

論文の内容の要旨

論文題目 小胞体上の分泌タンパク質出芽部位 ER exit site の局在制御機構

氏名 篠原 健太郎

【序論】

小胞体は細胞質全体に大きく広がった膜構造を形成し、分泌タンパク質が合成されるオルガネラである。合成された分泌タンパク質は、小胞体上の特殊なドメインである ER exit site において COPII 被覆小胞に積み込まれて出芽し、ゴルジ体を経て細胞外へと分泌される (図 1 A)。

ER exit site は、哺乳動物の 1 細胞あたり数百個存在し、細胞質全体に広く分布している。また、その細胞内局在には特徴があり、核近傍側ではお互いに密集して局在するのに対し、細胞質側では一つ一つが離れて局在している (図 1 B)。

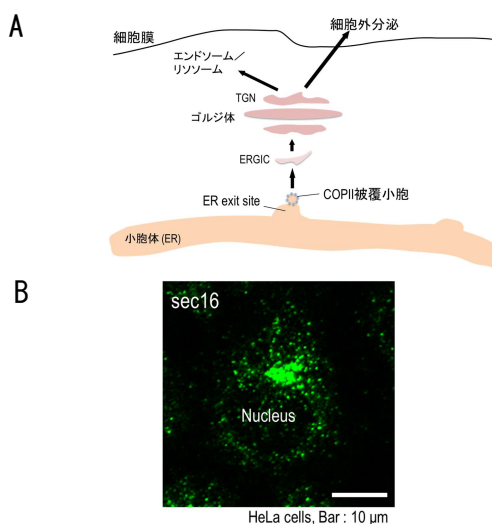


図 1. 分泌経路と ER exit site の局在

A. 細胞内における分泌タンパク質の分泌経路

B. ER exit site の細胞内局在 (Sec16: ER exit site)

細胞内の全ての ER exit site は、COP II 被覆小胞の出芽部位として同様に機能するものとして考えられていたが、核近傍側に密集した ER exit site は、巨大分子コラーゲンの分泌に必要であることを示唆する知見が報告された。このことは、核近傍側の ER exit site と細胞質側の ER exit site との間で機能や分泌動態に違いがあることを示唆している。また、小胞体からの輸送機構を解明するためには、COP II 被覆小胞の形成や輸送に着目した解析だけでなく、ER exit site の細胞内局在に着目した解析も重要であることを示唆するものである。しかしながら現在、ER exit site の細胞内局在に着目した知見は乏しく、核近傍側と細胞質側の ER exit site との間で機能や分泌動態の違いを生じさせる分子機構は不明である。

本研究では、細胞内の ER exit site を核近傍側に密集した群と細胞質側に点在した群とに分類し、pH 変化に伴って ER exit site の局在が両群の間で大きく変化することを新たに見出した。さらに、これを一つの手段として用いることで、それぞれの細胞内局在制御に関与する分子機構の解析を行った。

【結果】

1、細胞培養液 DMEM の pH によって ER exit site の局在が可逆的に大きく変化する

HeLa 細胞を異なる pH の培養液 DMEM で培養したところ、ER exit site の局在が大きく異なる様子が観察された。中性条件 (pH=7.4) では核近傍と細胞質全体に存在する ER exit site が、酸性条件 (pH=6.8) では核近傍の密集が消失し、細胞質全体に広く点在した。さらに、塩基性条件 (pH=7.8) では主に核近傍への密集のみが観察された (図 2 A)。次に、あらかじめ酸性条件で培養した後に、塩基性条件で培養すると、細胞質全体に点在していた ER exit site が核近傍に集積する様子が認められた (図 2 B)。よってこの現象が pH に依存して可逆的であることが明らかとなった。

2、ER exit site は小胞体膜上を移動している

次に本現象が小胞体膜上の変化を伴っているか解析する目的で、ER exit site に局在する膜タンパク質である Sec12 の局在を評価した。その結果、Sec12 も DMEM の pH によって局在が大きく変化する様子が観察された (図 3)。次に Nikon spinning disk 共焦点顕微鏡を用いて塩基性側から酸性側に培養条件を変更したときの ER exit site の局在を経時的に観察した。その結果、核近傍に密集していた ER exit

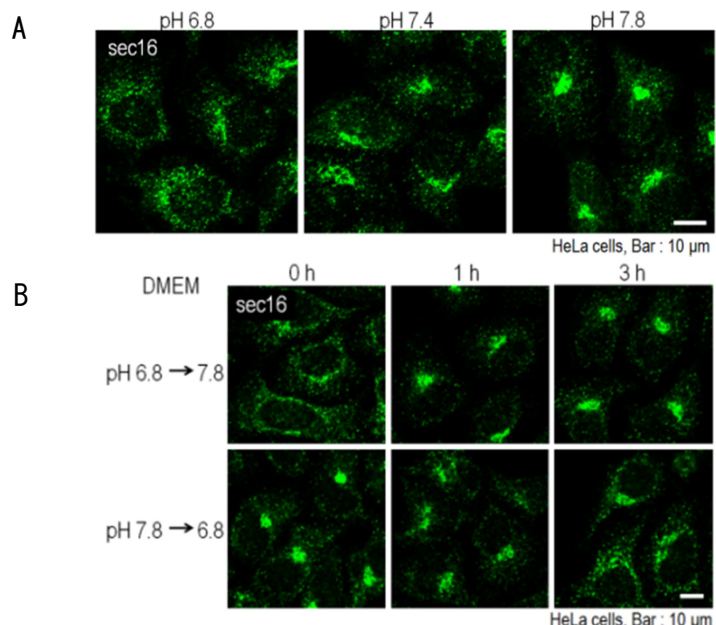


図 2. 免疫染色法による ER exit site の局在評価

A. 異なる pH 値の DMEM で培養したときの

ER exit site の局在変化

B. 酸性側と塩基性側条件の DMEM で培養したときの

ER exit site の可逆的局在変化

siteが時間経過とともに細胞質側全体に拡散していく様子が観察された。この結果から、ER exit siteの局在変化は生成と消失によらず、ER exit siteを形成するタンパク質が小胞体膜上を移動していくことで達成されることが示唆された。

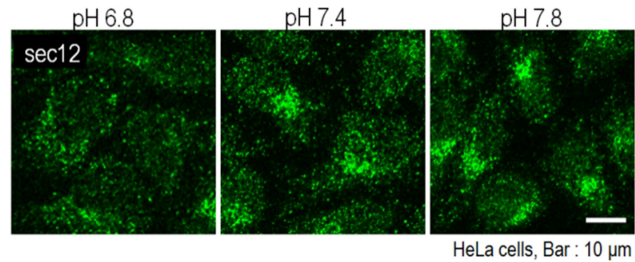


図3. 異なる pH の DMEM で培養したときの小胞体膜タンパク質 Sec12 の局在変化

3. ER exit site の核近傍側への移動には Dynein-1 が関与している

オルガネラの局在制御に微小管が関与していることが知られている。そこで、本現象に対する微小管の関与を検討した。微小管脱重合剤 Nocodazole 処理を行うと、塩基性条件での培養時における ER exit site の核近傍の集積が抑制された (図 4 A)。従って、ER exit site の各近傍への集積に微小管の関与が示唆された。

次に、ER-Golgi 間の輸送に関与するモーター分子である Kinesin-1 (KIF5B) と Dynein-1 をそれぞれ発現抑制したときの ER exit site の局在変化を評価した。その結果、Kinesin-1 を発現抑制しても ER exit site の局在変化に影響は見られなかったが (図 4 B)、Dynein-1 を発現抑制すると、塩基性条件の培養時における ER exit site の核近傍側への集積が大きく抑制された (図 4 C)。以上のことから、ER exit site の核近傍側への移動に Dynein-1 の関与が明らかとなった。

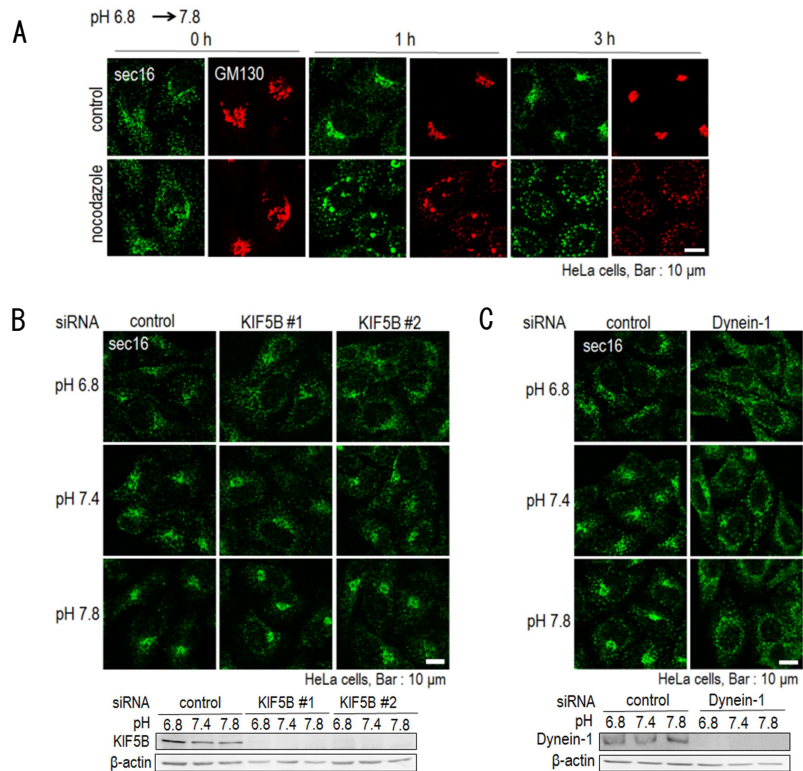


図4. モータータンパク質による ER exit site の局在制御への関与の評価

A. Nocodazole 処理下で酸性側から塩基性側に培養条件を変更したときにおける ER exit site の局在変化

B、C. Kinesin-1 発現抑制 (B)、Dynein-1 発現抑制 (C) 下で異なる pH の DMEM で培養したときの ER exit site の局在変化

4、Dynein-1はSec23Aとp150Gluedを介してER exit siteの局在制御機構に関与する可能性がある

p150Gluedは、細胞質ダイニンが微小管上で機能するために必要となるDynactin複合体の構成因子であり、ER exit siteに局在する内側被覆タンパク質Sec23Aと直接結合することが知られている。そこで、Dynein-1はp150GluedとSec23Aとの結合を介してER exit siteの局在制御に関与する可能性を考え、p150GluedとSec23Aのそれぞれを発現抑制したときのER exit siteの局在変化を

評価した。その結果、p150Glued、Sec23Aのいずれを発現抑制しても塩基性条件の培養時に生じるER exit siteの核近傍への集積が抑制された(図5 A、B)。一方、ER exit siteに局在する別の被覆タンパク質Sec31Aを発現抑制したときには、ER exit siteは核近傍に集積したままであった(図5 B)。従って、Dynein-1によるER exit siteの核近傍への移行は、p150GluedとSec23Aとの結合を介する可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私は、pHによるER exit siteの局在変化を手段として用いることで、ER exit siteの局在がダイニンモータータンパク質により制御されていること、さらにその制御には、Dynactin複合体の構成因子p150 GluedとER exit siteに局在する内側被覆タンパク質Sec23Aとの直接的な結合が必要である可能性を新たに見出した。

p150 GluedとSec23Aとの結合はまた、COP II被覆小胞の小胞体からの効率的な輸送に関与しており、両者の結合が阻害されるとその輸送が遅延することが報告されている。これらのことから、p150 GluedとSec23Aとの結合を介したDynein-1によるER exit siteの核近傍側への集積と、p150GluedとSec23Aとの結合による小胞体からの効率的な輸送が共役的に機能することによって、核近傍側に密集したER exit siteでは効率的な輸送が生じている可能性が考えられる。

今後は、この分子機構が巨大分子コラーゲンの分泌に対してどのように関与するのかを解析することによって、ER exit siteの細胞内局在の違いに応じた機能のさらなる解明につながると考えられる。

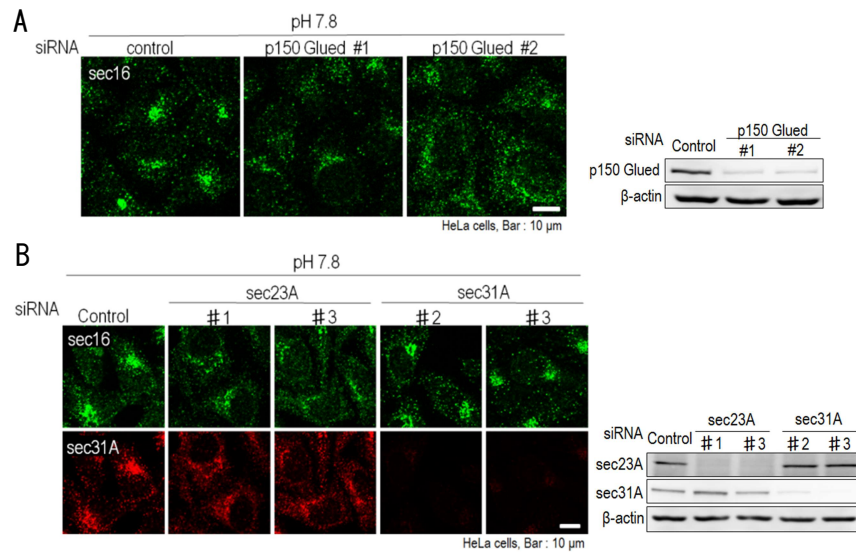


図 5. p150Glued、Sec23A による ER exit site の局在制御への関与の評価

A、B. p150Glued 発現抑制 (A)、Sec23A 発現抑制 (B) 下で塩基性条件の DMEM で培養したときの ER exit site の局在変化