

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440079

研究課題名(和文)小胞体からの小胞輸送を時空間的に制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文)Analysis of spatiotemporal regulation of membrane traffic from the ER

研究代表者

佐藤 健 (SATO, Ken)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：00303602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体からの輸送小胞(COPII小胞)形成が行われるER exit siteの構築メカニズム、およびこの時空間制御について解析を行い、COPII小胞の形成過程で中心的な役割を果たす低分子量GTPaseであるSar1の活性制御を行う新規のタンパク質Nel1を同定し、この制御を通じてER exit siteの形成が調節されている可能性を見いだした。また、COPII小胞形成の足場となり、ER exit siteの構築に深く関与することが示唆されているSec16について機能ドメインの解析を行い、Sec16のN末端領域、中央に位置するCCD領域、およびC末端領域のそれぞれが果たす役割について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms of ER exit site formation and its spatiotemporal regulation was analyzed, and a novel GTPase-activating protein (GAP) for Sar1, Nel1, was identified. Nel1 was shown to potentially regulate ER exit site formation through its GAP activity. Furthermore, domain analysis of Sec16, which has been described as the organizer of the ER exit site, identified the roles of its N-terminal, central CCD, and C-terminal domain during ER exit site formation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体 COPII 低分子量GTPase 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がもつシグナルとそれを認識する輸送装置の働きが重要であるという概念はもはやすっかり定着した。一方で、膨大なゲノムの配列情報からそれらの産物である個々のタンパク質の機能を、細胞というシステムの中で理解することが求められている。その中でタンパク質の細胞内輸送・局在化のメカニズムについては、分子レベルでさらにいっそう正確かつ厳密な理解が必要とされている。

真核細胞内のオルガネラ間におけるタンパク質のやりとりは、主として直径50~100nmの輸送小胞を介した小胞輸送によって行われている。特に小胞体からの小胞輸送は、細胞内の全タンパク質の約30%が経由する小胞輸送の大動脈であり、この輸送を担っているのがCOPIIコートと呼ばれるコートタンパク質によって覆われたCOPII小胞である。研究代表者は出芽酵母を材料として、COPII小胞の形成を試験管内で再現する独自の試験管内再構成系を用いて、特にCOPII小胞の形成過程に焦点をあて、積み荷タンパク質が厳密な分子選別を受けて輸送小胞へと濃縮されるメカニズムの解明において重要な成果を挙げてきた。これまでの研究でCOPII小胞形成の素反応の概略が見えてきたいま、細胞内に目を転じると、さまざまな状況証拠からこの反応は時空間的な制御を受けていることが明らかであるものの、この制御に関わる因子やメカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

これまでの研究から、COPII小胞形成の素反応の概略が見えてきたいま、細胞内に目を転じると、さまざまな状況証拠からこの反応は時空間的な制御を受けていることが明らかである。例えば、小胞体では、輸送を必要とするタンパク質の増減に応じて輸送小胞の形成が促進や抑制を受けて刻々と変化する。また、輸送小胞形成は、未だその形成機構が不明な小胞体出口部位(ER exit site)と呼ばれる小胞体上のサブコンパートメントで行われ、このコンパートメントの数を増減させることによって輸送が調節されているようである。しかし、これらの制御に関与する因子やメカニズムについての知見は驚くほど少ない。

このような背景から、小胞輸送を理解するための次のステップとして重要な課題は、この反応の時空間制御メカニズムの解明ではないかと考えるに至った。そこで本研究では出芽酵母を材料として、小胞輸送の中でも小胞体からのCOPII小胞の形成反応に焦点を絞り、この反応を時空間的に制御する因子の探索や、制御メカニズムについて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) COPII小胞形成を時空間制御する因子の同定と精製

COPIIコート複合体(Sec13/31およびSec23/24)に結合する因子がCOPII小胞形成の制御に関わっている可能性が高いと考え、精製COPIIコートを固定化したカラムを用いて酵母ライセートより結合タンパク質の同定を行う。このための予備実験で、既に2つの候補となる因子が同定されてきている。引き続き酵母ライセートよりCOPII因子と結合する因子の同定を行うと同時に、既に同定した因子について試験管内再構成系での解析を目的として発現系を構築し精製を行う。新たに同定されてくる因子についても発現系を構築して精製標品を得る。

(2) 試験管内再構成系を用いたCOPII小胞形成制御の解析

COPII小胞形成の試験管内再構成系を用いて、(1)で同定、精製した因子の存在下におけるCOPII小胞の形成効率、および積み荷タンパク質の選択的取り込み効率への影響を検討する。まずは、試験管内再構成系のうち細胞内でのCOPII小胞形成反応を最も反映する、分画した小胞体膜をドナーとした系を用いることにより、同定された因子がCOPII小胞の形成を促進する方向に働く因子なのか、あるいは抑制する方向に働く因子なのかについての分類を重点的に行う。また、新たに同定されてくる因子についても同様の解析を行い、COPII小胞の形成に影響が見られた因子については、詳細な分子メカニズムの解析へと進める。

同定された有望な制御因子について、さらにプロテオリポソームをドナーとした精製因子のみによる完全再構成系を用いることにより、COPII小胞形成が経る一連の反応のうち、制御因子が作用しているのはどのサブステップであるのかを明らかにする。また、COPIIコートと積み荷タンパク質の会合・解離をFRETシグナルを指標としてリアルタイムで追跡できる独自の再構成系を用いることにより、制御因子による反応の促進や抑制機構を詳細に解析する。さらに、各サブステップにおける低分子量GTPase Sar1のGTPase活性を測定することにより、制御因子がおよぼす影響について検討する。これらの解析を行うことにより、制御因子がCOPII小胞形成過程においてどのような分子メカニズムで反応の制御を行っているのかについて詳細に理解することができる。

(3) COPII小胞形成を時空間制御する因子のin vivo解析

(1)で同定された新規因子について、出芽酵母での遺伝子破壊株や過剰発現株の作製を行い、細胞内における解析のための材料を整備する。また、各因子について細胞内局在の

解析を目的とした各種蛍光タンパク質との融合タンパク質の作製を行う。表現型解析で得られた情報を元に、各因子が機能的な状態で発現するよう融合タンパク質を設計する。整備した酵母株を用いて、蛍光タンパク質により標識した制御因子の生細胞内での挙動について解析を行う。細胞内で COPII 小胞の形成が行われる ER exit site は、COPII コートの構成成分 (Sec13/31 複合体、あるいは Sec23/24 複合体) や Sec16 を蛍光標識することにより、小胞体膜上にドット状の蛍光輝点として観察される。細胞内での制御因子の局在と ER exit site との局在を比較することにより相互の関連を明らかにする。また細胞内における ER exit site の数は、輸送を必要とする積み荷タンパク質の数と連動して増減することが報告されているため、同定した制御因子についても連動した現象が見られるかどうかについて検討を行い、COPII 小胞形成が制御されるタイミングについての情報を得る。

(4) COPII 小胞形成過程における Sec16 の機能解析

これまでの酵母の遺伝学的解析により、小胞体膜上で COPII 小胞の形成が行われる ER exit site の形成に深く関与することが示唆されている因子である Sec16 について、機能ドメインや COPII コートを形成するサブユニットとの結合領域の同定を行うため、部分欠失した Sec16 の精製系の構築を行う。構築した系により得られた精製 Sec16 とその誘導体を試験管内再構成系に導入して解析を行う。これまで Sec16 は two-hybrid 法により、COPII コート、低分子量 GTPase である Sar1、グアニンヌクレオチド交換因子である Sec12 など、COPII 小胞の形成に関与するほとんど全ての因子と相互作用することが報告されているものの、それらの相互作用が COPII 小胞形成過程においてどのような役割を果たしているのかについては一切不明であるため、Sec16 がこの反応におよぼす影響について精密に解析していく。

4. 研究成果

COPII 小胞形成を時空間制御する因子の候補として COPII コート複合体に結合するタンパク質の同定を行い、これまでの予備実験で候補となるタンパク質分解に関わる因子が同定されていたものの、このタンパク質は COPII 小胞が関与する輸送反応に直接関わるものではないことが明らかとなった。また、データベース上のアミノ酸配列から、COPII コートのサブユニットである Sec23 と相同性を示し、COPII コートと結合することが予想される機能未知タンパク質をクローニングし、この因子を Nel1 と命名して機能解析を行ったところ、低分子量 GTPase である Sar1 に結合して GAP 活性を示すものの、Sec23 とは異なり Sec24 サブユニットとは複

合体を形成しないことが明らかとなった。また、Sar1-Nel1 複合体は膜上に Sec13/31 をリクルートしないことも明らかにした。さらに Nel1 の細胞内局在を解析したところ、小胞体膜上でドット状に局在する Sec23 とは異なり、このタンパク質は細胞質全体に局在するのに加えて核内にも局在することを明らかにし、小胞体からの小胞輸送において重要な役割を果たしている Sar1 の制御を行う新規のタンパク質を同定した。

さらに、細胞内における小胞輸送と Nel1 の機能との相関を調べるため、ER からの COPII 小胞の形成に関わる因子群と Nel1 との遺伝学的相互作用を調べたところ、Nel1 の遺伝子を欠損させることにより、COPII 小胞の形成の調節で中心的な役割を果たす低分子量 GTPase Sar1 の温度感受性変異である sar1D32G と合成的に生育を抑制することから、細胞内における Nel1 の輸送反応への関与が示された。また、Nel1 の核への局在について解析を行ったところ、熱ショックなどのストレスに応答して Nel1 の核への移行が制御されていることを見いだした。これらのことから、Nel1 は COPII コートの構成因子ではないものの、Sar1 の機能の制御を通じて小胞体における ER exit site の形成を調節している可能性が示唆される。

ER exit site の構築に深く関与することが示唆されている Sec16 の機能解析では、Sec16 の CCD ドメインと呼ばれる種間で保存性の高い領域が、小胞体膜への結合に重要な役割を果たしており、さらに、小胞体膜上の低分子量 GTPase である Sar1 が Sec16 の C 末端領域を膜につなぎとめている可能性が高いことが明らかとなった。また、CCD より上流に位置する Sec16 の N 末端領域が細胞内における COPII コートのアセンブリーを促進することを見いだし、以前同定した C 末端領域の Sar1 の GTPase 活性を抑制する機能と合わせて、Sec16 の N 末端領域、中央に位置する CCD 領域、および C 末端領域のそれぞれが果たす役割について明らかにすることができ、ER exit site 形成メカニズムの一端について明らかにすることができた。これらの結果から、Sec16 はこれまで示唆されていた COPII 小胞形成の単なる足場としてだけではなく、COPII コートのアセンブリーにも積極的に関わっている可能性が示唆された。

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 3 件)

Iwasaki, H., Yorimitsu, T., Sato, K. "Distribution of Sec24 isoforms to each ER exit site is dynamically regulated in *Saccharomyces cerevisiae*" FEBS Lett., 査読有, 589, 2015, 1234-1239.

Yorimitsu, T., Sato, K., Takeuchi, M.
“Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases
in vesicular trafficking in yeast and
plants” Front. Plant. Sci., 査読有, 5,
2014, 411.

Kodera, C., Yorimitsu, T., Sato, K.
“Sec23 homolog Nel1 is a novel
GTPase-activating protein for Sar1 but
does not function as a subunit of the COP11
coat” J. Biol. Chem., 査読有, 289, 2014,
21423-21432.

〔学会発表〕(計 10 件)

依光朋宏、佐藤 健:「Sec16N 末端領域に
よる COP11 タンパク質の制御と COP11 小胞
の形成機構」第 88 回日本生化学会大会
2015 年 12 月 3 日 神戸国際会議場(兵庫
県神戸市)

岩崎寛彦、佐藤 健:「Visualization of
COP11 minimal machinery during membrane
association in an artificial planar
lipid bilayer」新学術領域「動的秩序と
機能」第 4 回公開国際シンポジウム 2015
年 11 月 22 日 九州大学・西新プラザ(福
岡県福岡市)

佐藤 健:「小胞体における輸送小胞形成
の時空間制御」第 13 回日本糖鎖科学コン
ソーシアムシンポジウム 2015 年 10 月 19
日 愛知県産業労働センター(愛知県名古屋
市)

岩崎寛彦、佐藤 健:「動的解析により得
られた COP11 小胞形成因子の膜への集合モ
デル」第 67 回日本細胞生物学会 2015 年
6 月 30 日 タワーホール船堀(東京都江戸
川区)

岩崎寛彦、佐藤 健:「人工脂質平面膜を
用いた COP11 小胞形成因子の動態解析」第
87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15
日 国立京都国際会館(京都府京都市)

依光朋宏、佐藤 健:「COP11 小胞形成に
おける Sec16N 末端領域の機能解析」第 87
回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日
国立京都国際会館(京都府京都市)

佐藤 健:「出芽酵母をモデルとした小胞
体における輸送小胞形成の時空間制御」第
186 回酵母細胞研究会例会 2014 年 7 月 11
日 キリンビール(株)横浜工場総合棟ホ
ール(神奈川県横浜市)

依光朋宏、佐藤 健:「Sec16 による ER
exit sites 形成メカニズムの解析」第 86
回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小寺千絵、依光朋宏、佐藤 健:「出芽酵
母における新規 Sar1 GAP, Nel1 の解析か
ら見出された核内 Sar1 の機能」第 86 回日
本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシ
フィコ横浜(神奈川県横浜市)

岩崎寛彦、依光朋宏、佐藤 健:「出芽酵
母における小胞体出口部位の多様性につ
いての解析」第 86 回日本生化学会大会

2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈
川県横浜市)

〔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