

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840042

研究課題名(和文)新規輸送キャリアーによるゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送機構の解明

研究課題名(英文)Novel carrier-mediated protein transport from the Golgi complex to the cell surface

研究代表者

若菜 裕一(Wakana, Yuichi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：90635187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは以前、ゴルジ体から細胞膜への輸送を仲介する新規輸送キャリアー、CARTSを同定した。今回、私たちはCARTSの微小管上の移動にキネシン-5/Eg5が関与することを報告する。Eg5は分裂期細胞において、双極性紡錘体の形成に働くことでよく知られており、この研究成果は新たに、Eg5の間期における機能を示すものである。また、私たちはCARTSの形成に小胞体-ゴルジ体接触部位における脂質輸送が必要であることを明らかにした。このことは、ゴルジ体における輸送キャリアー形成制御に小胞体が直接的に関わることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have identified a new class of Golgi-to-cell surface carriers, CARTS. Here we report that kinesin-5/Eg5 is involved in migration of CARTS on microtubules. Eg5 is well known for its function in bipolar spindle assembly in mitotic cells and our results have revealed its new role in non-mitotic cells. We have also shown that CARTS biogenesis requires lipid transfer at the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi contact sites, which suggests a direct role of the ER in regulating transport carrier formation at the Golgi complex.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞輸送 輸送キャリアー ゴルジ体 細胞膜 小胞体 キネシン 膜接触部位

1. 研究開始当初の背景

種々のサイトカインやホルモン、細胞外マトリックス構成因子(コラーゲンなど)は、トランスゴルジ網(TGN)において輸送キャリアーに選択的に取り込まれて細胞膜へと運ばれ、分泌される。小胞輸送の分岐点であるTGNは、タンパク質選別の場として機能し、小胞体で合成されゴルジ体へと輸送された積み荷タンパク質をそれぞれの最終目的地(細胞膜やエンドソーム/リソソーム、分泌顆粒、小胞体など)へと振り分ける働きを持つ。したがって、TGNにおいて適切な積み荷を搭載した輸送キャリアーを形成することは、タンパク質分泌だけでなく、オルガネラが正常に機能する上でも必要不可欠である。また、細胞膜構成タンパク質の適切な輸送(頂端部・側底部への配置)は、細胞極性の形成と密接に関わることから、TGNにおける積み荷選別・輸送キャリアー形成の分子メカニズムの解明は、分化や組織形成の仕組みを理解するためにも非常に重要である。

私たちは以前、TGNにおける輸送キャリアー形成を *in vitro* で再構築し、細胞膜への輸送に関わる新規の輸送キャリアーを単離、同定した(Wakana et al., EMBO J, 2012)。私たちが CARTS (CARriers of the TGN to the cell Surface) と名付けたこの輸送キャリアーは直径が 100~250 nm で、コラーゲンなどの大きな積み荷は含まず、主に低分子タンパク質の輸送に関与していると考えられた。それまでの解析から、CARTS は TGN46 や PAUF (pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor)、lysozyme C、デスモソーム構成因子などの輸送に働くことが示唆されていた。また、CARTS 膜には低分子量 G タンパク質である Rab6 や Rab8 の他、シナプス小胞の融合に働くことが知られるシナプトタグミン II が存在し、これらが CARTS と細胞膜の融合に働くと考えられた。興味深いことに、CARTS は従来の輸送マーカーである VSV-G (水疱性口内炎ウィルスのコートタンパク質) を含まないことがわかり、VSV-G の輸送とは異なる経路を仲介することが明らかになった。CARTS の形成には、プロテインキナーゼ D (PKD) による TGN 膜の切断が必要であることがわかっていたが、CARTS への積み荷の選択的な取り込みやそれに基づく CARTS の形成制御の仕組み、また、CARTS の移動や細胞膜への標的化・融合の詳細な分子メカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) TGN における積み荷の選別と輸送キャリアーへの搭載の分子メカニズムの解明: 以前確立した *in vitro* CARTS 形成実験系(Wakana et al., EMBO J, 2012) を利用し、TGN 内腔の pH や Ca^{2+} レベルを変化させる種々の薬剤処理条件下での CARTS 中の積み荷タンパク質(TGN46 および PAUF) の量を直接モニターする。これによって、積み荷選別と搭載の仕組

みを明らかにする。また、PAUF の選別シグナルを明らかにする。

(2) CARTS の輸送、細胞膜への標的化・融合を司る分子メカニズムの解明: 予備的なデータから、CARTS が仲介する分泌経路への関与が示唆されていたキネシン-5 (Eg5) について live cell imaging を駆使し、CARTS 輸送への関与を調べる。また、シナプトタグミン II と VAMP3 (予備的なデータから CARTS に局在することが示唆された SNARE タンパク質) に着目し、CARTS と細胞膜の融合の仕組みを明らかにする。

(3) デスモソーム構成タンパク質の輸送とデスモソーム形成調節メカニズムの解明: 細胞内の主要な機能には調節システムが関わっている。一方、小胞輸送制御の分子メカニズムはあまりわかっていない。例えば、恒常的に活性化型で存在する PKD 変異体の過剰発現は、全てのゴルジ体膜の小胞化を引き起こすことがわかっている。膜切断は輸送キャリアーのもととなる膜に適切な積み荷が搭載された後に行われなければならない。この点からも輸送キャリアー形成には厳密な調節システムが不可欠であると考えられる。PKD は積み荷タンパク質を起点とするシグナル経路によってその活性を制御されている可能性があり、CARTS の積み荷タンパク質であるデスモソーム構成因子に着目して PKD の上流を解明する。この研究は CARTS を介したデスモソーム形成調節メカニズムの解明につながると思われる。

3. 研究の方法

(1) CARTS に含まれる積み荷分泌タンパク質、PAUF を検出するため、抗原タンパク質を大腸菌より精製し、ウサギに免疫して抗 PAUF ラビットポリクローナル抗体の作製を行った。また、MycHis タグを付加した PAUF 安定発現 HeLa 細胞株の作製を行った。

CARTS への搭載に働く PAUF の選別シグナルを明らかにするため、予備的な解析からシグナルの存在が推測されていた C 末端側に着目し、複数の C 末端側欠失 PAUF 変異体を HeLa 細胞に発現させ、分泌実験ならびに免疫蛍光染色による局在解析を行った。

(2) CARTS が微小管上を移動するかどうか明らかにするため、HeLa 細胞に mRFP を融合させた PAUF (CARTS マーカー) と、GFP を融合させた α -tubulin (微小管マーカー) を共発現させ、live cell imaging を行った。

CARTS の移動に Eg5 のモーター活性が必要であるかどうかを検証するため、ATPase 活性を消失させた Eg5 T112N 変異体(112 番目のスレオニンをアスパラギンに置換)を HeLa 細胞と 293T 細胞に過剰発現させ、ドミナントネガティブとしての PAUF 分泌および CARTS 動態への影響を調べた。

Eg5 が CARTS 輸送に特異的に関与するかどうかを明らかにするため、CARTS とは異なる経路で輸送される VSV-G 動態への Eg5 阻害剤 (monastrol) ならびに T112N 変異体過剰発現の影響を調べた。

Eg5 および微小管が CARTS 形成に関与するかどうかを明らかにするため、in vitro CARTS 形成実験系を用い、monastrol ならびに微小管重合阻害剤 nocodazole の効果を調べた。具体的には、界面活性剤であるジギトニンで細胞膜透過処理を施したセミインタクト細胞にサイトソル (ラット肝臓より調製) と ATP 再合成系を加えることで CARTS 形成を誘導し、薬剤の影響を調べた。

(3) PKD 上流の分子メカニズムを解明するため、当初の計画とは異なるが、TGN への脂質供給経路に着目した。PKD の TGN 膜へのリクルートにはジアシルグリセロールが必要であることがわかってきた。ジアシルグリセロール産生経路は複数あるが、セラミドからの代謝が重要ではないかと考え、小胞体-ゴルジ体接触部位でセラミド輸送に関わる VAMP-associated protein (VAP) に着目した。細胞質全体に広がる小胞体は、細胞膜やミトコンドリア、エンドソーム、ゴルジ体との間にわずかに 10~20 nm を隔てて膜を並置させた膜接触部位と呼ばれるサブドメインを形成することが明らかになっている。近年の研究から、膜接触部位は脂質輸送・代謝、Ca²⁺ シグナリングの場として機能し、オルガネラの協調的な制御に関わる可能性が示されている (Prinz, J Cell Biol, 2014)。小胞体-ゴルジ体接触部位での脂質輸送が CARTS を介したタンパク質輸送に関与するかどうかを VAP 発現抑制によって調べた。

4. 研究成果

(1) 抗 PAUF 抗体と PAUF-MycHis 安定発現株を得ることができたものの、いずれを用いても in vitro 実験系で合成・単離された CARTS に含まれる PAUF の検出には抗体の力価が十分でなかった。しかし、PAUF-MycHis 安定発現株を使用することで、これまで困難であった CARTS 形成量の変化を免疫蛍光染色で観察することが可能になり、後述 (3) の VAP 発現抑制による CARTS 形成への影響を明らかにすることができた。従来の輸送マーカーである VSV-G は膜タンパク質であるため、温度感受性変異体を用いて同調的な輸送を行った場合でも、細胞膜の染色がバックグラウンドとなり、TGN 由来の輸送キャリアーを明確に観察することができなかった。また、人工的な分泌マーカーである ssHRP (シグナルペプチドを付加した horse radish peroxidase) の場合には、小胞体の染色が主であり、やはり TGN 由来の輸送キャリアーは観察できなかった。今回得られた PAUF-MycHis 安定発現株では、バックグラウンドが低く CARTS が明瞭に観察され、各細胞における CARTS 数もほぼ

一定であった。そのため、この細胞を利用することによって、TGN からの輸送キャリアー形成を定量的に解析することが可能になった。

各種欠変異体を用いた解析から、PAUF の C 末端側の 30 アミノ酸が小胞体からの輸送に必要なシグナルである可能性が示唆された。だが、ゴルジ体からの輸送が特異的に阻害される変異体は見出すことができず、CARTS への搭載を司る選別シグナルの同定には至らなかった。

(2) PAUF-mRFP と GFP- α -tubulin を共発現させ live cell imaging を行うことにより、CARTS が微小管上を移動する様子を観察することに成功した。また、Eg5 T112N 変異体の過剰発現により、PAUF の分泌が顕著に抑制されることがわかった。免疫蛍光染色の結果、T112N 変異体発現細胞では CARTS がゴルジ体周辺に蓄積することがわかった。また、この時、CARTS の移動速度が低下していることが live cell imaging 解析から明らかになった。興味深いことに、monastrol 処理や T112N 変異体の過剰発現は VSV-G の輸送に影響を与えないことがわかり、Eg5 が特異的に CARTS 輸送に関わることが示された。

monastrol や nocodazole を用いて、それぞれ Eg5、微小管の機能を阻害しても in vitro 実験系における CARTS 形成には影響が認められず、これらが CARTS 輸送に特異的に関わることを示唆された。

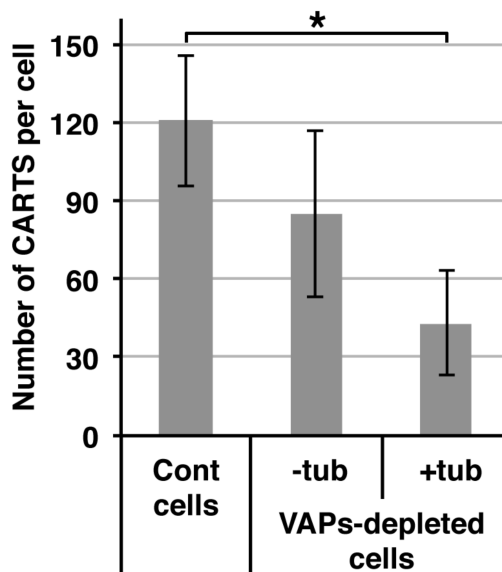
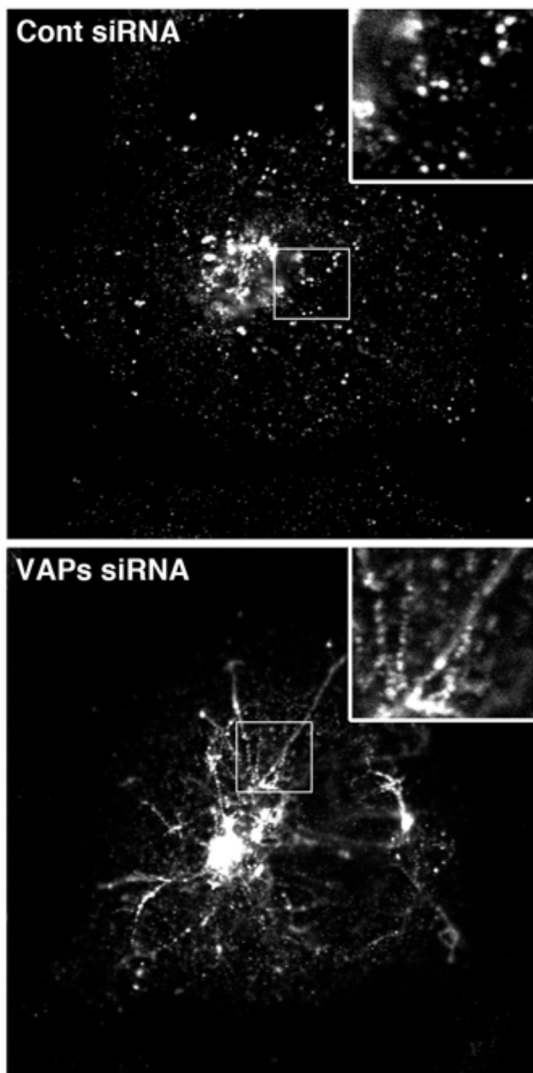
Eg5 は分裂期細胞において紡錘体形成に働くことが知られており、この研究成果は新たに Eg5 の間期における機能を示すものである。興味深いことに、Eg5 はホモ四量体を形成し、二量体からなる 2 つのモーター部位が逆平行に並んだ二本の微小管をスライドさせることで双極性の紡錘体の形成を促す。このことは間期における CARTS 輸送も逆平行微小管の滑り込みというこれまでと全く異なる仕組みで行われている可能性を示唆している。また、Eg5 が VSV-G を運ぶキャリアーの輸送には関与せず、CARTS の輸送に特異的に関わるという発見は、これまで広く用いられてきた VSV-G 輸送実験系では見落とされていた分子が存在している可能性を示しており、PAUF 分泌実験系や CARTS 輸送実験系によって、これらを再評価できるかもしれない。

CARTS の細胞膜への融合の仕組みを明らかにするため、シナプトタグミン II と VAMP3 の関与を調べた。シナプトタグミン II の発現抑制による PAUF の分泌への影響を調べたが、顕著な効果は認められなかった。また、PAUF-MycHis 安定発現株で VAMP3 を発現抑制し、CARTS が細胞膜付近に蓄積するかどうかを調べたが、期待された効果は得られなかった。

(3) VAP の発現抑制により、PAUF のプロセシングと分泌が阻害されることがわかった。

VAP と結合して脂質輸送に関わる ceramide transfer protein (CERT) および oxysterol binding protein (OSBP) (それぞれセラミド、コレステロールの輸送を行う) の発現抑制によっても PAUF のプロセッシングと分泌が阻害されたことから、VAP を介した小胞体-ゴルジ体接触部位における脂質輸送が CARTS 形成に必要であることが示唆された。VAP を発現抑制した細胞では、PKD の TGN 膜へのリクルートが抑制されていることが確認された。また、TGN のラフト様構造の構築を妨げる短鎖セラミドで細胞を処理することによって、VAP の発現抑制と類似のフェノタイプが得られたことから、セラミドより合成されたスフィンゴミエリンとコレステロールはラフト様構造を形成し、PAUF のプロセッシングと輸送を制御するのではないかと考えられた。

前述(1)の PAUF-MycHis 安定発現株において VAP を発現抑制した結果、PAUF 含むチューブ構造 (tub) がゴルジ体より伸長するとともに、CARTS の数が減少していることがわかった (下図)。



類似のフェノタイプは、キナーゼ活性を消失した PKD のドミナントネガティブ変異体の過剰発現によって引き起こされることが明らかになっており、VAP の発現抑制は PKD による膜切断を阻害することが示唆された。

VAP を発現抑制したセミインタクト細胞を用いた *in vitro* CARTS 形成実験の結果、コントロールに比べて VAP 発現抑制では CARTS 形成量が低下することが示された。

これまでの研究から、TGN における輸送キャリアー形成には、様々な脂質が関与することが明らかになってきたが、それらの脂質を適切な場所に適切なタイミングで供給する分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究成果はその意味で意義深く、当初の目的であった PKD 上流のシグナル経路の一端が解明できたと考えている。これまでに得られたデータに基づき、私たちは現在、以下のモデルを考えている。小胞体-ゴルジ体接触部位において、VAP は CERT や OSBP と複合体を形成し、それぞれセラミドとコレステロールを TGN へ輸送する。セラミドの代謝産物であるジアシルグリセロールとスフィンゴミエリンは、それぞれ PKD のリクルートと、脂質マイクロドメイン (コレステロールと結びついたラフト様構造) の形成に働く。このような脂質マイクロドメインは、プロセッシングに関わる糖鎖修飾酵素だけでなく、積み荷の選別や膜の屈曲と切断に関わる分子群の集積や活性調節に重要であると考えられる。

私たちの研究成果は、TGN における輸送キャリアー形成が、別のオルガネラである小胞体によって直接的に調節されていることを示唆しており、小胞輸送研究に新たなパラダイムを創出するものであると考えている。また、この成果は小胞輸送における小胞体の役割がこれまで考えられていた以上に広範囲に渡ること示唆しており、オルガネラ間の協調的な制御機構の重要性を示すものであると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wakana Y, Villeneuve J, van Galen J, Cruz-Garcia D, Tagaya M, Malhotra V., Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface, *J. Cell Biol.* 202:241-250, 2013. 査読あり DOI:10.1083

〔学会発表〕(計 3 件)

若菜 裕一、小竹 莉愛、大山 南菜子、多賀谷 光男、VAP が仲介する小胞体-トランスゴルジ網 (TGN) 接触部位における脂質輸送は、TGN からの輸送小胞形成に必要である、第 87 回日本生化学会大会、2014/10/15-18、京都府・京都市

大山 南菜子、若菜 裕一、小竹 莉愛、多賀谷 光男、脂質ホスファターゼ Sac1 は VAP と相互作用し、トランスゴルジ網に近接した小胞体サブドメインに共局在する、第 87 回日本生化学会大会、2014/10/15-18、京都府・京都市

Wakana Y, Villeneuve J, van Galen J, Cruz-Garcia D, Tagaya M, Malhotra V., キネシン-5/Eg5 はトランスゴルジ網から細胞膜への CARTS の輸送に関与する、第 86 回日本生化学会大会、2013/9/11-13、神奈川県、横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

若菜 裕一 (WAKANA, Yuichi)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：9 0 6 3 5 1 8 7