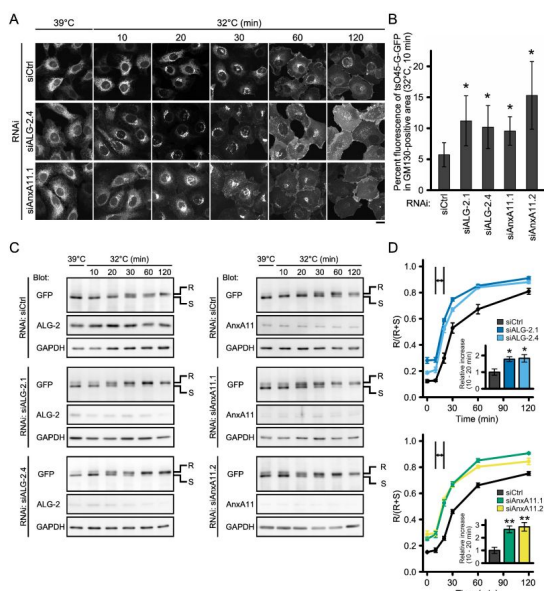
【図 3】



その結果、コントロール細胞では中心体から 5 から 10  $\mu\text{m}$  の領域に 30-40 % の ERES が集中していたが、ALG-2 と AnxA11 の発現抑制細胞では、その割合が有意に減少し、細胞質全体に散在する傾向が見られた。この結果は、ALG-2 と AnxA11 が ERES の細胞内局在様式を制御していることを示している。

### (3) ALG-2 および AnxA11 発現抑制細胞における分泌経路のタンパク質輸送のモデルタンパク質 tsO45 VSV-G の追跡

【図 4】



水疱性口内炎ウイルス VSV tsO45 株の糖タンパク質 (tsO45 VSV-G) は、制限温度 (今回の実験では、39  $^{\circ}\text{C}$ ) では、タンパク質の折り畳み異常により小胞体から輸送されないが、許容温度 (今回の実験では、32  $^{\circ}\text{C}$ ) では、正常に折り畳まれて小胞体から分泌され、ゴルジ体を経て、細胞膜に至る。この性質を利用して分泌経路追跡のモデルタンパク質として汎用されている。ALG-2 と AnxA11 のタンパク質分泌における役割を解明するた

めに、SGFP2 を融合した tsO45 VSV-G (tsO45 G-GFP) を恒常的に発現する HT1080 細胞を作製し、ALG-2 および AnxA11 を発現抑制し、39  $^{\circ}\text{C}$  で一晚培養後、32  $^{\circ}\text{C}$  に細胞を移し、tsO45 G-GFP の局在様式を継時的に観察した (図 4A)。その結果、コントロール細胞では、32  $^{\circ}\text{C}$  の培養 30 分後にゴルジ体様の分布様式を示したのに対し、ALG-2 と AnxA11 の発現抑制細胞では、20 分後にはゴルジ体様の分布を示した。10 分後の細胞をシス・ゴルジ体マーカーである GM130 の抗体で染色し、tsO45 G-GFP の GM130 陽性シス・ゴルジ領域の存在割合を計測した結果、ALG-2 と AnxA11 の発現抑制細胞では、コントロール細胞に比べ有意に上昇していた (図 4B)。さらに、メディアル・ゴルジ体に到達した tsO45 VSV-G の糖鎖が endoglycosidase H (Endo H) に耐性になることを指標として、tsO45 G-GFP の輸送を生化学的に追跡した (図 4C、4D)。その結果、ALG-2 と AnxA11 の発現抑制により、32  $^{\circ}\text{C}$  での培養 20 分後の tsO45 G-GFP のおよそ 50% が Endo H 耐性を獲得しており、コントロール細胞に比べ早くにメディアル・ゴルジ体に達していると考えられた。これらの結果から、ALG-2 と AnxA11 は、小胞体からゴルジ体への輸送を負に制御する可能性が考えられた。

さらに、組換え体 AnxA11 を調製し、種々の脂質組成の人工リポソームとの結合を解析する実験系を確立し、AnxA11 の脂質結合特異性についての検討を進めている。今後、ALG-2 によって ERES に動員される AnxA11 の輸送制御の分子メカニズムを明らかにすることで、カルシウム振動による初期分泌経路の制御機構の解明と応用につながることを期待される。

### <引用文献>

- Beckers, C. J., and Balch, W. E. (1989) Calcium and GTP: essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 108, 1245–1256
- Beckers, C. J., Plutner, H., Davidson, H. W., and Balch, W. E. (1990) Sequential intermediates in the transport of protein between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *J. Biol. Chem.* 265, 18298–18310
- Shibata, H., Suzuki, H., Yoshida, H., and Maki, M. (2007) ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 756–763
- Okumura, M., Ichioka, F., Kobayashi, R., Suzuki, H., Yoshida, H., Shibata, H., and Maki, M. (2009) Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adaptor that bridges Alix and TSG101.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 237-241

## 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 9 件)

### 主な原著論文

Takeshi Takahashi, Kyosuke Kojima, Wei Zhang, Kanae Sasaki, Masaru Ito, Hironori Suzuki, Masato Kawasaki, Soichi Wakatsuki, Terunao Takahara, Hideki Shibata, Masatoshi Maki. Structural analysis of the complex between penta-EF-hand ALG-2 protein and Sec31A peptide reveals a novel target recognition mechanism of ALG-2. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有, 16 巻, 2015, 3677-3699. DOI: 10.3390/ijms16023677.

Hideki Shibata, Takashi Kanadome, Hirofumi Sugiura, Takeru Yokoyama, Minami Yamamuro, Stephen E. Moss, Masatoshi Maki. A new role for annexin A11 in the early secretory pathway via stabilizing Sec31A protein at the endoplasmic reticulum exit sites (ERES). *J. Biol. Chem.* 査読有, 290 巻, 2015, 4981-4993. DOI: 10.1074/jbc.M114.592089.

Kanae Osugi, Hideki Shibata, Masatoshi Maki. Biochemical and immunological detection of physical interactions between penta-EF-hand protein ALG-2 and its binding partners. *Methods Mol. Biol.* 査読有, 963 巻, 2013, 187-200. DOI: 10.1007/978-1-62703-203-8\_12.

〔学会発表〕(計 15 件)

### 主な学会発表

松尾里奈, 小島亨介, 張維, 高橋健, 佐々木桂奈江, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏, カルシウム結合タンパク質 ALG-2 の 2 型結合モチーフに基づいた新規相互作用タンパク質探索, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

加村悟史, 京卓志, 佐藤あかね, 高原照直, 牧正敏, 柴田秀樹, アネキシン A11 のリン脂質結合特性の解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

Hideki Shibata, Takashi Kanadome, Satoshi Kamura, Akane Sato, Terunao Takahara,

Stephen E. Moss, Masatoshi Maki, Potential role of annexin A11 in the COPII biogenesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. 7<sup>th</sup> International Conference on ANNEXINS, 2013 年 9 月 9 日 ~ 11 日, London (United Kingdom)

京卓志, 三宅博, 牧正敏, 柴田秀樹, 繊維状コラーゲンの小胞体からの搬出におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の必要性の検討, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

Hideki Shibata, Takashi Kanadome, Minami Yamamuro, Stephen E. Moss, Masatoshi Maki. The penta-EF-hand protein ALG-2 stabilises a COPII component Sec31A at ER exit sites by recruiting Annexin A11. 12<sup>th</sup> Symposium of the European Calcium Society on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells. 2012 年 9 月 9 日 ~ 12 日, Toulouse (France)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 秀樹 (SHIBATA, Hideki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 30314470

### (2) 連携研究者

牧 正敏 (MAKI, Masatoshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 40183610