

博士論文

COPII 小胞形成因子及び Sec16 の人工脂質膜上
における集合ダイナミクスの解析

岩崎 寛彦

目次

略語	(3)
----------	-----

第 1 章 序論

1.1 真核細胞における小胞輸送システム	(5)
1.2 小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送	(6)
1.3 COPII 小胞形成因子と COPII 小胞の形成	(8)
1.4 Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる cargo 濃縮機構	(12)
1.5 ER exit site と Sec16	(15)
1.6 ゴルジ体膜上での COPII 小胞の膜融合	(17)
1.7 研究目的と研究手法	(19)

第 2 章 材料と方法

2.1 プラスミド作成	(25)
2.2 タンパク質精製及び蛍光標識	(27)
2.3 プロテオリポソームの作成	(31)
2.4 蛍光顕微鏡	(33)
2.5 人工脂質平面膜の作成と膜タンパク質の再構成	(33)
2.6 人工脂質平面膜上での蛍光標識したタンパク質の解析	(34)
2.7 トリプトファン蛍光強度解析	(35)
2.8 プロテオリポソームを用いたチューブネットワーク構造の再構成	(36)

第3章 結果

3.1 cargo クラスタ形成過程において Sar1 はクラスタ辺縁部に局在する	(39)
3.2 Sar1 は cargo クラスタにおいて COPII コートの維持に必須な因子ではない	(51)
3.3 Sec12 は cargo クラスタから排除される	(59)
3.4 cargo クラスタ形成における Sec16 の動態	(68)
3.5 小胞体チューブネットワーク構造の再構成	(76)
第4章 考察	(80)
第5章 参考文献	(91)
謝辞	(103)

略語

COPII: coat protein complex II

ERES: ER exit site

GAP: GTPase-activating protein

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protein

GDP: guanosine diphosphate

GMP-PNP: guanosine-5'-[(β,γ)-imido]triphosphate

GTP: guanosine-5'-triphosphate

第 1 章 序論

1.1 真核細胞における小胞輸送システム

真核細胞において、新たに合成されたタンパク質が正しく機能を発揮するためには目的地に適切な経路を経て運ばれることが不可欠である。核や小胞体で働くタンパク質はリボソームで合成されそれぞれのオルガネラに直接移行する。一方で、ゴルジ体や液胞（リソソーム）そして細胞膜などで働くタンパク質はリボソームで合成されたのちに小胞体を経てオルガネラ間を移行し目的のオルガネラへと運ばれる。オルガネラ間でのタンパク質輸送は、コートタンパク質と呼ばれるタンパク質複合体により被覆された輸送小胞を介して行われている。この輸送小胞による小胞輸送システムは全ての真核細胞に保存されており、タンパク質の輸送だけでなく脂質の輸送に関しても重要な役割を担っている。

輸送小胞はコートタンパク質複合体が低分子量 GTPase の制御を受けながら供与オルガネラ膜上に集まり、積荷タンパク質 (cargo) を取り込みながら膜を湾曲させ、最終的に膜を縊り切ることで形成される。供与オルガネラから遊離した輸送小胞は細胞内を移動し、標的オルガネラ膜に係留された後、膜融合を起こすことでタンパク質を目的のオルガネラへと選別輸送する。この輸送小胞を用いた輸送経路には様々な経路があり、それぞれの輸送ルートごとに異なる種類のコートタンパク質によって小胞が被覆されている。

1.2 小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送

新たに合成された新生タンパク質は小胞体で適切なフォールディングを受けた後、下流のオルガネラへと運ばれる。実際に細胞内に存在するタンパク質の約3分の1が小胞体から運び出されていると見積もられている。小胞体からゴルジ体へタンパク質を輸送する経路では、COPII (coat protein complex II) とよばれるコートタンパク質複合体により被覆された COPII 小胞によりタンパク質が運ばれていると考えられている (Barlowe and Miller, 2013; D'Arcangelo et al., 2013) (Fig. 1)。

一方で、小胞体からタンパク質を運び出す輸送経路には COPII 小胞に依存しない輸送経路が存在することが示唆されている。この COPII 小胞非依存的なタンパク質の輸送は、小胞体ストレス応答や COPII 小胞による輸送経路を阻害した場合に引き起こされることが報告されており、オートファジーに関わる因子が関与していることが示唆されている (Gee et al., 2011; Malhotra, 2013)。しかしながら、出芽酵母の温度感受性変異株を用いて COPII 小胞の形成を阻害した場合、輸送されるタンパク質が小胞体に蓄積がすることが報告されている (Castillon et al., 2009)。加えて、ヒトでは COPII 小胞を形成する因子に変異が生じると疾患を誘発することも報告されている (Fromme et al., 2007; Jones et al., 2003)。これらのことから、小胞体からゴルジ体への初期分泌経路では、COPII 小胞が非常に重要な役割を果たしていると考えられている。

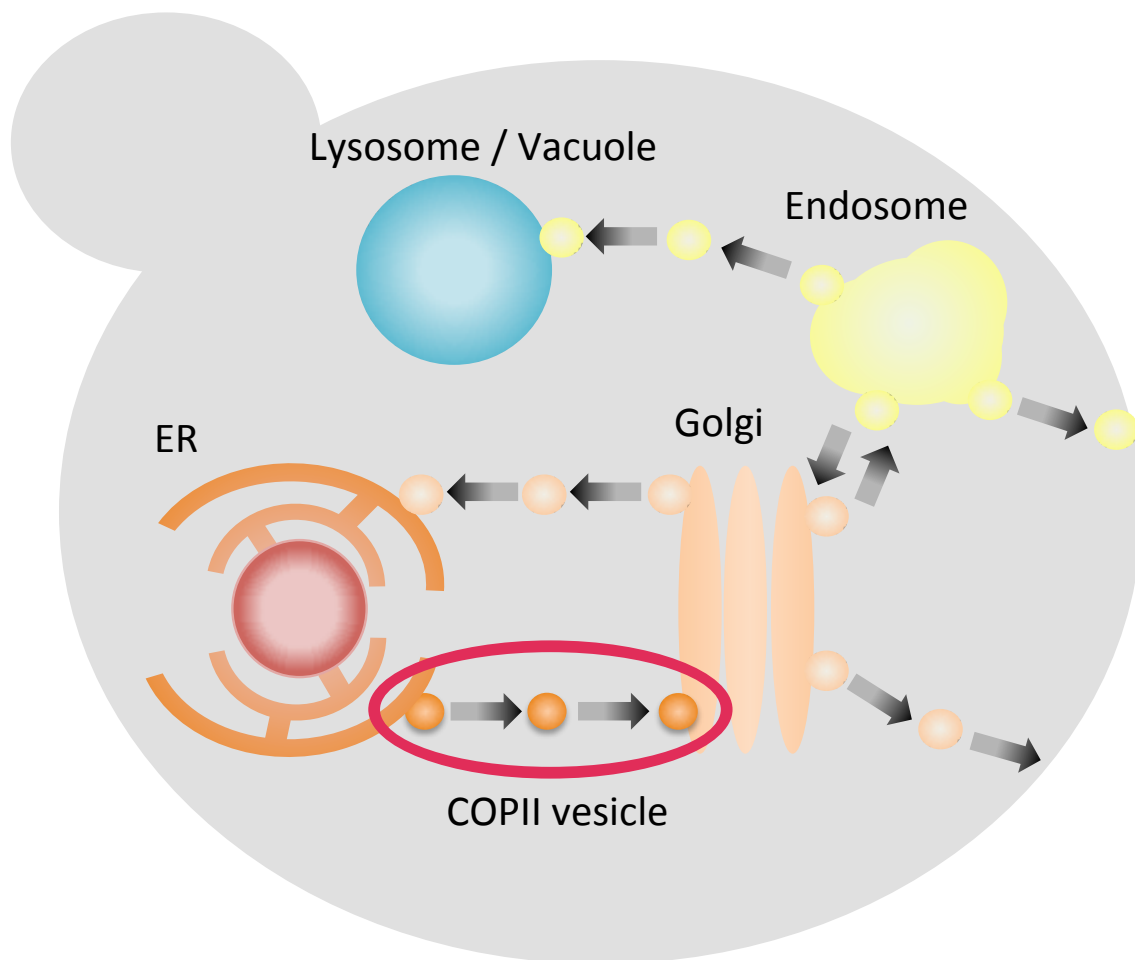


Figure 1. オルガネラ間を繋ぐ小胞輸送の模式図

オルガネラ間のタンパク質の輸送は小胞輸送により行われている。小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送はCOPIIコートによって被覆されたCOPII小胞により担われている。

1.3 COPII 小胞形成因子と COPII 小胞の形成

COPII コートは膜表面を直接覆うインナーコートの Sec23/24 ヘテロダイマー複合体とそれを覆うアウターコートである Sec13/31 ヘテロテトラマー複合体により構成される。そしてこれらの因子が小胞体膜上で低分子量 GTPase である Sar1 と共に順次相互作用することで COPII 小胞が形成される (Barlowe et al., 1994)。

小胞体膜上に局在する Sar1 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor ; GEF) である Sec12 により、Sar1 が GDP 型から GTP 型へと変換され、COPII 小胞の形成が開始される (Barlowe and Schekman, 1993; Nakano and Muramatsu, 1989)。Sar1 が GTP 型に変換されることにより N 末端領域の両親媒性ヘリックスが分子外に露出する。この構造変化により、Sar1 が両親媒性ヘリックスを介して小胞体膜と結合することが可能になる (Bi et al., 2002; Huang et al., 2001)。Sec12 は小胞体膜上にのみ局在する膜タンパク質であるため、Sar1 の膜への結合は小胞体膜のみに制限されている。膜に結合した GTP 型 Sar1 は Sec23 を介して Sec23/24 と結合する。この時 Sec24 は cargo と結合する。Sec24 と直接結合するのは特定のアミノ酸配列からなる輸送シグナルを細胞質側に提示している膜タンパク質のみであり、この輸送シグナルを介して cargo と Sec24 が結合する (Miller et al., 2002; Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003)。一方で、小胞体内腔に存在する可溶性の cargo は細胞質側の Sec24 とは直接結合することはできないが、輸送シグナルを持つ膜貫通

型レセプターを介することで Sec24 と結合する(Appenzeller et al., 1999; Belden and Barlowe, 2001)。こうして小胞体膜上に Sar1-Sec23/24-cargo からなる出芽前駆複合体が形成される。そして、この出芽前駆複合体同士を Sec13/31 が架橋することで COPII 小胞が形成されると考えられている(Bi et al., 2007; Tabata et al., 2009) (Fig. 2)。

Sec13/31 複合体は溶液中で自己集合し立方八面体もしくは二十・十二面体の中空構造の格子を形成することがクライオ電子顕微鏡解析により判明している(Stagg et al., 2008)。Sec13/31 複合体が形成する格子の頂点は4セットの Sec13/31 複合体により形成され頂点ごとに4つの Sec23/24 複合体が取り込まれる。加えて格子の一边は Sec31 同士が相互作用した Sec13/Sec31-Sec31/Sec13 によって形成されており、一边当たり2つの Sec23/24 複合体が存在している(Bi et al., 2007; Fath et al., 2007)。これらのことから、立方八面体もしくは二十・十二面体の COPII コートの格子により形成される COPII 小胞には Sec23/24 複合体がそれぞれ48分子と120分子含まれていると考えられている。

Saccharomyces cerevisiae において、cargo を COPII 小胞に積み込む役割を担う Sec24 には、Lst1 と Iss1 という2つのアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームは Sec24 と同様 Sec23 とヘテロダイマー複合体を形成し、cargo と結合する。しかしながら、Sec24 とアイソフォームでは結合可能な cargo の種類や特定の cargo に対するアフィニティーが異なることが報告されている(Miller et al., 2002; Miller et al., 2003; Peng et al., 2000)。加えて Sec23/Sec24 複合体

のみで形成される COPII 小胞は直径約 60nm であるのに対し、Sec23/Lst1 複合体を用いた場合に形成される COPII 小胞は直径約 87nm とより大きな COPII 小胞を形成することが報告されている(Shimoni et al., 2000)。

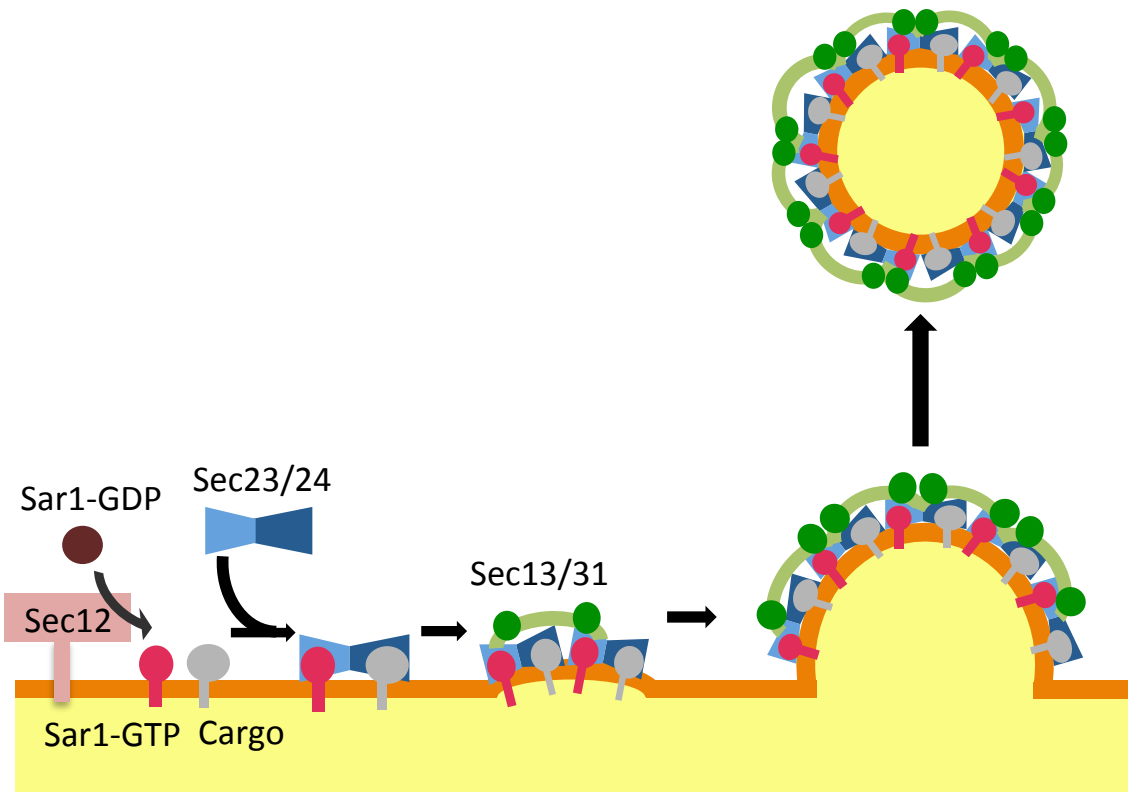


Figure 2. 小胞体膜上における COPII 小胞形成モデル

COPII 小胞の形成は、小胞体膜上のグアニンヌクレオチド交換因子である Sec12 により Sar1 が GTP 型に変換されることで開始される。GTP 型 Sar1 は膜に結合し Sec23/24 をリクルートする。そして cargo が Sec24 を介して結合し、Sar1-Sec23/24-cargo からなる出芽前駆複合体を形成する。この複合体同士を Sec13/31 複合体が架橋することで COPII 小胞が形成されると考えられている。

1.4 Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる cargo 濃縮機構

低分子量 GTPase である Sar1 は GTP 型と GDP 型をサイクルすることにより小胞体膜上への結合と解離を繰り返し、COPII 小胞の形成を制御している。上でも述べたように、GDP 型から GTP 型への変換は GEF である Sec12 により行われている。一方で、GTP 型から GDP 型への変換は Sar1 自身の GTPase 活性により行われる。Sar1 と直接結合する Sec23 は、Sar1 に対する GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein ; GAP) として働くことが報告されており (Yoshihisa et al., 1993)、Sar1 の GTPase 活性を促進する。

Sec23 と結合した Sar1 は GTPase 活性の促進を受け、速やかに GTP を加水分解し膜上から脱離する。つまり、膜上では Sar1 と Sec23/24 複合体の結合と同時に Sar1 の GTP 加水分解が起こり、Sar1 と Sec23/24 複合体の膜からの解離を引き起こす。実際に、GTP の非加水分解アナログである GMP-PNP 存在下では、リポソーム上に Sar1-Sec23/24 複合体を形成させると安定に複合体が保持されるのに対し、GTP 存在下では Sar1 の GTP 加水分解に伴い Sar1-Sec23/24 複合体が膜上から速やかに解離する。一方で、cargo を再構成したリポソームを用いて実験を行った場合、GTP 存在下では、Sar1 の GTP 加水分解後速やかに膜上から Sec23/24 複合体が解離するのではなく、Sec23/24-cargo 複合体が短時間ではあるが膜上に保持される。さらに、cargo と Sec12 存在下で同様の実験を行った場合、Sec23/24-cargo 複合体が安定して膜上に維持される (Sato and Nakano,

2005a)。以上のことは、Sar1-Sec23/24-cargo 複合体からなる出芽前駆複合体では、Sec23 の GAP 活性により Sar1 が GTP を加水分解して膜上から脱離するものの、Sec12 により速やかに GTP 型 Sar1 が供給され Sec23/24-cargo 複合体と再結合し、これを繰り返すことで出芽前駆複合体を安定に膜上に保持するというメカニズムが COPII 小胞形成機構に存在していることを示している。つまり、Sar1 が加水分解サイクルを繰り返すことにより、cargo と結合していない Sec23/24 複合体を速やかに膜上から排除し、cargo と結合した Sec23/24 複合体のみを選別することで COPII 小胞への cargo の濃縮を行っている (Fig. 3)。

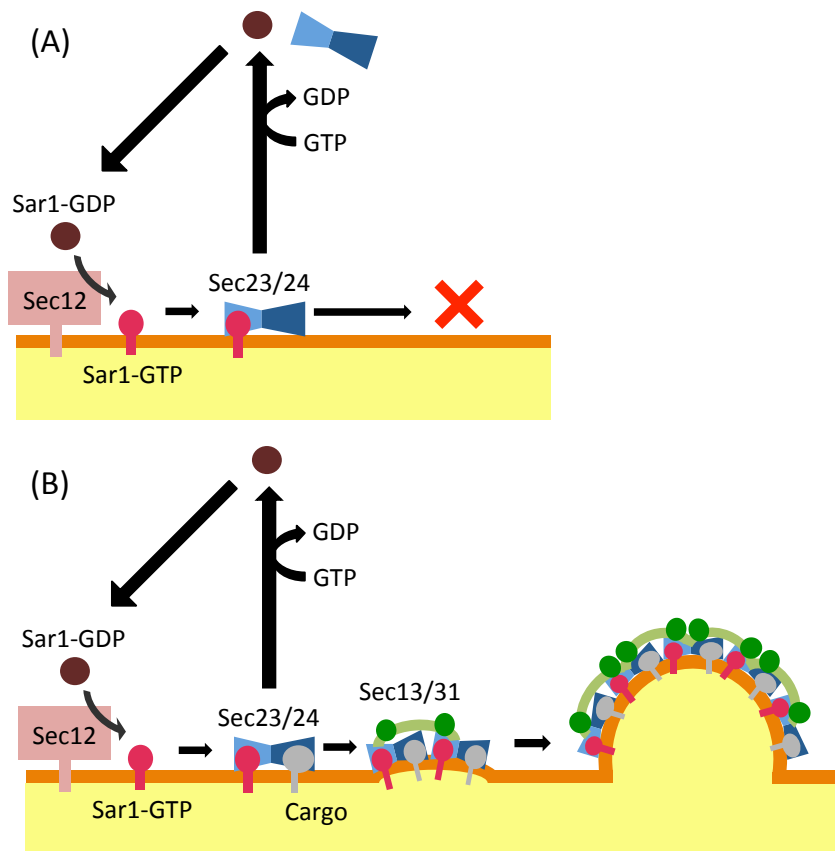


Figure 3. Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる cargo の濃縮

(A)のように小胞体膜上で Sar1-Sec23/24 複合体が形成されると、Sec23 の GAP 活性により Sar1 の GTPase 活性が促進され、GTP が加水分解されることで Sar1 は膜上から脱離する。その後 Sec23/24 も速やかに膜上から解離する。こうして cargo と結合していない Sar1-Sec23/24 複合体は COPII 小胞に取り込まれることはない。一方で(B)のように Sar1-Sec23/24-cargo 複合体の場合、Sec23 の GAP 活性により Sar1 はGTPを加水分解して膜上から脱離するものの、Sec23/24-cargo 複合体が短時間ではあるが膜上に保持され、その間に Sec12 により速やかに GTP 型 Sar1 が供給され Sec23/24-cargo 複合体と再結合し、これを繰り返すことで Sar1-Sec23/24-cargo 複合体が膜上に保持される。そして Sec13/31 により架橋されることで COPII 小胞に cargo が濃縮される。

1.5 ER exit site と Sec16

COPII 小胞は小胞体膜上のあらゆる場所で形成されるのではなく、ER exit site (ERES) と呼ばれる COPII 小胞形成因子が集合してできる特定のドメインで形成される(Bannykh et al., 1996; Budnik and Stephens, 2009; Orci et al., 1991)。小胞体はシート状の構造とチューブ状の構造が繋がった構造をしており、ERES はチューブ状構造の枝分かれた領域、すなわち膜の曲率が高い領域に形成されやすいことが報告されている(Okamoto et al., 2012)。小胞体膜上に存在する ERES の数は生物種ごとに異なり、出芽酵母では細胞あたり十数~数十個程度、ヒトなどの高等真核細胞では数十~数百個存在している。また、cargo の一種である Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored proteins (GPI アンカータンパク質) は、COPII 小胞の形成を阻害した場合に特定の ERES に集積されることが報告されている(Castillon et al., 2009)。出芽酵母では Sec24 とそのアイソフォームである Lst1 の間で cargo に対するアフィニティーが異なっており、ERES ごとに両者の構成比に偏りがあることが判明している(Iwasaki et al., 2015)。これらのことから ERES ごとに集積する cargo に偏りがあることが示唆されている。

分子量約 240kDa のタンパク質である Sec16 は、出芽酵母の温度感受性変異株を用いたスクリーニングにより、初期分泌経路に必須な因子として同定された(Kaiser and Schekman, 1990; Novick et al., 1980)。実際に、Sec16 の温度感受性変異株は制限温度下で ERES が消失し、タンパク質の輸送に影響が生じる(Shindiapina and Barlowe, 2010)。Sec16 は様々な COPII 小胞形成因子と相互作用

することが判明しており (Gimeno et al., 1996; Shaywitz et al., 1997; Yorimitsu and Sato, 2012)、Sar1 の GTPase 活性に影響を与えることが報告されている。Sar1 の GTPase 活性は、GAP である Sec23 による促進だけでなく、Sec31 により Sec23 の GAP 活性がより活性化されることで間接的にさらに促進される。Sec16 はこの Sec31 による Sec23 の GAP 活性の促進を阻害することにより Sar1 の GTPase 活性を低下させる働きがある (Kung et al., 2012; Yorimitsu and Sato, 2012)。以上のことから、Sec16 は小胞体膜上で COPII 小胞形成因子と相互作用し Sar1 の GTPase 活性を抑えることで、ERES を形成する為の足場となる機能を果たしていると考えられている (Bhattacharyya and Glick, 2007; Connerly et al., 2005; Hughes et al., 2009; Ivan et al., 2008; Watson et al., 2006)。

1.6 ゴルジ体と COPII 小胞の膜融合

小胞体から遊離した COPII 小胞はゴルジ体膜上に繫留され、その後膜融合することで小胞体からゴルジ体にタンパク質を輸送する。COPII 小胞がゴルジ体へと運ばれる過程で、繫留因子の一つである TRAPPI 複合体が COPII コートを形成している Sec23 に結合する。このステップにおける Sec23 と TRAPPI 複合体との結合は、GTP 型 Sar1 との結合により競合的に阻害される。このことは、COPII 小胞の形成が完了し Sec31 及び Sec23 による GTPase の活性化を受け、Sar1 が膜上から脱離した COPII 小胞のみが選択的にゴルジ体膜上への繫留を受けることを示唆している。Sec23 と結合した TRAPPI 複合体は Ypt1 をリクルートするとともに Ypt1 を活性化する。活性化された活性型 Ypt1 は COPII 小胞膜上に結合し、ゴルジ体膜上に局在する繫留因子である Uso1 と結合する(Lord et al., 2011)。こうしてゴルジ体膜上に繫留された COPII 小胞は、その後脱コートされ小胞膜上に露出した v-SNARE がゴルジ体膜上の t-SNARE と相互作用し膜融合が引き起こされると考えられている (Fig. 4)。

出芽酵母では、シスゴルジ槽が ERES 近傍に近づき cargo を小胞体から受け取っているのではないかということが報告された(Kurokawa et al., 2014)。加えて、出芽酵母では電子顕微鏡を用いても小胞体から遊離した COPII 小胞を細胞内で捉えることができていない。これらのことから COPII 小胞とゴルジ体との融合は ERES から小胞が出芽した直後に生じるのではないかということが示唆されている。

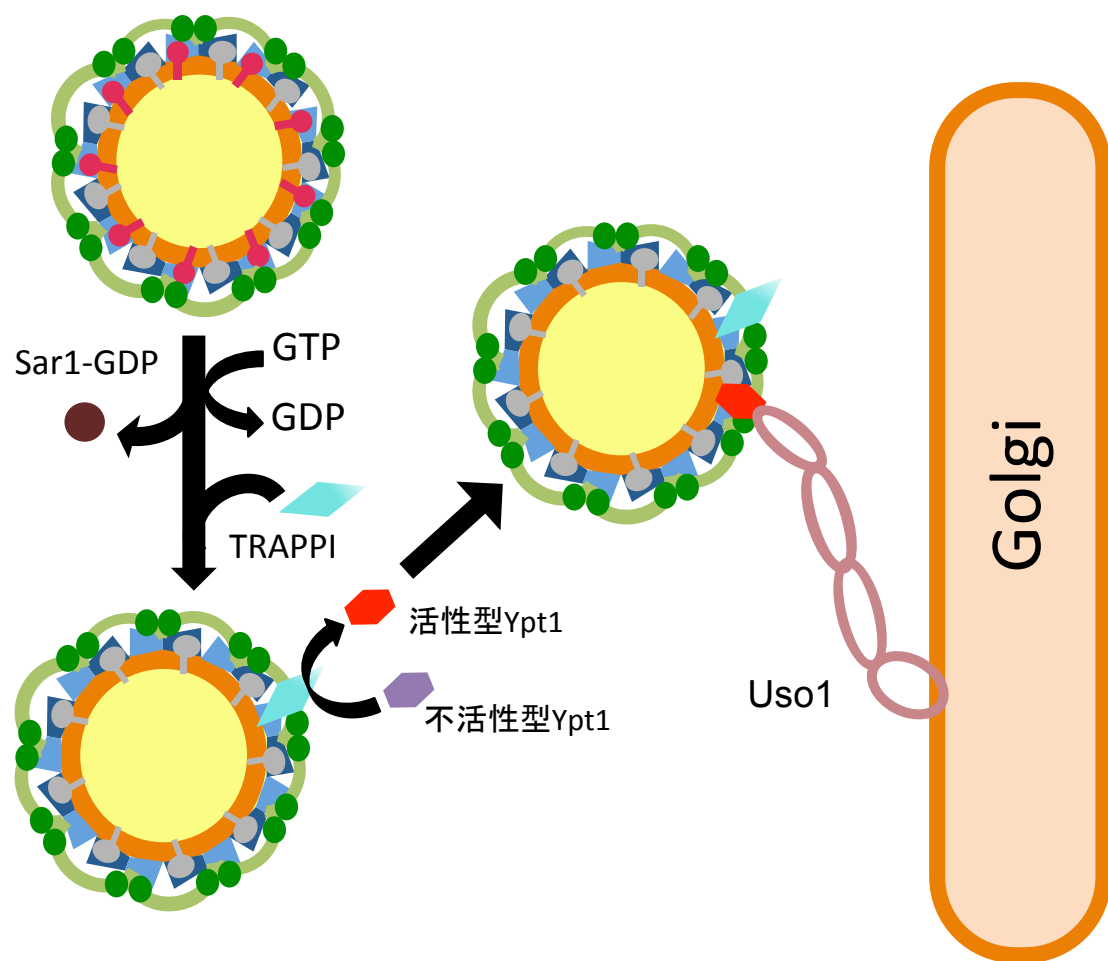


Figure 4. COPII 小胞のゴルジ体への繫留モデル

小胞体から遊離した COPII 小胞では、Sec23 及び Sec31 による Sar1 GTPase の活性化により GTP が加水分解され Sar1 が膜上から脱離する。Sar1 と結合していない COPII コートの Sec23 サブユニットは繫留因子である TRAPPI 複合体と結合する。TRAPPI 複合体は Ypt1 をリクルートすると共に、Ypt1 を活性化する。活性化型 Ypt1 は COPII 小胞膜に結合し、その後活性化型 Ypt1 を介してゴルジ体膜上の繫留因子である Uso1 が COPII 小胞と結合する。こうして COPII 小胞がゴルジ体に繫留されると考えられている。

1.7 研究目的と研究手法

小胞輸送システムの研究は酵母を用いた遺伝学的研究を基盤として発展を続けている。1980年代に *Saccharomyces cerevisiae* を用いたスクリーニングにより、COPII 小胞の形成に必須な因子が特定された(Novick et al., 1980)。その後、*In vitro* で COPII 小胞形成を再現するための実験系が確立されたことで因子間の相互作用の解析が行われるとともに(Antonny et al., 2001; Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998; Oka et al., 1991)、X線結晶構造解析により各因子の結晶構造が解かれ(Bi et al., 2002; Bi et al., 2007; Fath et al., 2007)、COPII 小胞形成における分子メカニズムや膜上で各因子がアッセンブルされる順序が明らかになってきている。しかしながら、COPII 小胞のサイズは 60~80 nm 程度と一般的な光学顕微鏡の空間分解能以下の大きさであるため、COPII 小胞形成過程における各因子の動態を追跡することは困難であり、小胞が形成される際の各因子の時空間的動態は解明されていない。また、細胞内において COPII 小胞は ERES と呼ばれる小胞体膜上の特定のドメインで形成される。そこでは Sec16 が Sar1 の GTPase 活性を制御し COPII コートと相互作用することで ERES に COPII コートを集積させるオーガナイザーとして働くことが示唆されている(Bhattacharyya and Glick, 2007; Connerly et al., 2005; Hughes et al., 2009; Ivan et al., 2008; Watson et al., 2006)。しかし、Sec16 と COPII コートがどのような時空間的動態を経て ERES を形成するのかということについてはほとんど明らかになっていない。所属する研究室の先行研では、全反射蛍光顕微鏡下に形成させた人

工脂質平面膜に蛍光標識した cargo を再構成し、最小構成因子による COPII 小胞形成反応を再現することで、COPII 小胞形成過程における cargo の動態を可視化し解析することに成功した(Tabata et al., 2009) (Fig. 5)。モデル cargo である Bet1 を蛍光標識したものと Sec12 を人工脂質平面膜上に再構成し、GTP 存在下で Sar1・Sec23/24・Sec13/31 を膜上に添加すると、COPII 小胞形成反応により Bet1 が濃縮された蛍光輝点が膜上に形成される。この実験系では、脂質を溶かす有機溶媒の種類を変えることで人工脂質平面膜の膜厚を調節することができる。膜厚が厚い人工脂質平面膜（膜厚 13.6nm）を用いて COPII 小胞形成反応を再構成した場合、COPII 小胞が膜から縊り切られるのが阻害されるため、遊離直前の COPII 小胞（COPII bud）を膜上で観察することができる。加えて、より長時間インキュベーションした場合、蛍光標識した Bet1 によりラベルされた個々の COPII bud が平面膜上をラテラルに動き COPII コートを介して互いに融合することで、ミクロンサイズの cargo クラスターを形成する (Fig. 6)。同様の実験を GTP の非加水分解アナログである GMP-PNP 存在下で行った場合、Sar1 の GTP 加水分解サイクルによる cargo の濃縮が起こらないため、cargo クラスターに積み込まれる Bet1 の数が著しく減少する。このように人工脂質平面膜上に形成される cargo クラスターは COPII 小胞形成機構により制御され形成されるものである。加えて人工脂質平面膜上には大小様々な多数の cargo クラスターが形成される。クラスターは時間経過に伴い COPII コートが伸長し、次第にそのサイズをより大きくする。つまり人工脂質膜上であれば COPII コート

形成反応を連続的かつ持続的に引き起こすことが出来る。このため時間経過に伴う COPII コート伸張過程での各因子の空間的動態を可視化し解析することが可能である。以上の理由から本研究では、人工脂質平面膜上での cargo クラスター形成における Sar1・COPII コート・Sec12 及び Sec16 の分子動態を明らかにすることを研究目的とした。

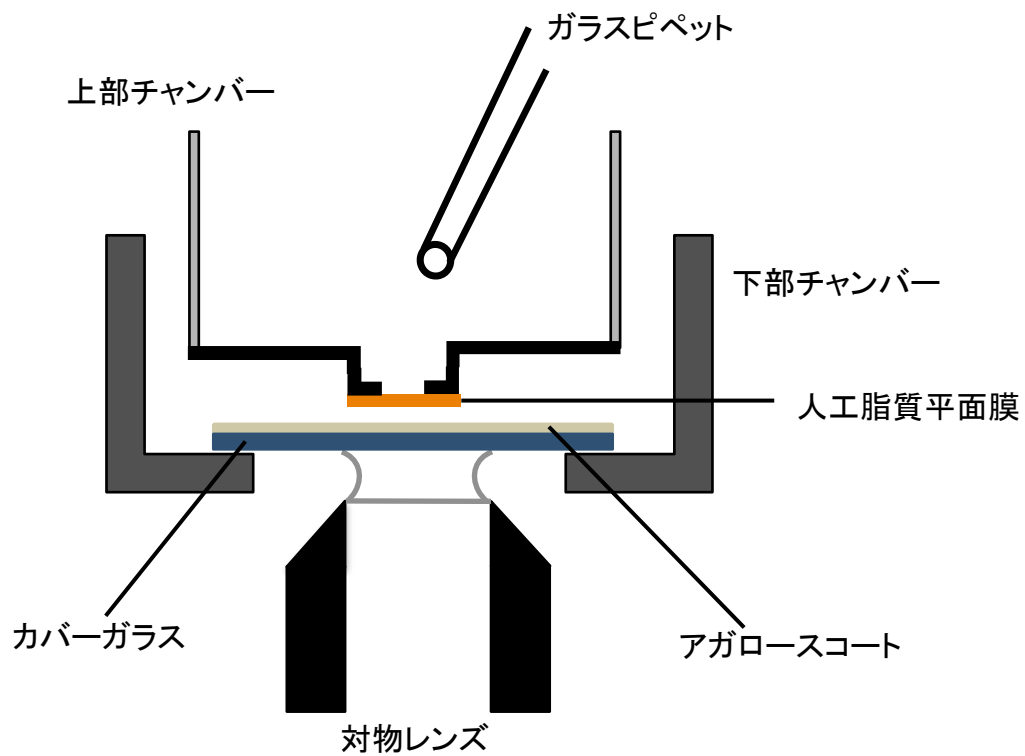


Figure 5. 本研究に用いた装置の模式図

上部チャンバーの底の薄いプラスチックフィルムには微細な穴（直径100~150 μm ）が開けられている。この穴の部分に人工脂質平面膜を形成させる。下部チャンバーのカバーガラスはアガロースでコートされている。

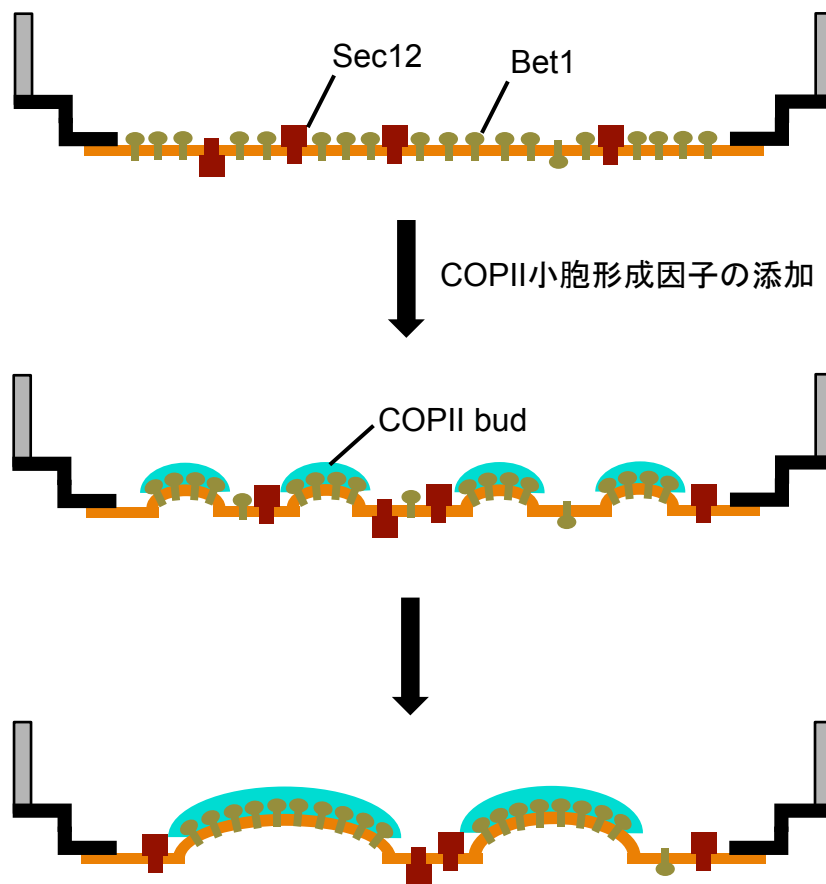


Figure 6. cargo クラスタ形成の過程を示した模式図

人工脂質平面膜に Sec12 および Bet1(モデル cargo)を再構成する。ここに COPII 小胞形成因子を添加することで Bet1 が濃縮された COPII bud が形成される。この COPII bud が平面膜上をラテラルに動き COPII コートを介して互いに融合することにより、ミクロンサイズの cargo クラスタを形成する。

第 2 章 材料と方法

2.1 プラスミド作成

pKSE290

小胞体内腔のドメインを持たない Sec12 (1-373 残基) の N 末端に 2 つのタンデムな Strep-tag と mOrange を持つ配列を pmOrange (Clontech) と pKSE176(Sato and Nakano, 2005a) をもとに PCR を用いて作り出し、pPR-IBA2 (IBA) の *EcoRI-XhoI* site に挿入することで、2Strep-mOrange-Sec12 Δ lum (mOrange-Sec12) をコードする pKSE290 を作成した。

pIBA2-2Strep-mCherry-Sec12 Δ lum

基本的な作成方法は pKSE290 と同一である。ただし、mOrange の代わりに pmCherry (Clontech) から複製した mCherry 配列を持つ。

pKSE232

pKSE136(Sato and Nakano, 2004) の *BamHI* site に pEGFP-1 (Clontech) から PCR により複製した EGFP 配列を挿入することで、MBP-GFP-Ufe1 をコードする pKSE232 を作成した。

pCUP1-MBP-Sec16-mCherry

pTYY41(Yorimitsu and Sato, 2012) の *BamHI-XhoI* site に mCherry 配列を挿入し Sec16-mCherry をコードする pSec16-mCherry(314) を作成した。その後、pSec16-mCherry(314) の *SphI-XhoI* 断片を pCUP1-MBP-Sec16-mOrange(Yorimitsu and Sato, 2012) の *SphI-XhoI* 断片と入れ替えることで MBP-Sec16-mCherry をコードする pCUP1-MBP-Sec16-mCherry を作成した。

pKSE288

Sar1 をコードする配列を pMYE3-1(Saito et al., 1998)から PCR により複製し、pGEX-4T-1 (GE Healthcare)の *Bam*HI-*Sal*I site に挿入した。このプラスミドには stop codon の直前に *Eco*RI site が挿入されており、mCherry と stop codon をコードする配列を *Eco*RI-*Sal*I site に挿入することで GST-Sar1-mCherry をコードする pKSE288 を作成した。

pGEX-4T-1-AcGFP-Sey1

Sey1 をコードする配列を *S. cerevisiae* のゲノムから PCR により複製し、pGEX-4T-1 (GE Healthcare)の *Bam*HI-*Xho*I site に挿入した。このプラスミドには start codon の直後に *sph*I site が挿入されており、pSEC24-AcGFP(316)(Iwasaki et al., 2015)由来の AcGFP 配列を *sph*I site に挿入することで GST-AcGFP-Sey1 をコードする pGEX-4T-1-AcGFP-Sey1 を作成した。

pYES2-2Strep-Yop1

Yop1 とその N 末端に Strep-tag 持つ配列を *S. cerevisiae* のゲノムを用いて PCR により複製した。この PCR 断片には Strep-tag の直後そして Yop1 の start codon の直前となる位置に Thrombin cleavage site が挿入されている。この断片を pPR-IBA2 (IBA)の *Kpn*I-*Xho*I site に挿入することで 2 つのタンデムな Strep-tag と Yop1 をコードするプラスミドを作成した。このプラスミドをもとに 2Strep-Yop1 をコードする配列を PCR により複製し、pYES2 (Invitrogen)の *Hind*III-*Xho*I site に挿入することで pYES2-2Strep-Yop1 を作成した。

2.2 タンパク質精製及び蛍光標識

Sar1・Sec23/24・Sec13/31の精製は(Sato and Nakano, 2005a)に記載してある精製法に従い精製した。Strepで標識されたBet1及びSec12 Δ lumは(Tabata et al., 2009)で用いられた精製法に従い精製した。Strepで標識されたmOrange-Sec12とmCherry-Sec12はSec12 Δ lumと同じプロトコルを用いて精製している。Sar1-mCherryはSar1p-C171S-Cys(Tabata et al., 2009)を精製したプロトコルを用いてGST-Sar1-mCherryから精製している。Sec16-mCherryはSec16-mOrange(Yorimitsu and Sato, 2012)と同じ方法を用いて精製している。MBP-GFP-Ufe1は(Sato and Nakano, 2004)で示されている精製法に従い精製した。AcGFP-Sey1の精製は(Powers et al., 2017)で示された精製法を一部改変して行った。GST-AcGFP-Sey1の発現には*E. coli* C41(DE3)株を用いた。OD₆₀₀=0.4~0.6まで菌体を30°Cで培養し、1 mMのisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加えGST-AcGFP-Sey1の発現を誘導し、30°Cで4時間培養した。その後菌体を回収しbuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl)で洗浄し、lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail (PIC))に溶かした。ソニケーションにより細胞を破碎し、5,000 g \times 10 min 4°Cで遠心し、回収した上清液を42,000 rpm \times 1 hour 4°Cで遠心し沈殿したミクロソーム画分を回収した。これを1.25%のn-dodecyl-- β -maltoside (DDM)を加えたlysis buffer中で1時間4°Cでゆっくり震盪させ可溶化した。次に10,000 g \times 10 min 4°Cで遠心し不溶

性の画分を取り除き、1.25%の DDM を加えた lysis buffer で平衡化しておいた Glutation-Sepharose (GE Healthcare)を加え 2 時間 4°Cでゆっくり震盪させた。そしてカラムを wash buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM)、wash buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.05% DDM)、wash buffer C (20 mM HEPES-KOH pH 6.8, 300 mM KoAc, 0.05% DDM)の順で洗浄し、800 μ l の wash buffer C と 100 unit の Thrombin を加え室温で 1 時間反応させたのち 4°Cで一晩反応させて GST を切断し AcGFP-Sey1 を精製した (Fig. 7)。

2Strep-Yop1 は(Powers et al., 2017)で示されたプロトコルを一部改変して精製している。2Strep-Yop1 の発現には *S. cerevisiae* BY4741 株を用いた。菌体を 30°Cで stationary phase ($OD_{600}=5.0\sim 6.0$)まで培養し培養液中のグルコースを減少させたのち、最終濃度が 2%となるようにガラクトースを加え 2Strep-Yop1 の発現を誘導し 25°Cで 16 時間培養した。回収した菌体を滅菌水で洗浄し lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF, PIC)に溶かした後、液体窒素を用いて菌液を粒状に凍結させた。ブレンダーにより菌体を破碎し菌液を溶かした後、5,000 g \times 10 min 4°Cで遠心し、回収した上清液を 42,000 rpm \times 1 hour 4°Cで遠心し沈殿したミクロソーム画分を回収した。これを 1.25%の n-dodecyl-- β -maltoside (DDM)を加えた lysis buffer 中で 1 時間 4°Cでゆっくり震盪させ可溶化した。次に 10,000 g \times 10 min 4°Cで遠心し不溶性の画分を取り除き、1.25%の DDM を加えた lysis buffer で平衡化した Strep-Tactin Superflow (IBA)を加え 4°Cで 1 時間ゆっくり震盪させた。その後カラムを wash

buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% DDM)、wash buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.05% DDM)、wash buffer C (20 mM HEPES-KOH pH 6.8, 300 mM KoAc, 0.05% DDM)の順で洗浄し、elute buffer (20 mM HEPES-KOH pH 6.8, 300 mM KoAc, 0.05% DDM, 10 mM desthiobiotin)を加え 4°Cで 15 分間インキュベーションした後、精製した 2Strep-Yop1 を回収した (Fig. 7)。

Cy3-maleimide (GE Healthcare) もしくは DyLight488-maleimide (Thermo Scientific)による Sar1 及び Bet1 の蛍光標識は(Tabata et al., 2009)で示されているプロトコルを用いて行った。Sec13/31-Cy3 と Sec13/31-ATTORho101 は、精製した Sec13/31 (in 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 175 mM KOAc, 0.1 mM EDTA, and 10% glycerol) をそれぞれ約 60 倍量の Cy3-maleimide もしくは ATTORho101-maleimide (ATTO TEC)と反応させた後、NAP-5 column (GE Healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより未反応の色素を取り除き作成した。ラベル効率はおよそ 1.9-2.9 (dye/protein)であった。

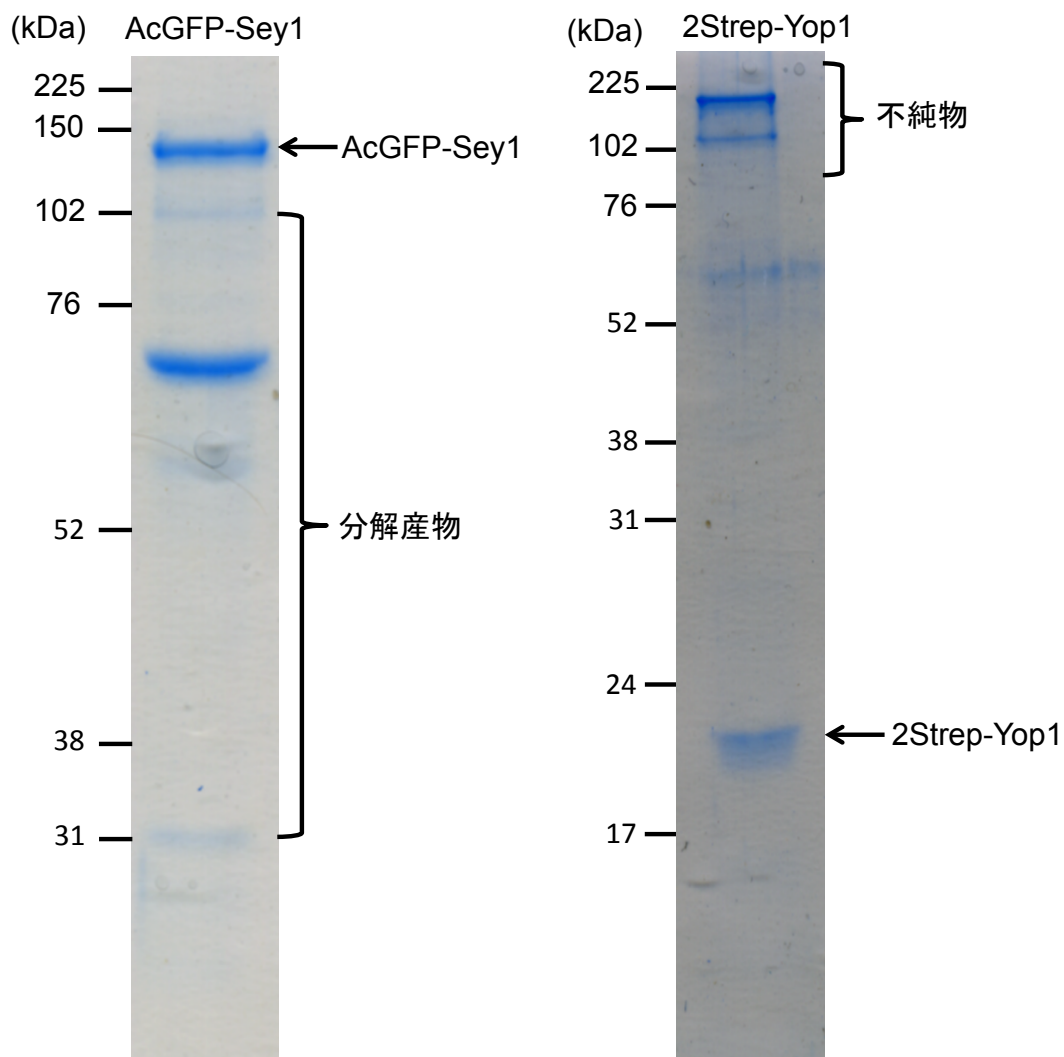


Figure 7. AcGFP-Sey1 及び 2 Strep-Yop1 の精製

E. coli C41(DE3)株で発現させた GST-AcGFP-Sey1 を Glutathion-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、その後 Thrombin により GST-tag を切断し AcGFP-Sey1 を得た。2Strep-Yop1 は *S. cerevisiae* BY4741 株で発現させ Strep-Tactin によるアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ここでは精製した AcGFP-Sey1 と 2Strep-Yop1 を SDS-PAGE で分離し CBB 染色したものを示している。

2.3 プロテオリポソームの作成

以下の全てのプロテオリポソーム作成では major-minor mix 組成の脂質 (Matsuoka et al., 1998) を用いている。Sec12 Δ lum · mOrange-Sec12 · mCherry-Sec12 · Bet1 · Bet1-Dy488 及び GFP-Ufe1 をそれぞれ再構成したプロテオリポソームは (Tabata et al., 2009) に記載された作成法に従い作成した。AcGFP-Sey1 及び 2Strep-Yop1 を再構成したプロテオリポソームの作成には以下のプロトコルを用いた。N₂ スチームにより乾燥させた major-minor mix 組成の脂質をボルテックスとソニケーションにより 100 μ l の Buffer (20 mM HEPES-KoH pH 6.8, 100 mM KoAc) に溶かし、液体窒素を用いて 10 回ほど凍結融解を繰り返すことでリポソーム溶液を作成した。次にこのリポソーム溶液を 100 nm のサイズのフィルターを装着した mini-extruder (Avanti Polar Lipids) に通すことで、直径 100 nm 以下のリポソーム溶液にした。こうしてできたりポソーム溶液に AcGFP-Sey1 もしくは 2Strep-Yop1 のタンパク溶液を加え、そこに最終濃度 0.09~0.1% となるように DDM を加えた後に室温で 1 時間インキュベーションした。その後、Buffer (20 mM HEPES-KoH pH 6.8, 100 mM KoAc) で平衡化した SM-2 beads (Bio-Rad) を溶液量の 2/3 倍量加え室温で 1 時間インキュベーションし、上精のみを回収した。この操作を 3 回繰り返し、DDM を溶液中から除去することで AcGFP-Sey1 及び 2Strep-Yop1 を再構成したプロテオリポソームを作成した (Fig. 8)。

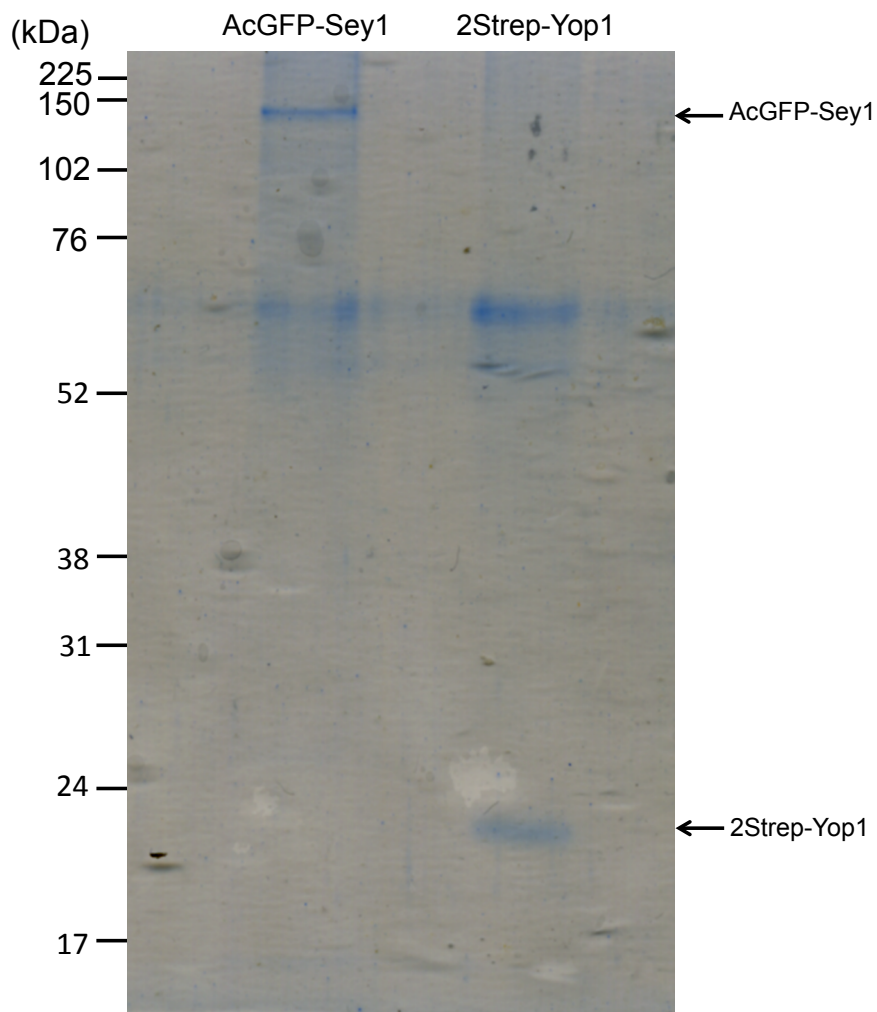


Figure 8. AcGFP-Sey1 及び 2Strp-Yop1 の再構成

AcGFP-Sey1 と 2Strp-Yop1 を再構成したプロテオリポソームを Nycodenz を用いた密度勾配遠心により分画し、SDS-PAGE により分離した後 CBB 染色したものを示している。AcGFP-Sey1 や 2Strp-Yop1 の精製標品に見られた分解産物や不純物は膜貫通ドメインを持たないためリポソームに再構成されない。

2.4 蛍光顕微鏡

人工脂質平面膜上の蛍光標識されたタンパク質は、IX71 倒立顕微鏡 (Olympus) をベースにした全反射蛍光顕微鏡もしくは共焦点蛍光顕微鏡を用いて室温にて可視化し、EMCCD カメラ (iXon, DU897, Andor Technology) により蛍光イメージを得た。どちらの場合も油浸対物レンズ (PlanApo, X100, 1.45 NA) を下部チャンバー直下に設置している。全反射蛍光顕微鏡は 532 nm の固体レーザー (COMPASS 215M-75, Coherent) を用いたエバネッセント光を励起光源として平面膜上のタンパク質を可視化している (Tabata et al., 2009)。共焦点蛍光顕微鏡に使用した共焦点スキャナーユニットは CSU10 (Yokogawa Electric Corporation) である。共焦点蛍光顕微鏡では GFP や DyLight488 を励起するための光源として 473 nm の固体レーザー (J050BS; Showa Optronics) を使用し、mCherry や ATTORho101 を励起するための光源として 561 nm の固体レーザー (J050YS; Showa Optronics) を使用した。また、得られた蛍光イメージは Andor iQ (Andor Technology) や ImageJ software (NIH) を用いて解析した。

2.5 人工脂質平面膜の作成と膜タンパク質の再構成

(Tabata et al., 2009) に示してあるように major-minor lipid mix を n-decane に溶かしたものを本研究室で作成した上部チャンバーの穴の部分に水平に張ることで人工脂質平面膜を形成させた。それぞれ個別に再構成した Sec12 Δ lum (120~140 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) \cdot mOrange-Sec12 (630 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) \cdot mCherry-Sec12 (720 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) \cdot

Bet1 (100~220 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)・Bet1-Dy488 (70~240 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) そして GFP-Ufe1 (224 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)を実験条件に応じて選択し、buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , 5% (v/v) glycerol, and 0.2 mM GTP or GMP-PNP) と混ぜ合わせた (1.5-10,000 倍希釈)。こうして作成した混合溶液を上部チャンバーに張った人工脂質平面膜上に添加し、プロテオリポソームと平面膜との自発的な膜融合を引き起こした。10 分ほどインキュベーションした後、膜融合しなかったプロテオリポソームをガラスピペットにより膜上から回収した。Bet1 や Sec12 Δ lum の細胞質側ドメインの 80~95%がリポソームの外側を向いて再構成される(Sato and Nakano, 2005b)。このため、人工脂質平面膜に再構成された Bet1 や Sec12 Δ lum の細胞質側ドメインも同じ割合で平面膜の上表面の方向をむいていると考えられる。

2.6 人工脂質平面膜上での蛍光標識したタンパク質の解析

全ての実験は室温にて行っている。上部チャンバーはアガロースで被覆されたカバーガラスの上に設置されており、人工脂質平面膜とカバーガラスまでの距離は 10~20 μm になるよう設定してある。上部チャンバーと下部チャンバーの両方に buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , and 0.2 mM GTP or GMP-PNP) が充填してあり、人工脂質平面膜の上下の空間はこのバッファーで満たされている。人工脂質平面膜をこの buffer の中で形成させ、そ

の後上記の方法で Bet1 と Sec12 を再構成する。COPII 小胞形成因子 (40~100 ng Sar1 (もしくは標識された Sar1)、 345~690 ng Sec23/24、そして 1.3~1.9 μ g Sec13/31 (もしくは標識された Sec13/31)) を混合した混合液 (~10 μ l) を上部チャンバー (~400 μ l) 側から Bet1 と Sec12 を再構成した人工脂質平面膜の膜直上にガラスピペットを用いて添加する。cargo クラスタを形成させるために 10~20 分程インキュベーションした後、上部チャンバーを下げ人工脂質平面膜とカバーガラスを接触させる。その状態で蛍光イメージを全反射蛍光顕微鏡もしくは共焦点蛍光顕微鏡により撮影した。Sec13/31-ATTORho101 については標識していない Sec13/31 と 1:4 のモル比で混合して実験に用いている。Fig. 12, 16 そして 21 に示したヒストグラムはガウス曲線 $y=A*\exp-(x-B)^2/C^2$ によりフィッティングしている。A はピークの最大値、B は中央値、そして C はピークの幅を意味している。

2.7 トリプトファン蛍光強度解析

トリプトファン蛍光強度解析は(Antonny et al., 2001; Sato and Nakano, 2005a)に示されている方法を参考に行った。トリプトファン蛍光 (excitation, 298 nm; emission, 340 nm) はクォーツキュベットを用いて蛍光分光光度計 (F-2500; Hitachi) により計測した。この蛍光分光光度計には反応温度を調節可能なセルホルダーとマグネティックスターラーが装備されている。Sar1がGDP型の場合トリプトファンの自家蛍光の蛍光強度は低い、GTP型となるとSar1の立体構造の

変化に伴いトリプトファン自家蛍光の強度が強くなる。トリプトファン自家蛍光強度解析では、このSar1のもつトリプトファン自家蛍光変化を指標としてSar1の状態をモニターできる。そして全ての実験は25°C、反応液量200 µlで行った。Sec13/31-Cy3のGAP促進活性を解析した実験ではbuffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM MgCl₂)、Sar1、リポソーム、GTPからなる混合液をクォーツキュベットに入れ10分インキュベーションし、その後Sec23/24を添加し100秒反応させ、Sec13/31-Cy3を添加した。mOrange-Sec12及びmCherry-Sec12のGEF活性解析はbuffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM MgCl₂)、Sar1、そしてmOrange-Sec12もしくはmCherry-Sec12を再構成したプロテオリポソームからなる混合液をクォーツキュベットに入れ10分インキュベーションし、GMP-PNPを添加し反応を観察した。Sec16-mCherryによるSar1 GTPase阻害活性の解析ではSec16-mCherry、buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM MgCl₂)、Sar1、リポソーム、GTPからなる混合液をクォーツキュベットに入れ10分インキュベーションし、その後Sec23/24及びSec13/31の混合液を添加して観察を行った。

2.8 プロテオリポソームを用いたチューブネットワーク構造の再構成

チューブネットワークの再構築を行う際には AcGFP-Sey1 と Yop1 を共に再構

成したプロテオリポソームを用いた。AcGFP-Sey1 は前述の精製方法により精製したものを用いており、Yop1 は前述の方法で精製した 2strep-Yop1 に対して 100 unit の Thrombin を加えて 4°Cで一晩インキュベートし N 末端の 2 つのタンデムな Strep-tag を切断したものを用いている。プロテオリポソームの作成方法は前述した AcGFP-Sey1 や 2Strep-Yop1 を再構成した方法を用いている。簡潔に述べると AcGFP-Sey1 と Yop1 に対して major-minor mix 組成の脂質がモル比でそれぞれ 1:750 と 1:450 となる混合溶液に最終濃度 0.1%となるように DDM を加えインキュベートした後、SM-2 beads により DDM を除去し作成した。その後遠心分離により不溶性の凝集体を除去し、上精を 55,000 rpm×30 min 4°Cで遠心することでプロテオリポソームを回収し 50 μ l の Buffer (20 mM HEPES-KoH pH 6.8, 100 mM KoAc)に懸濁した。このプロテオリポソーム溶液 2.5 μ l に最終濃度 5 mM となるように MgCl₂を加え室温で 1 分間インキュベートし、そこに 4 mM の GDP もしくは GTP を加えた混合溶液を作成した。この溶液をアガロースでコートされた 2 枚のカバーガラスで挟み込み室温で 20 分間インキュベートし、チューブネットワーク構造を再構成させた。このチューブネットワーク構造の観察には前述の共焦点蛍光顕微鏡を用いているが対物レンズは油浸対物レンズ (PlanApo, X60, 1.42 NA) を用いている。

第 3 章 結果

3.1 cargo クラスター形成過程において Sar1 はクラスター辺縁部に局在する

COPII 小胞形成過程における個々の COPII 小胞形成因子の時空間的動態を調べるため、モデル cargo として Bet1 (小胞体-ゴルジ体間の v-SNARE) と Sec12 Δ lum (小胞体内腔のドメインを持たず、膜貫通領域と細胞質側ドメインを持つ Sec12) を小胞の縊り切りを防ぐ仕組みを導入した人工脂質平面膜上に再構成し、そこに COPII コート (Sec23/24 及び Sec13/31) と Sar1 を加えることで cargo クラスターを形成させる。特に言及がない場合、上記の通りに再構成した人工脂質平面膜をこれ以後の全ての実験に用いている。加えて、動態解析のターゲットとなる因子は蛍光標識を施した上で、蛍光顕微鏡により平面膜上での動態を観察し解析している。共焦点蛍光顕微鏡は Bet1 による cargo クラスターと COPII 小胞形成因子の空間的な相関を調べるために用いており、全反射蛍光顕微鏡は Z 軸方向の解像度が高いことから詳細な定量的解析に用いている。

GTP 非加水分解アナログである GMP-PNP 存在下で GTP ロックされた Sar1 と COPII コート (Sec23/24 及び Sec13/31) をリポソームや cargo を再構成したプロテオリポソーム溶液に加えることで、脂質膜上で COPII コートの形成を再現することが可能である(Matsuoka et al., 1998; Sato and Nakano, 2004)。まず、Bet1 と Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜上に蛍光標識した Sar1 (Sar1-Cy3) と COPII コートを加え COPII 小胞形成反応を再構成し、そこでの Sar1-Cy3 の動態を全反射蛍光顕微鏡により可視化し解析することを試みた。

GMP-PNP 存在下で Bet1 と Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜上に COPII コートと Sar1-Cy3 を添加すると、様々なサイズの Sar1-Cy3 で標識されたクラスターが形成される (Fig. 9)。これらのクラスターでは Sar1-Cy3 がクラスター全域に局在する局在パターンを示した。実際に mCherry を融合させた Sar1 (Sar1-mCherry) と DyLight488 で蛍光標識した Bet1 を用いて cargo クラスターを形成させた場合、cargo クラスターの大部分が Sar1-mCherry で標識されたクラスターと重なることが共焦点蛍光顕微鏡を用いた解析により明らかとなった (Fig. 10)。

全反射蛍光顕微鏡観察より得られた Sar1-Cy3 で標識されたクラスターについてより詳細に解析するため、クラスターを large クラスター ($>1.0 \mu\text{m}^2$) と small クラスター ($<1.0 \mu\text{m}^2$) に分類し、それぞれのサイズのクラスターから発せられる Sar1-Cy3 の平均蛍光強度を解析した (Fig. 11)。その結果、large クラスターと small クラスターの間には平均蛍光強度の差はなかった。このことは small クラスター同士が COPII コートを介して互いに融合し水平方向に成長していることを強く示唆している。典型的なクラスターを横切るように引いた直線上の蛍光強度を解析したところ Sar1-Cy3 はクラスター全域に均等に局在していた (Fig. 9)。さらに各々のクラスターから発せられる平均蛍光強度の分布を横軸に蛍光強度・縦軸に頻度のグラフにプロットした結果、ガウシアン分布を示した (Fig. 12)。これらの結果は、観察されたクラスターが Sar1-Cy3 のランダムなアグリゲーションによるものではなく COPII コートとの相互作用を

介して形成されたものであることを示している。

次に、GTP 存在下における Sar1 の動態を調べた。Sar1 の GTP 加水分解は自身の脂質膜上からの脱離と、それに続く COPII コートの膜からの解離を引き起こす(Antonny et al., 2001)。一方で COPII コートのインナーコートである Sec23/24 は、cargo との結合に加え Sec12 による継続的な GTP 型 Sar1 の供給により、膜上に保持されることが明らかになっている(Sato and Nakano, 2005a)。しかしながら、COPII 小胞形成過程での COPII コートのダイナミクスに Sar1 の結合／脱離がどのように関与しているのかという謎は未だ解明されていない。これを解明するため、cargo クラスタ形成過程での Sar1-mCherry と Bet1-Dy488 のダイナミクスを共焦点蛍光顕微鏡を用いて解析した。驚くべきことに、GTP 存在下では Sar1-mCherry は GMP-PNP 存在下のように Bet1-Dy488 で標識された cargo クラスタ全域に局在するのではなく、cargo クラスタの辺縁部に集中して局在していることが判明した (Fig. 13)。GTP 存在下において Sar1-Cy3 を全反射蛍光顕微鏡により可視化すると、COPII 小胞形成因子の添加により GMP-PNP 存在下と同様に大小様々なクラスタが形成される (Fig. 14)。しかしながら、全反射蛍光顕微鏡観察により得られた GTP 存在下の典型的なクラスタでは、クラスタの辺縁部に Sar1-Cy3 のシグナルのピークが検出され、クラスタ内部からはクラスタ辺縁部と比較して弱い蛍光しか検出出来なかった (Fig. 14)。そして、クラスタの外周に沿って蛍光強度解析を行ったところ、Sar1-Cy3 はクラスタを取り巻くように辺縁部に均一に局在していた (Fig. 15)。

更に、large クラスタ ($>1.0 \mu\text{m}^2$) と small クラスタ ($<1.0 \mu\text{m}^2$) において Sar1-Cy3 局在領域 (large クラスタでは辺縁部、small クラスタではクラスタ全域) の平均蛍光強度を解析したところ両者の間に明確な差はなかった (Fig. 11)。また、個々のクラスタの Sar1-Cy3 局在領域から発せられる平均蛍光強度の分布を横軸に蛍光強度・縦軸に頻度のグラフにプロットしたところガウシアン分布を示した (Fig. 16)。これらの結果は、GTP 存在下で形成させたクラスタが Sar1-Cy3 の非特異的なアグリゲーションの結果として形成されたものではないということを示している。そして、GTP 存在下で発せられる平均蛍光強度 (70.2 ± 12.6 A.U.) は GMP-PNP 存在下で検出された平均蛍光強度 (97.3 ± 16.3 A.U.) に対して有意に低い値を示した。このことは GTP 存在下で Sar1 の GTP 加水分解サイクルが機能し Sar1-Cy3 が脂質膜への結合/解離を繰り返すことで、膜上に存在する Sar1-Cy3 が見かけ上少なくなっていることを強く示唆している。GTP 型 Sar1 による膜への結合が COPII コートの膜へのリクルートの引き金となることを考慮すると、これらの結果は COPII コートのリクルートと形成が cargo クラスタの辺縁部で生じていることを示唆している。加えて Sar1 は COPII コートを膜へリクルートし水平方向にコートが伸長した直後に膜上から脱離しているようである。

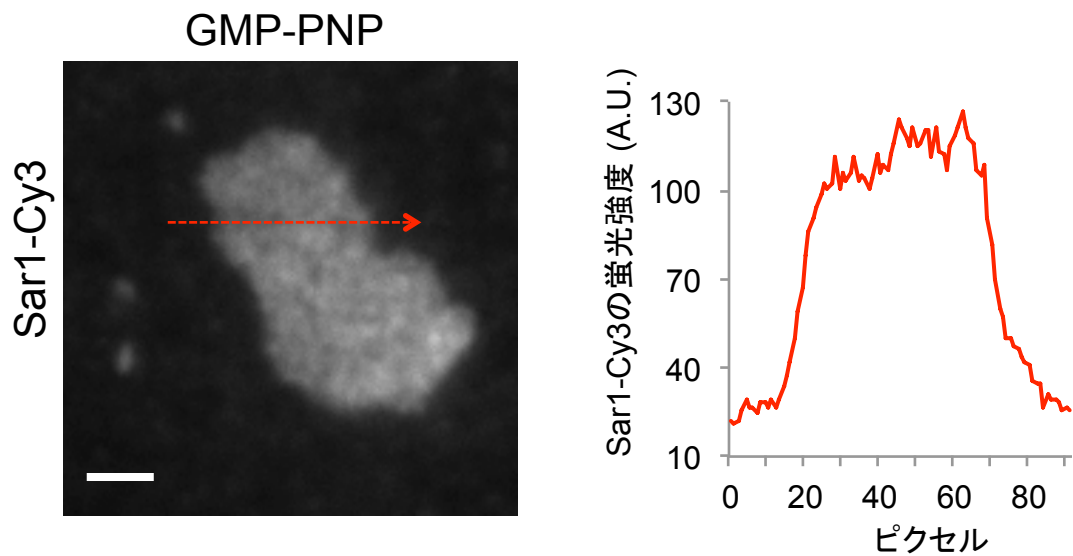


Figure 9. GMP-PNP 存在下で形成させたクラスターにおける Sar1-Cy3 の局在

Bet1 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(80 ng Sar1-Cy3, 640 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP 存在下で cargo クラスターを形成させた。ここでは典型的な Sar1-Cy3 で標識されたクラスターの蛍光イメージを示している。蛍光イメージは全反射蛍光顕微鏡を用いて得たものである。右のグラフは左の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

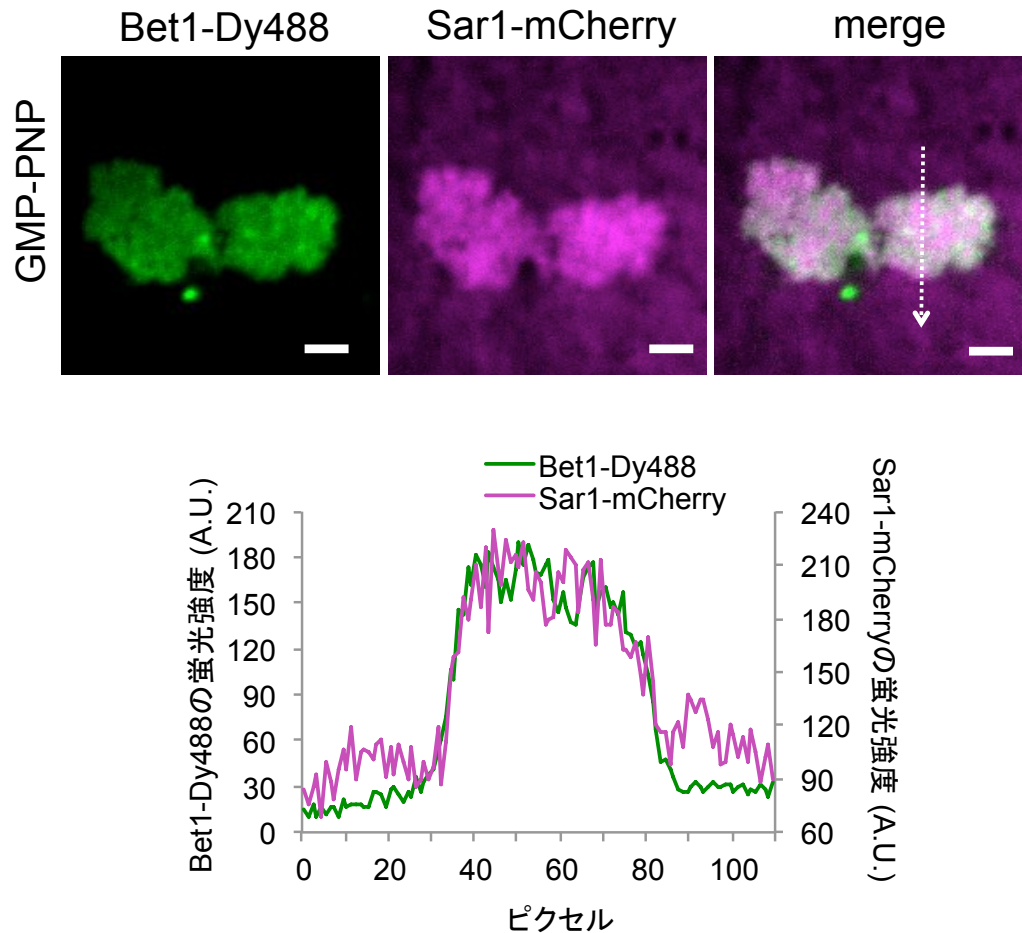


Figure 10. GMP-PNP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sar1-mCherry 局在

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(39 ng Sar1-mCherry , 640 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバ一側から加え GMP-PNP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と Sar1-mCherry の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得た。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析によって得られたものである。スケールバーは 2 μ m

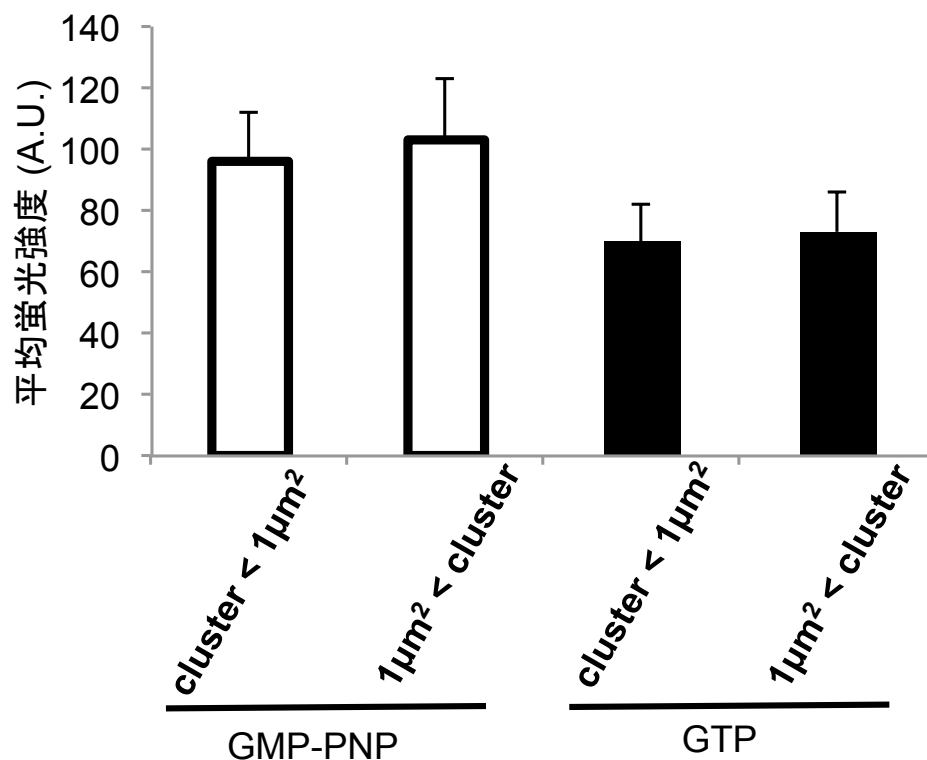


Figure 11. クラスタにおいて Sar1 局在領域から発せられる Sar1-Cy3 の平均蛍光強度

GMP-PNP 及び GTP 存在下で膜上に形成させたクラスタの Sar1-Cy3 局在領域から発せられる平均蛍光強度を large クラスタ (>1 μm^2) と small クラスタ (<1 μm^2) の間で比較したもの。平均蛍光強度はバックグラウンド (クラスタ外) の平均蛍光強度を差し引き算出している。エラーバーは SEM を示している。

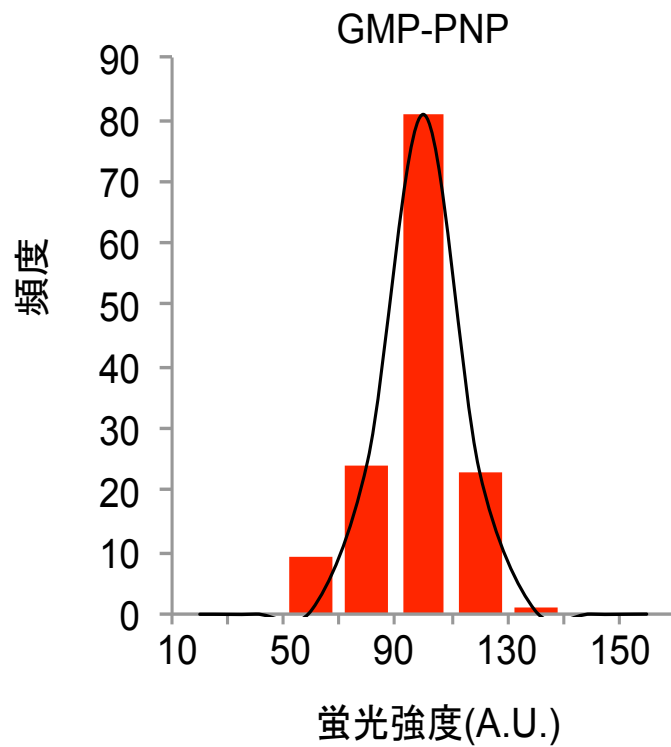


Figure 12. GMP-PNP 存在下で形成させたクラスターから発せられる Sar1-Cy3 の平均蛍光強度の分布

GMP-PNP 存在下で膜上に形成させた個々のクラスターから発せられる Sar1-Cy3 の平均蛍光強度の分布。平均蛍光強度はバックグラウンド（クラスター外）の平均蛍光強度を差し引き算出している。平均蛍光強度の分布は曲線で示されたガウシアン分布を示す。

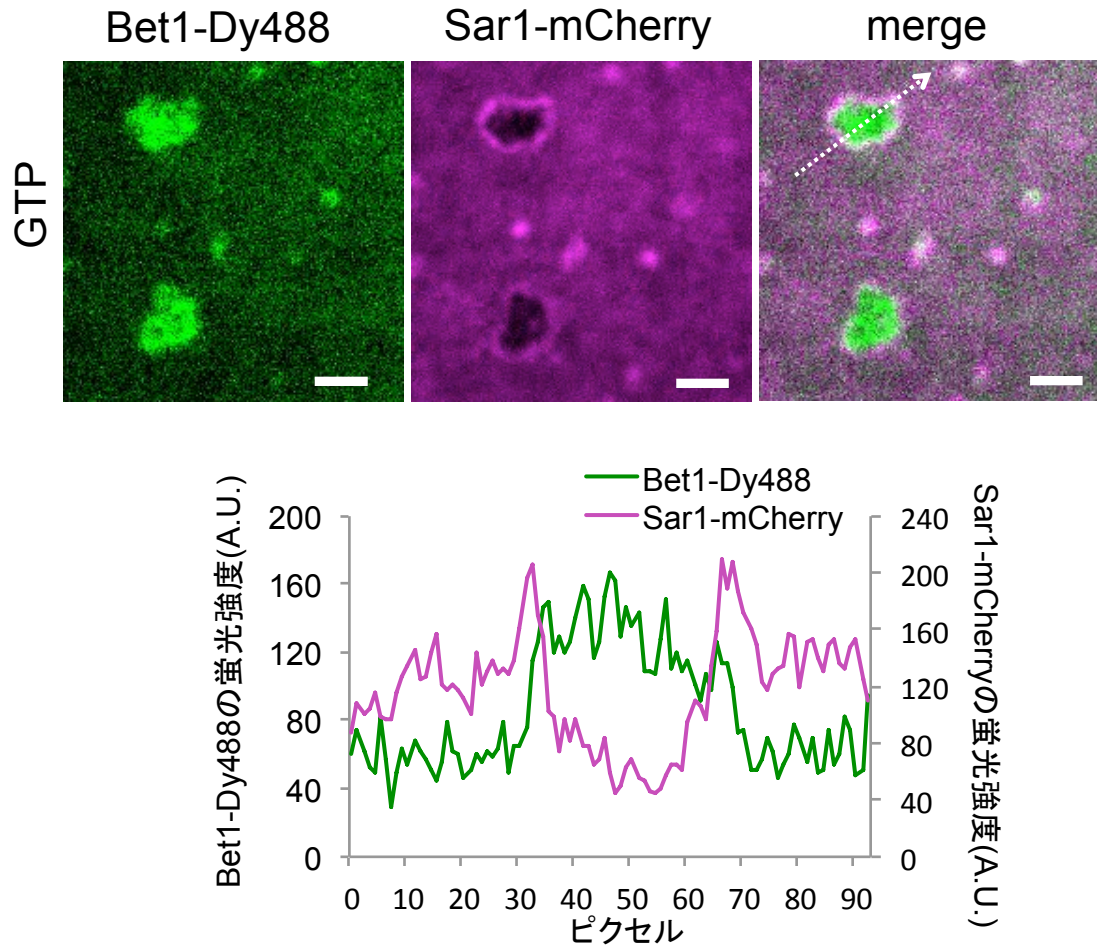


Figure 13. GTP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sar1-mCherry の局在

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(39 ng Sar1-mCherry , 640 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバ一側から加え GTP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と Sar1-mCherry の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得た。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

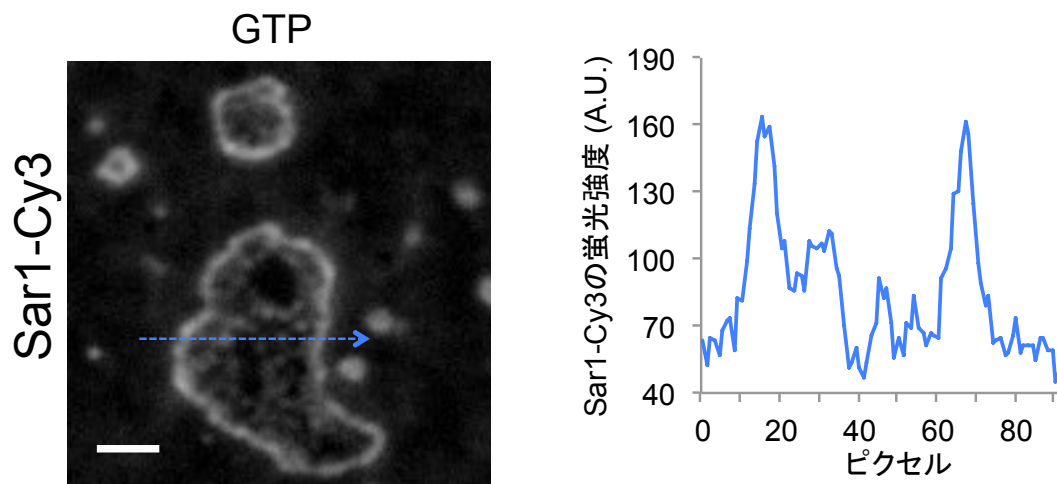


Figure 14. GTP 存在下で形成させたクラスターにおける Sar1-Cy3 の局在

Bet1 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(80 ng Sar1-Cy3, 640 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバー側から加え GTP 存在下で cargo クラスターを形成させた。ここでは典型的な Sar1-Cy3 で標識されたクラスターの蛍光イメージを示している。蛍光イメージは全反射蛍光顕微鏡を用いて得たものである。右のグラフは左の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

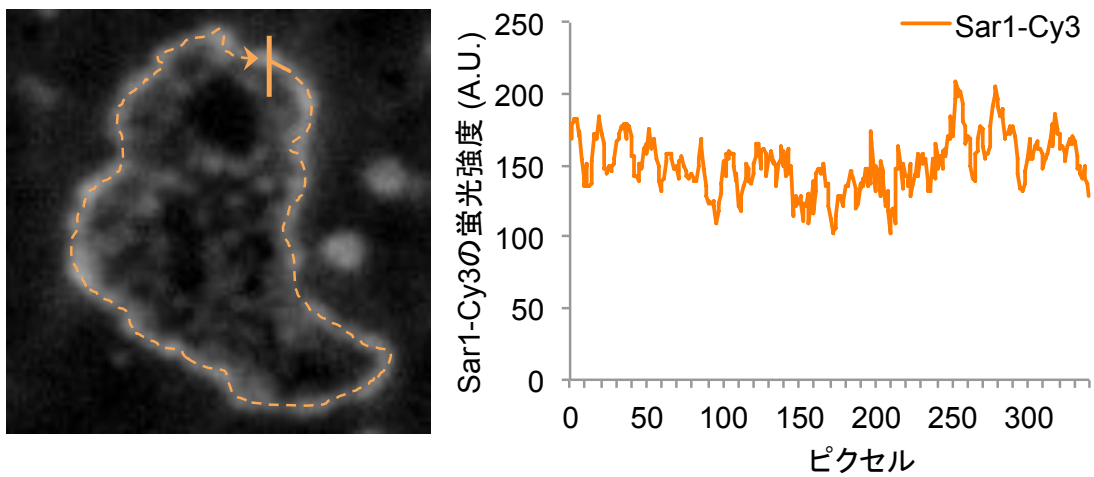


Figure 15. Fig. 14 で示したクラスター辺縁領域における Sar1-Cy3 の分布

左の蛍光イメージは Fig. 14 で示した Sar1-Cy3 で標識されたクラスターの拡大図である。右のグラフは左の蛍光イメージでクラスターの辺縁部に沿うように引かれた矢印の領域のラインスキャン蛍光強度解析の結果を示している。

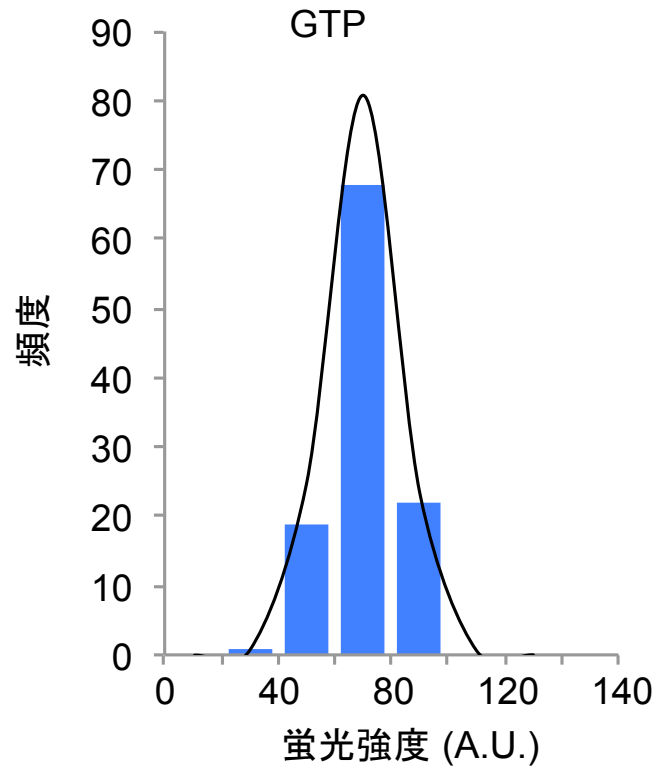


Figure 16. GTP 存在下で形成させたクラスターの Sar1-Cy3 局在領域から発せられる平均蛍光強度の分布

GTP 存在下で膜上に形成させた個々のクラスターの Sar1 局在領域から発せられる Sar1-Cy3 の平均蛍光強度の分布。平均蛍光強度はバックグラウンド（クラスター外）の平均蛍光強度を差し引き算出している。平均蛍光強度の分布は曲線で示されたガウシアン分布を示す。

3.2 Sar1 は cargo クラスターにおいて COPII コートの維持に必須な因子ではない

Sar1 は COPII コートを膜上に繫留するために必須の因子であり、Sar1 の膜からの脱離は COPII コートの解離を引き起こすと考えられている。ゆえに、Sar1 が脱離していた cargo クラスター中心部で COPII コートが膜上から解離しているのかどうかを調べることにした。まず、COPII コートの動態を可視化するためアウターコートである Sec13/31 を Cy3 で蛍光標識した (Sec13/31-Cy3)。次に Sec13/31-Cy3 の生化学的活性を調べるため、トリプトファンの蛍光強度解析を行った。トリプトファンの蛍光強度解析では Sar1 のもつトリプトファンの自家蛍光変化を指標として Sar1 の状態をモニターする。Sar1 が GDP 型の場合トリプトファンの自家蛍光の蛍光強度は低いが、GTP 型となると Sar1 の立体構造の変化に伴いトリプトファンの自家蛍光が強くなる。すなわち Sar1 の GTP 型から GDP 型への変化はトリプトファン蛍光強度の減少として表される。これにより Sar1 の GTPase 活性の強さをトリプトファン蛍光強度の減衰の傾きとして検出することが可能である。実際に GTP 存在下で Sec23/24 を添加した場合の蛍光強度の減衰の傾きが Sec13/31-Cy3 を加えることにより増加したことから、Sec13/31-Cy3 は GAP 活性を促進する活性を維持していることが確認できた。

(Fig. 17)。実際に Bet1 と Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜上に Sar1・Sec23/24・Sec13/31-Cy3 を添加すると、GTP 加水分解の有無に関わらず Sec13/31-Cy3 で標識された大小様々なクラスターが形成され、なおかつ

Sec13/31-Cy3 はクラスター全域に局在することが全反射蛍光顕微鏡による蛍光イメージングで明らかになった (Fig. 18)。そして Sec13/31-Cy3 により標識されるクラスターが cargo クラスターと一致するかどうかを調べるため、ATTORho101 でラベルした Sec13/31 (Sec13/31-ATTORho101) と Bet1-Dy488 を用いてクラスターを形成させ共焦点蛍光顕微鏡により解析した。その結果 Sec13/31-ATTORho101 で標識されたクラスターは Bet1-Dy488 で標識される cargo クラスターと一致することが明らかとなった (Fig. 19)。しかしながら、Sec13/31-Cy3 や Sec13/31-ATTORho101 を用いた場合、Bet1 クラスターは Fig. 7 で観察されたような大きさまで成長しなかった。この原因は Sec13/31 に化学的な修飾をほどこしたことによる影響ではないかと推測される。

また、cargo クラスターにおける Sec13/31-Cy3 の蛍光強度の分布は比較的均一であることがラインスキャン蛍光強度解析により判明した (Fig. 18)。クラスターから発せられる Sec13/31-Cy3 の平均蛍光強度は large クラスター ($>1.0 \mu\text{m}^2$) と small クラスター ($<1.0 \mu\text{m}^2$) の間でほとんど差がなかった (Fig. 20)。加えて平均蛍光強度の分布を横軸に蛍光強度・縦軸に頻度のグラフにプロットしたところ GTP・GMP-PNP の両条件でガウシアン分布を示した (Fig. 21)。これらの解析結果は、Sec13/31-Cy3 が非特異的なアグリゲーションではなく、他の COPII 小胞形成因子との相互作用を介して膜上に集合しクラスターを形成することを表している。ここまでの結果から、Sar1 が GTP を加水分解し膜上から脱離するような状況であっても、Sec13/31 は cargo クラスター上に均一に局在

し膜上から解離してはいないということが明らかとなった。このことは膜上で一度 COPII コートが自身の形成する格子の中にアセンブルされると、もはや COPII コートを膜上に繫留するために Sar1 は必要とされないということを示唆している。

蛍光タンパク質を融合させた Sec23/24 を用いてクラスターを可視化しようとしたが、これには失敗した。Sec23/24 に蛍光タンパク質を融合させても Sec23/24 の持つ生化学的活性は維持されることが *In vivo* と *In vitro* の両方で報告されている (Iwasaki et al., 2015; Sato and Nakano, 2005a; Shindiapina and Barlowe, 2010)。加えて Sec13/31 に蛍光タンパク質を融合させたものを用いた場合もクラスターの形成を引き起こすことはできなかった。この原因として、Sec23/24 や Sec13/31 に比較的大きな蛍光タンパク質を融合させると平面膜上でコートを形成する際に立体障害を引き起こし、Sec23/24 や Sec13/31 が人工脂質平面膜上で水平方向に伸長できず cargo クラスターの形成を阻害したという可能性が考えられる。

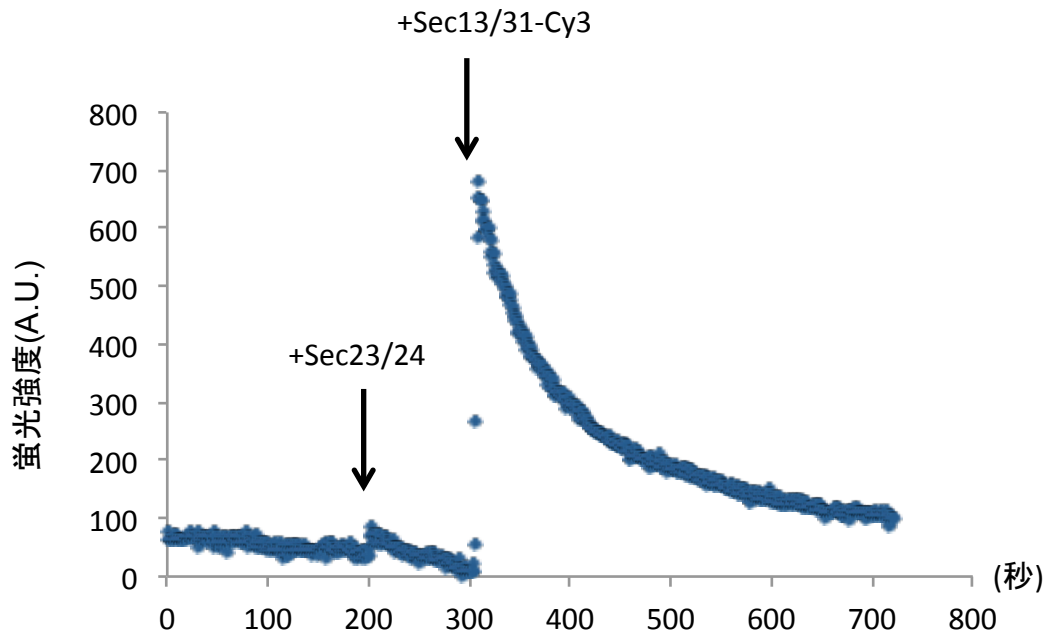


Figure 17. Sec13/31-Cy3 の GAP 促進活性の測定

buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM MgCl₂)、Sar1 (2 μM)、リポソーム (60 μg)、GTP (30 μM) からなる混合液をクォーツキュベットに入れ 10 分インキュベーションし、その後 Sec23/24 (40 nM) を添加し 100 秒反応させ、Sec13/31-Cy3 (94 nM) を添加した。Sec23/24 を添加した場合のトリプトファンの蛍光強度が減衰する傾きよりも Sec13/31-Cy3 を加えた場合の方が傾きが急なことから Sec13/31-Cy3 は GAP 活性を促進する活性を維持していることがわかる。

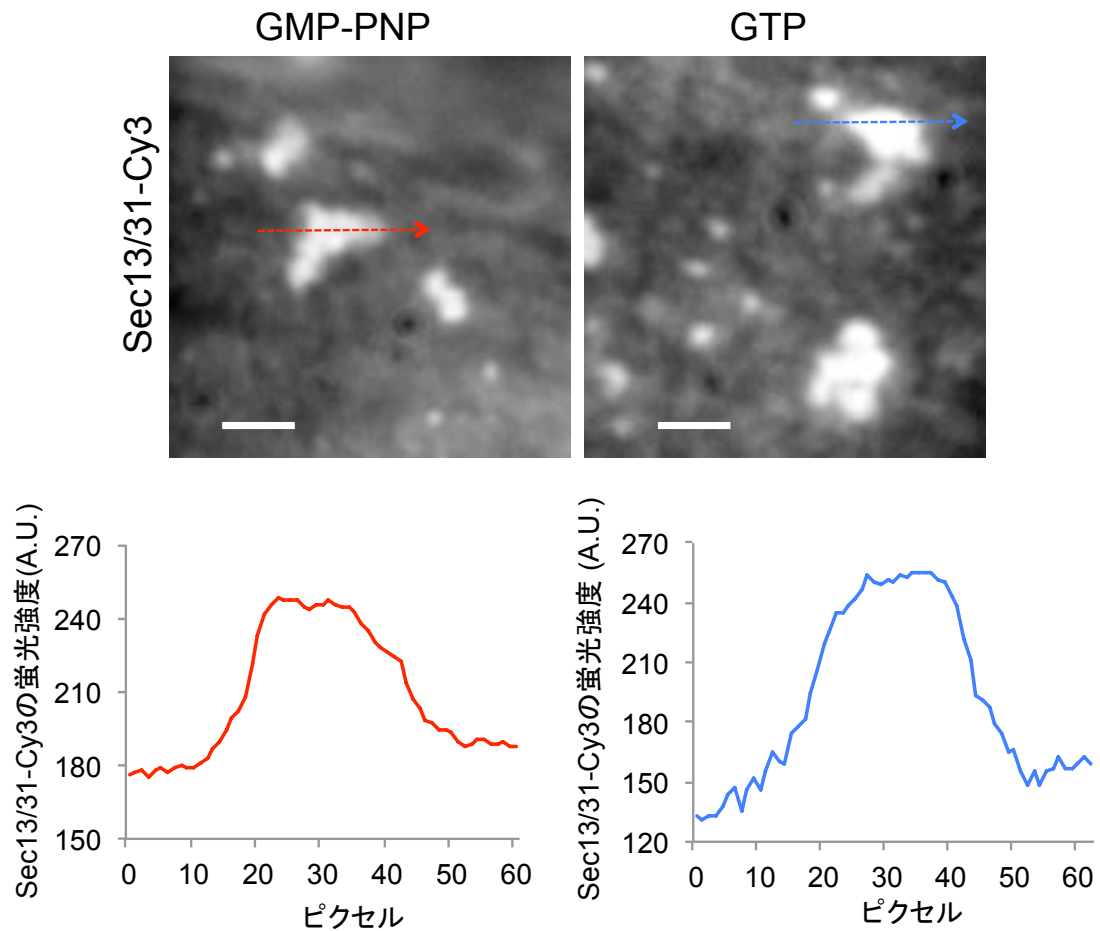


Figure 18. GMP-PNP 及び GTP 存在下で形成させたクラスターにおける Sec13/31-Cy3 の局在

Bet1 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 640 ng Sec23/24, and 1.65 μ g Sec13/31-Cy3) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP 及び GTP 存在下で cargo クラスターを形成させた。ここでは典型的な Sec13/31-Cy3 で標識されたクラスターの蛍光イメージを示している。蛍光イメージは全反射蛍光顕微鏡を用いて得たものである。下のグラフは上の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

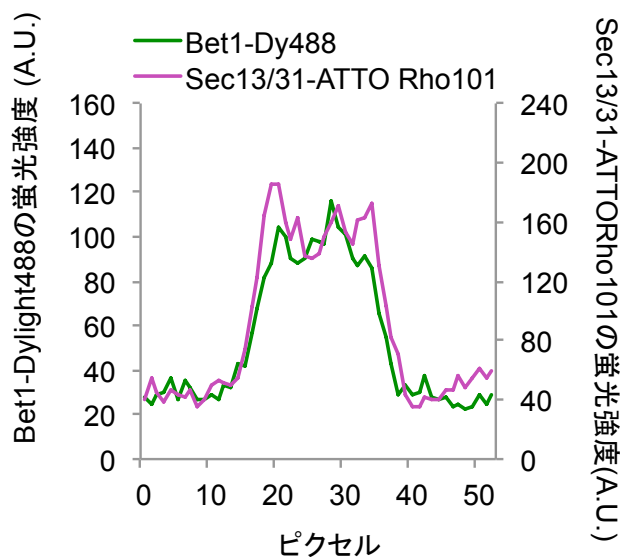
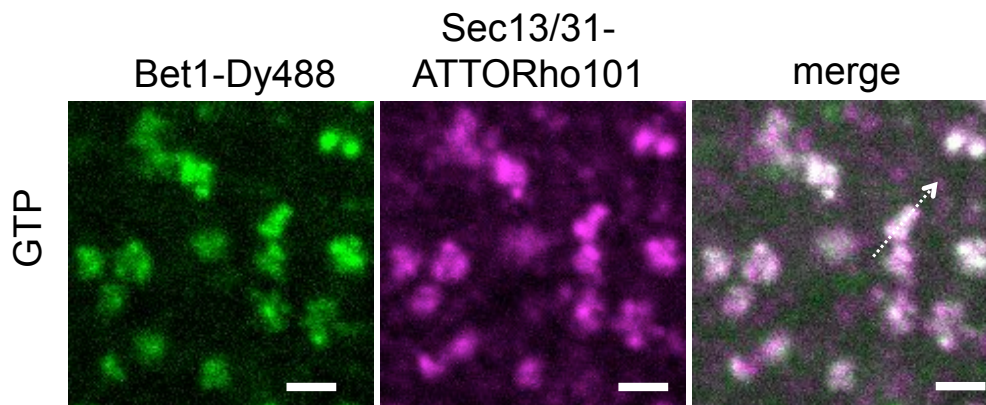


Figure 19. GTP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sec13/31-ATTORho101 の局在

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子 (100 ng Sar1, 380 ng Sec23/24, 970 ng Sec13/31, and 240 ng Sec13/31-ATTORho101) を上部チャンバー側から加え GTP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と Sec13/31-ATTORho101 の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得たものである。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

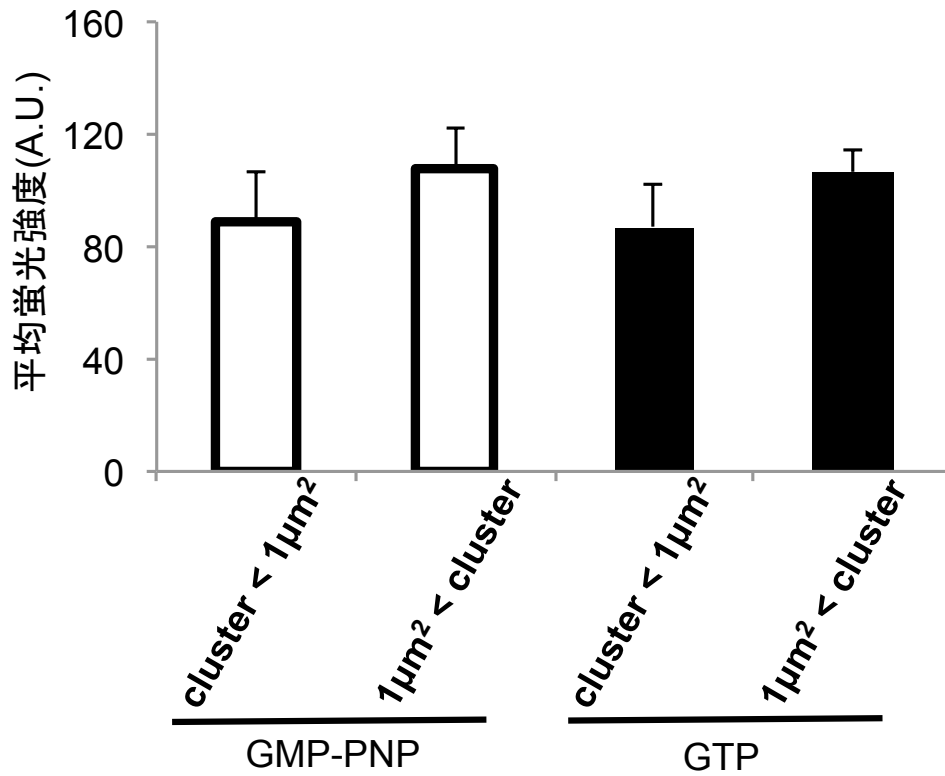


Figure 20. クラスタから発せられる Sec13/31-Cy3 の平均蛍光強度

膜上に形成させたクラスタから発せられる Sec13/31-Cy3 の平均蛍光強度を large クラスタ (>1 μm^2) と small クラスタ (<1 μm^2) の間で比較したもの。平均蛍光強度はバックグラウンド (クラスタ外) の平均蛍光強度を差し引き算出している。エラーバーは SEM を示している。

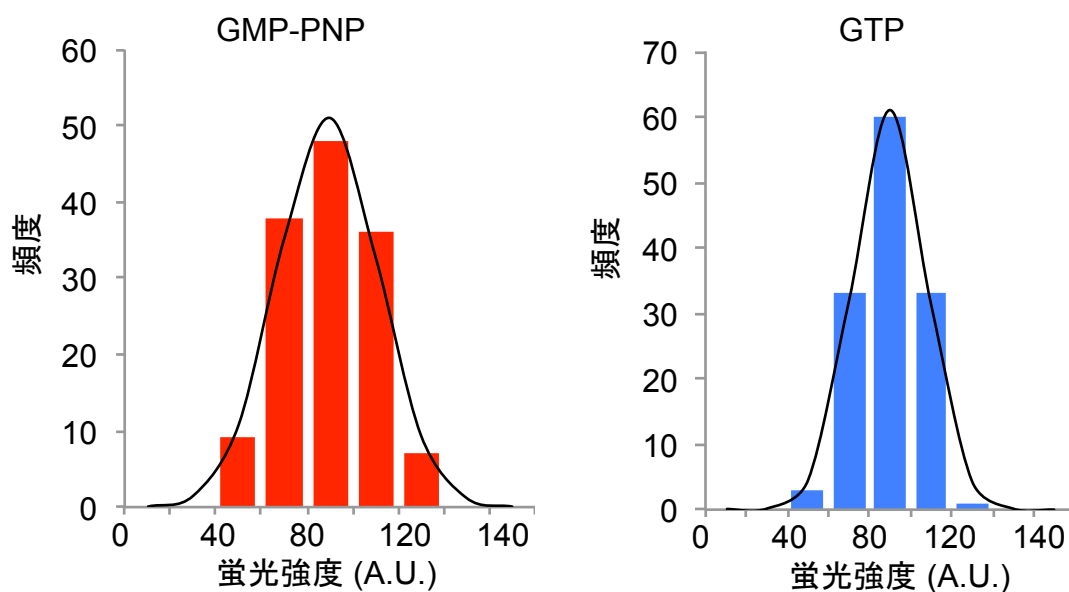


Figure 21. GMP-PNP 及び GTP 存在下で形成されたクラスターから発せられる Sec13/31-Cy3 の平均蛍光強度の分布

GMP-PNP および GTP 存在下で膜上に形成させた個々のクラスターから発せられる Sec13/31-Cy3 の平均蛍光強度の分布。平均蛍光強度はバックグラウンド(クラスター外) の平均蛍光強度を差し引き算出している。平均蛍光強度の分布は曲線で示されたガウシアン分布を示す。

3.3 Sec12 は cargo クラスターから排除される

Sar1 の膜上へのリクルートには GEF である Sec12(Barlowe and Schekman, 1993)との相互作用を必要とする。このため GTP 存在下において観察された Sar1 の局在と同様に Sec12 もクラスター辺縁部に集中して局在するのかどうかを調べた。ここでは Sec12 Δ lum に mOrange (mOrange-Sec12) もしくは mCherry (mCherry-Sec12) を融合させることで Sec12 を可視化する。mOrange-Sec12 と mCherry-Sec12 の両方が Sar1 に対する GEF 活性を持つかどうかを *In vitro* でのトリプトファン蛍光強度解析により確認した。Sar1 の GDP 型から GTP 型への変化は、Sar1 が持つトリプトファンの自家蛍光強度の増加として表される。これにより Sec12 の GEF 活性の強さをトリプトファン蛍光強度の増加の傾きとして検出することができる。Sec12 を含まない場合に比べ mOrange-Sec12 及び mCherry-Sec12 が存在しているとトリプトファン蛍光強度の増加の傾きが急なことから Sar1 に対する GEF 活性を備えていることが確認できた (Fig. 22)。まず mOrange を融合させた Sec12 Δ lum (mOrange-Sec12) を用いて、人工脂質平面膜上における cargo クラスター形成時の mOrange-Sec12 の動態を全反射蛍光顕微鏡により可視化した。その結果、cargo クラスターと思われる領域がバックグラウンドよりも低い蛍光強度を示し黒く抜ける蛍光イメージが得られた (Fig. 23)。mCherry を融合させた Sec12 Δ lum (mCherry-Sec12) と Bet1-Dy488 を用いて共焦点蛍光顕微鏡下で cargo クラスターを形成させたところ、mCherry-Sec12 で黒く抜けた領域が Bet1-Dy488 によりラベルされた cargo クラスター領域と一

致することが確認できた (Fig. 24)。そして全反射蛍光顕微鏡により得られた蛍光イメージに対してラインスキャン蛍光強度解析をおこなったところ、mOrange-Sec12 は、Sar1 のように cargo クラスター辺縁部に集中して局在しているのではなく、クラスター外の領域に均一に局在することが明らかとなった。加えて cargo クラスターに含まれる mOrange-Sec12 の密度はクラスター外の密度と比較して著しく低かった (Fig. 23)。これらの結果は Sec12 が cargo クラスターから選択的に排除されていることを示している。また cargo クラスターから Sec12 が排除される割合を (クラスター内の平均蛍光強度 / クラスター外の平均蛍光強度) を比較したところ GMP-PNP 存在下 (67.2±4.0%) と GTP 存在下 (67.8±7.3%) の間で変化はなかった (Fig. 25)。このことは Sec12 の排除が Sar1 の GTP 加水分解サイクル非依存的に行われていることを示唆している。

所属する研究室の先行研究によりに cargo ではない膜タンパク質 (non-cargo) である Ufe1 は Sar1 の GTP 加水分解サイクルに依存して選択的に cargo クラスターから排除されることが報告されている (Tabata et al., 2009)。そこで Ufe1 と Sec12 の間で cargo クラスターからの排除される効率を直接的に比較することとした。ここでは、GFP を融合させた MBP-Ufe1 (Sato and Nakano, 2004) (GFP-Ufe1) と mCherry-Sec12 を用いて cargo クラスター領域における両者の蛍光強度の比をとる (GFP-Ufe1 の蛍光強度 / mCherry-Sec12 の蛍光強度) ことで GFP-Ufe1 が mCherry-Sec12 に対してどの程度 cargo クラスターに取り込まれているのかを比較している。実際に、GMP-PNP 存在下では GFP-Ufe1 の方

が mCherry-Sec12 よりも多く cargo クラスターに取り込まれていた (2.81 ± 0.39)。それに対し、GTP 存在下では cargo クラスター内に取り込まれる量に両者の間でほとんど差はなかった (1.31 ± 0.19) (Fig. 26 及び 27)。以上の結果から cargo クラスターから Sec12 が排除される度合いが GTP 加水分解の有無で影響を受けないこと、そして Sec12 は常に GTP 存在下で Ufe1 が cargo クラスターから排除される効率と同程度の効率で排除されていることが明らかになった。このことは、cargo クラスターから Sec12 を排除するメカニズムが COPII 小胞形成機構に備わっており、それは Ufe1 を排除するメカニズムとは異なるメカニズムを用いて行われていることを示唆している。

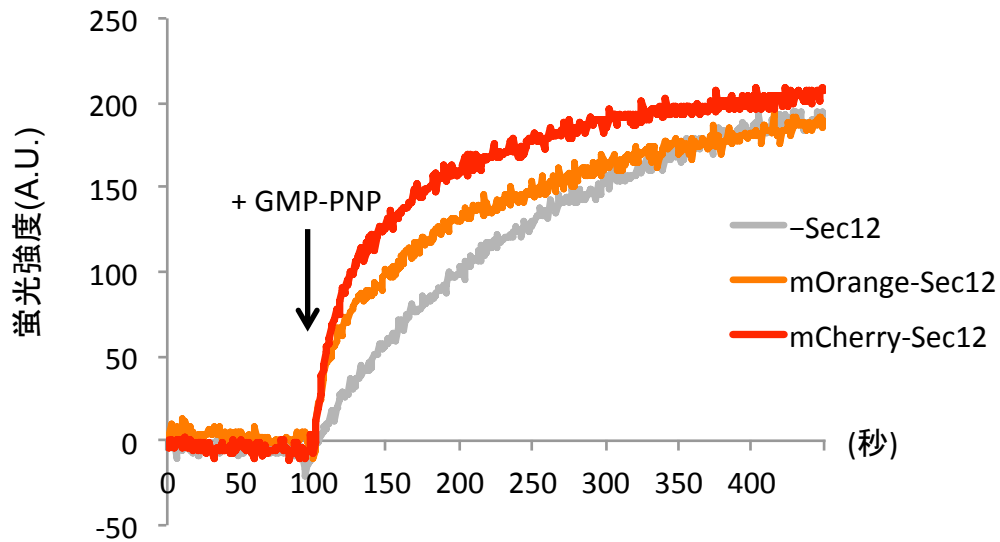


Figure 22. mCherry-/mOrange-Sec12 の GEF 活性測定

buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM $MgCl_2$)、Sar1 (800nM)、リポソーム (20 μ g) そして mOrange-Sec12 もしくは mCherry-Sec12 (50nM) からなる混合液をクォーツキュベットに入れ 10 分インキュベーションし、GMP-PNP (0.1mM) を添加し反応を観察した。mOrange-Sec12 もしくは mCherry-Sec12 が存在する場合、トリプトファンの蛍光強度の増加の傾きが急なことから Sar1 に対する GEF 活性を備えていることがわかる。

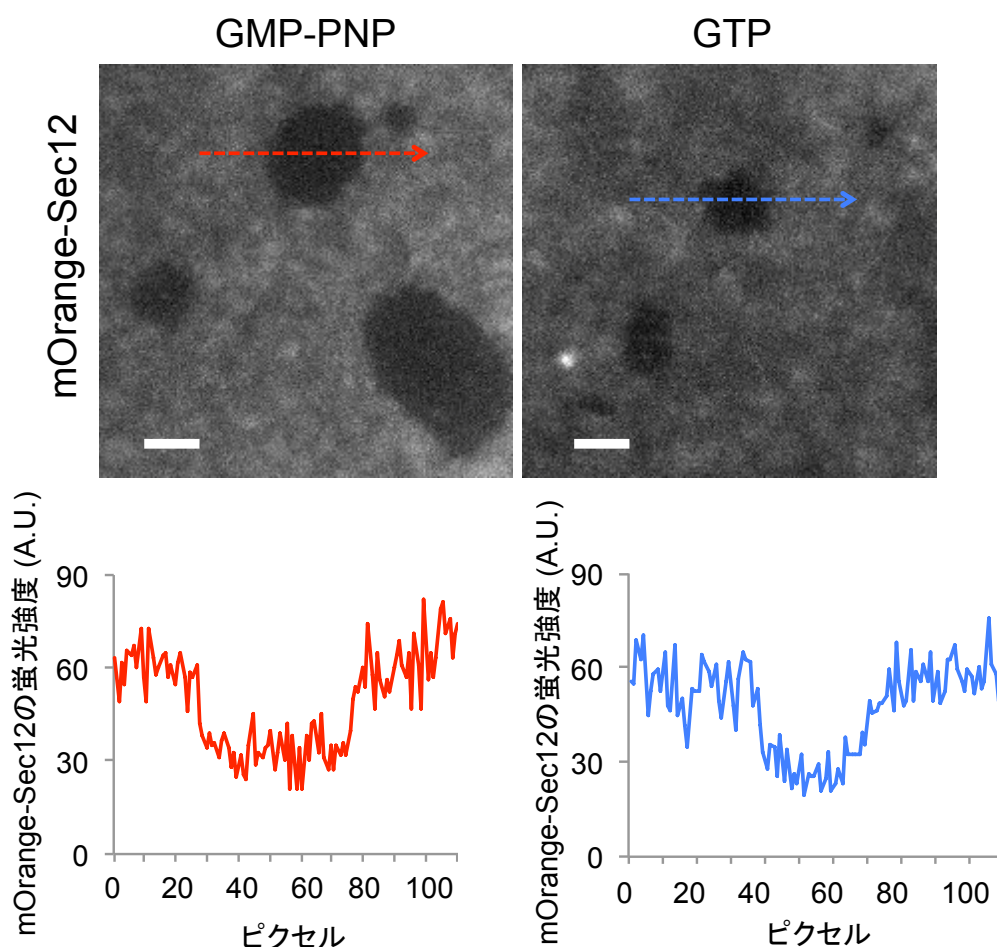


Figure 23. GMP-PNP 及び GTP 存在下で形成させた cargo クラスターと mOrange-Sec12 の局在

Bet1 及び mOrange-Sec12 を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子 (100 ng Sar1, 640 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP もしくは GTP 存在下で cargo クラスターを形成させた。ここでは cargo クラスター形成時の Sec12 の蛍光イメージを示している。これらの蛍光イメージは全反射蛍光顕微鏡を用いて得たものである。下のグラフは上の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

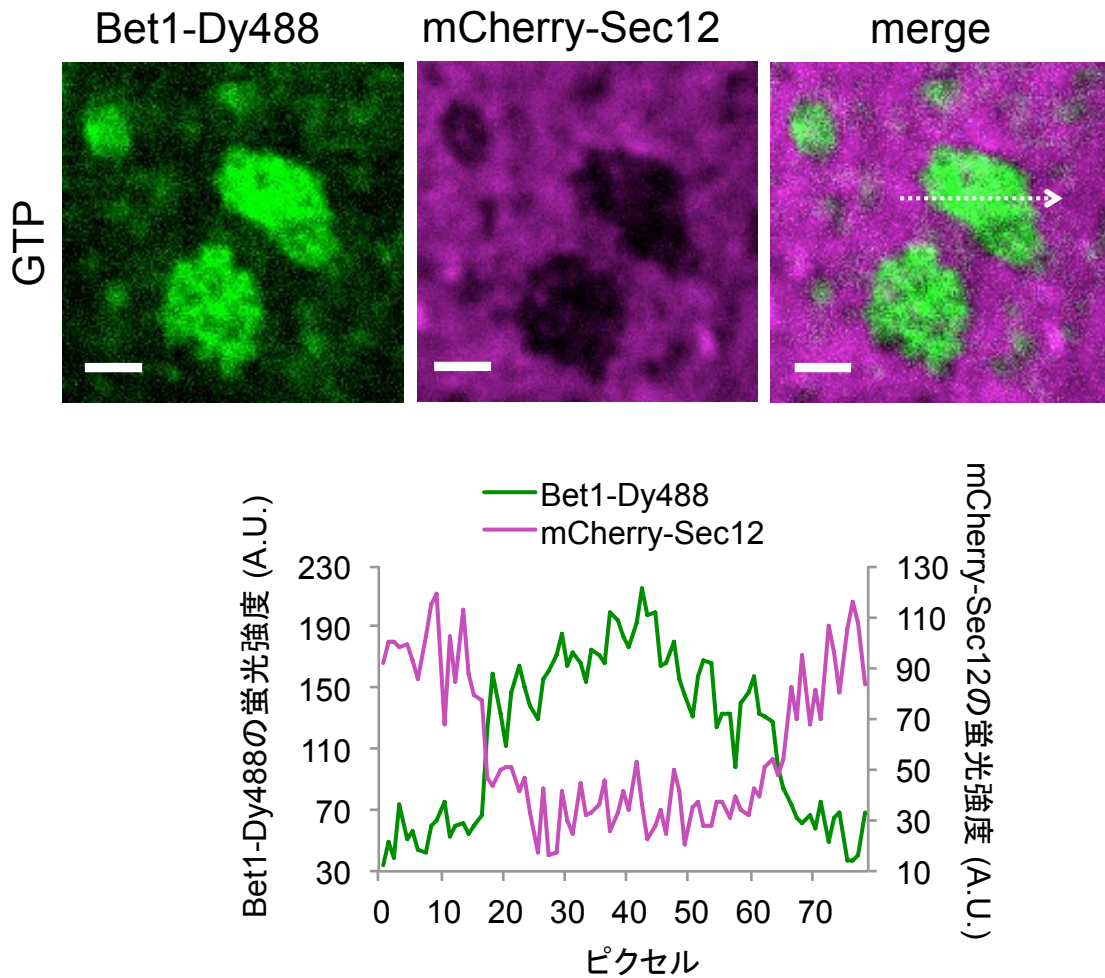


Figure 24. GTP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と mCherry-Sec12 の局在

Bet1-Dy488 及び mCherry-Sec12 を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 380 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバー側から加え GTP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と mCherry-Sec12 の蛍光イメージを示している。この蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得た。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

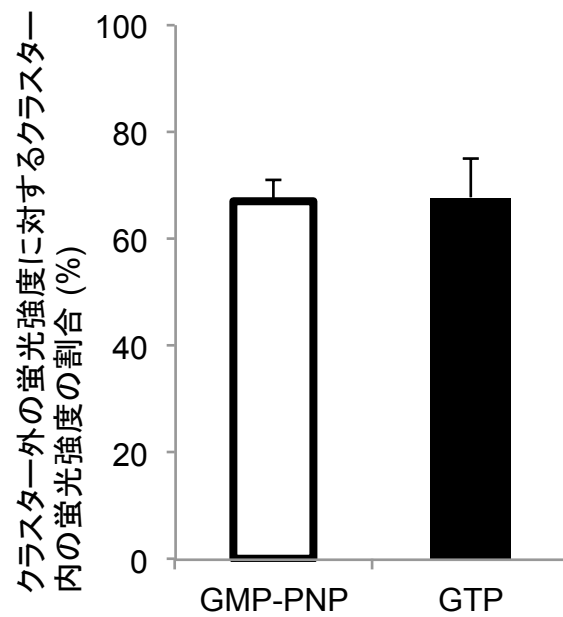


Figure 25. mOrange-Sec12 のクラスター外の蛍光強度に対するクラスター内の蛍光強度の割合

GMP-PNP 及び GTP 存在下において形成させた cargo クラスタにおいて、クラスター内の mOrange-Sec12 平均蛍光強度をクラスター外の mOrange-Sec12 平均蛍光強度で割った値の平均値を示している。エラーバーは SEM を示している。

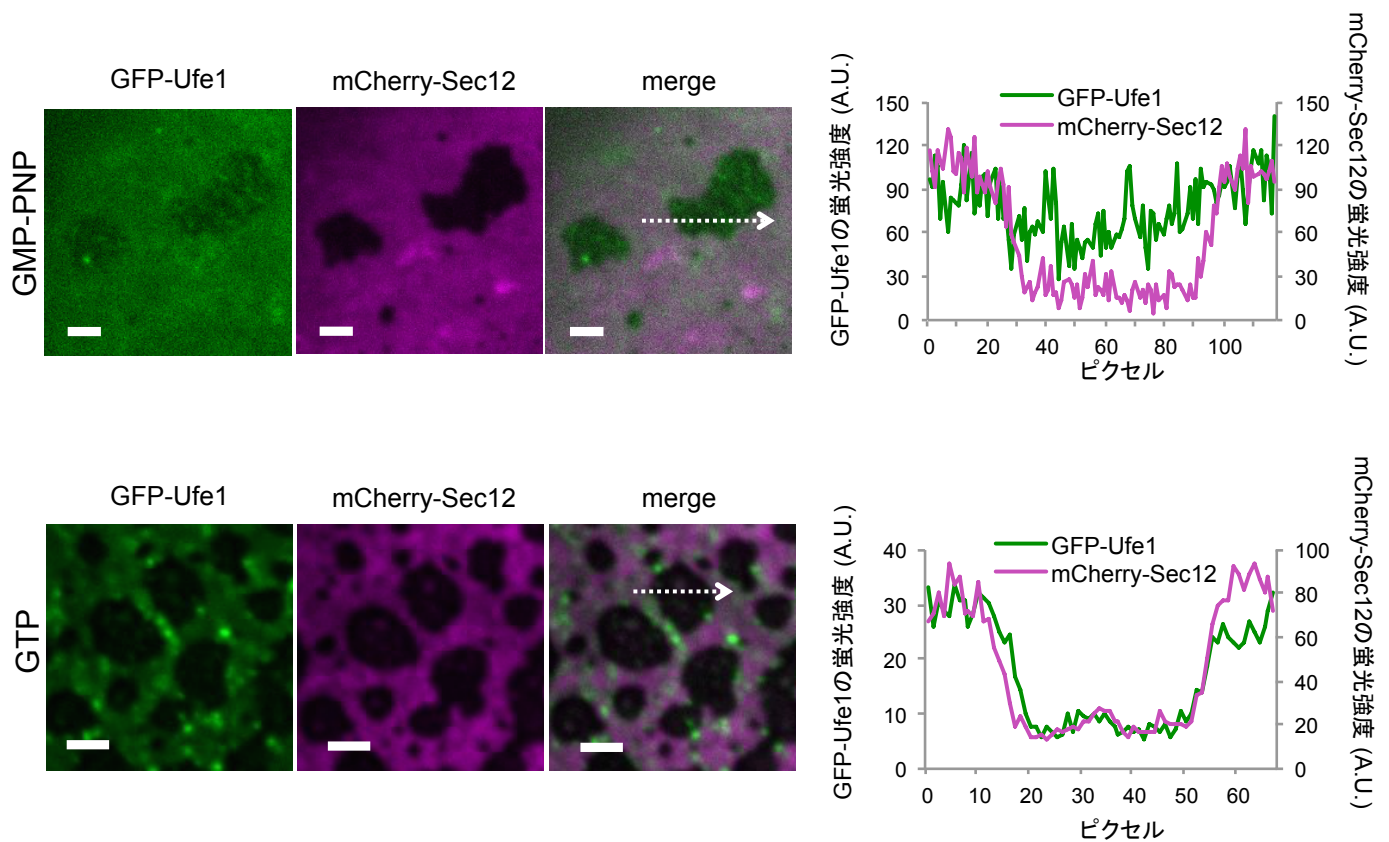


Figure 26. GMP-PNP 及び GTP 存在下で形成させた cargo クラスター上での GFP-Ufe1 と mCherry-Sec12 の局在

Bet1、mCherry-Sec12 そして GFP-Ufe1 を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 345 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP もしくは GTP 存在下で cargo クラスターを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスター形成時の GFP-Ufe1 と mCherry-Sec12 の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得た。右のグラフはそれぞれ蛍光イメージに示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

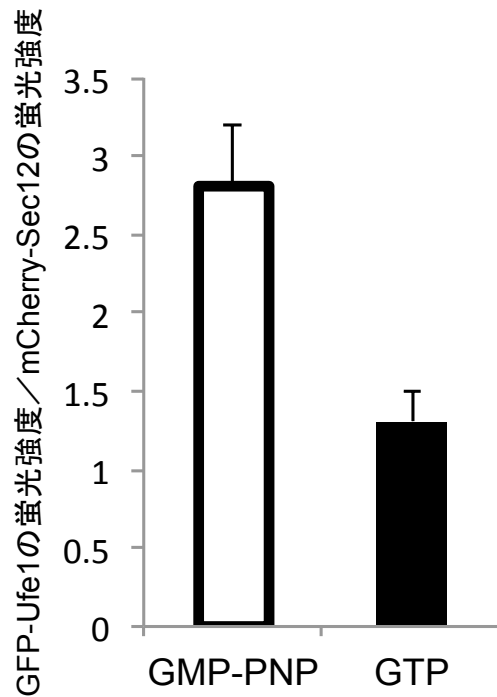


Figure 27. cargo クラスタから発せられる GFP-Ufe1 と mCherry-Sec12 の蛍光強度の比較

GMP-PNP 及び GTP 存在下において形成させた cargo クラスタにおいて、クラスタ内の GFP-Ufe1 の蛍光強度 / mCherry-Sec12 の蛍光強度をとることにより、GFP-Ufe1 が mCherry-Sec12 に対してどの程度クラスタに取り込まれているのかを比較している。エラーバーは SEM を示している。

3.4 cargo クラスター形成における Sec16 の動態

Sec16 は ERES を形成する為に必須の因子であり、COPII コートのサブユニットや Sar1 と相互作用することが知られている (Connerly et al., 2005; Espenshade et al., 1995; Gimeno et al., 1996; Shaywitz et al., 1997; Yorimitsu and Sato, 2012)。所属する研究室の先行研究により蛍光標識した Sec16 が人工脂質平面膜上で自己集合しホモオリゴマーを形成した結果、平面膜上に均一に分散したドットとして観察できることが報告されている (Yorimitsu and Sato, 2012)。しかしながら、COPII 小胞形成過程における COPII 小胞形成因子と Sec16 の時間的な動態は不明なままである。この謎を調べる為、蛍光標識した Sec16 (Sec16-mCherry) と Bet1-Dy488 を用いて cargo クラスター形成した際の両者の動態を共焦点蛍光顕微鏡により可視化することとした。まず、精製した Sec16-mCherry が、Sec31 による Sec23 の GAP 活性促進を阻害する生化学的活性を持つかどうかをトリプトファン蛍光強度解析により確認した。その結果 Sec16-mCherry を加えたことにより Sar1 の GTPase 活性が抑制されていることが明らかとなった (Fig. 28)。このことは Sec16-mCherry が Sec31 による GAP 促進を阻害していることを意味しており、Sec16-mCherry が生化学的活性を持つことを示している。次に、GTP 存在下で COPII 小胞形成因子 (Sar1・Sec23/24・Sec13/31) と Sec16-mCherry を混合したものを人工脂質平面膜上に添加し、cargo クラスターを形成させた。その結果、Bet1-Dy488 でラベルされた cargo クラスターの領域では強い Sec16-mCherry のシグナルが検出されたのに対し、クラス

ター外では Sec16-mCherry シグナルは弱かった (Fig. 29)。このことは cargo クラスターに Sec16 が選択的に取り込まれていることを示唆している。

また、Sar1 の GTP 加水分解サイクルが Sec16 の動態にどのような影響を与えるのかを調べるため GMP-PNP 存在下での解析を行った。GMP-PNP 存在下で COPII 小胞形成因子と Sec16-mCherry を平面膜上に添加したところ、cargo クラスターへの Sec16 の取り込み効率が低下し、クラスター内から発せられる Sec16-mCherry シグナルがクラスター外のシグナルよりも低くなることが判明した (クラスター外の蛍光強度の $70.4 \pm 5.7\%$) (Fig. 30)。この結果は、GMP-PNP 存在下では Sec16 が cargo クラスターから排除されるということを示している。この結果をさらに検証するため、Bet1-Dy488 の代わりに Sar1-Dy488 により cargo クラスターを可視化することとした。GMP-PNP 存在下では cargo の濃縮が起こらないため、Bet1-Dy488 では cargo クラスター領域が不明瞭になる。一方で Sar1 は膜上から脱離しないため、Sar1-Dy488 はクラスター領域を鮮明に可視化することが可能である。GMP-PNP 存在下で Sar1-Dy488 と Sec16-mCherry を用いて同様の実験を行ったところ、cargo クラスターから Sec16-mCherry が排除されることが示された。(クラスター外の蛍光強度の $66.8 \pm 7.9\%$) (Fig. 31)。

以上の結果から、Sec16 が COPII コートで覆われる領域に取り込まれるためには Sar1 の GTP 加水分解サイクルが必須であることが明らかになった。加えて、GMP-PNP 存在下では COPII コートが膜上に繫留されているにも関わらず cargo クラスター内に取り込まれないことから、Sec16 は COPII コート形成

が完了し膜上に繫留された COPII コート因子との非特異的結合によって cargo クラスタへ取り込まれるのではないということが示唆された。そこで、COPII コート形成と共に Sec16 が cargo クラスタへ取り込まれるのかどうかを検証することにした。ここでは、GTP 存在下であらかじめ cargo クラスタを形成させておき、そこに Sec16-mCherry を添加することでクラスタと Sec16 の動態を観察した。この場合、Sec16-mCherry は cargo クラスタ内には取り込まれておらず、GTP 存在下での Sar1 の局在と同様にクラスタの辺縁部を取り囲むように局在していた (Fig. 32)。この結果は cargo クラスタへの Sec16 の取り込みが Sec16 と膜上に繫留された COPII 小胞形成因子との非特異的相互作用によるものではないことを強く裏付けるものである。加えて、Sec16 の取り込みは COPII コート伸長領域における Sar1 の GTP 加水分解サイクルと密接に関係していることを強く示唆している。

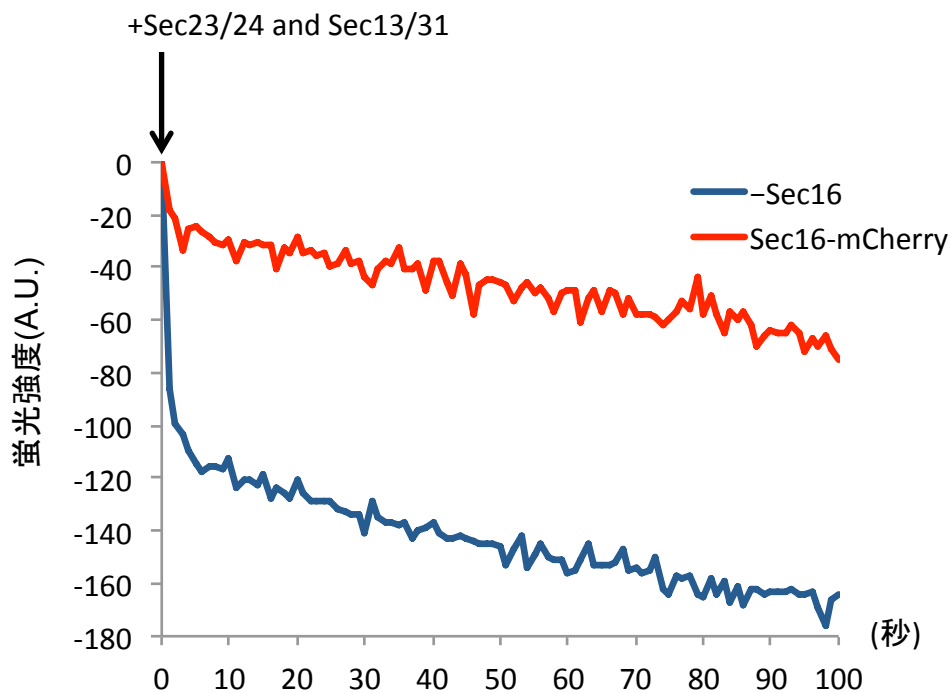


Figure 28. Sec16-mCherry の GAP 活性化阻害活性の測定

Sec16-mCherry (33nM)、バッファー (20 mM HEPES-KOH, pH 6.8, 150 mM KOAc, 1 mM MgCl₂)、Sar1 (800nM)、リポソーム (60μg)、GTP (0.2mM) からなる混合液をクォーツキュベットに入れ 10 分インキュベーションし、その後 Sec23/24 (50nM) 及び Sec13/31 (50nM) の混合液を添加して観察を行った。Sec16-mCherry によりトリプトファンの蛍光強度の減衰が緩やかになっていることから、Sec31 による Sec23 の GAP 活性促進が阻害されていることがわかる。

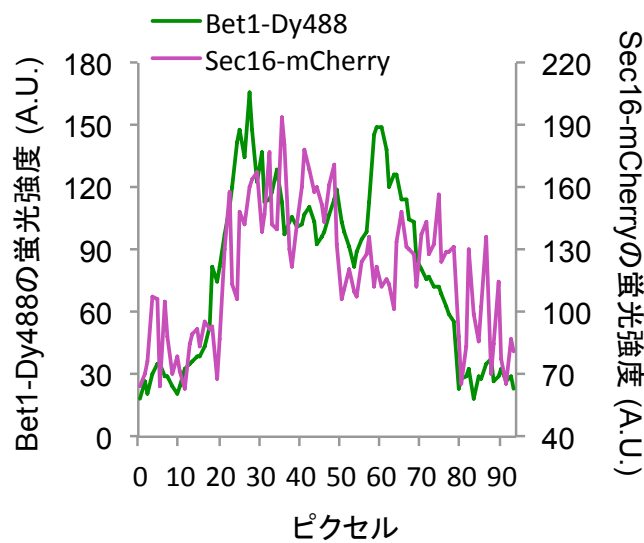
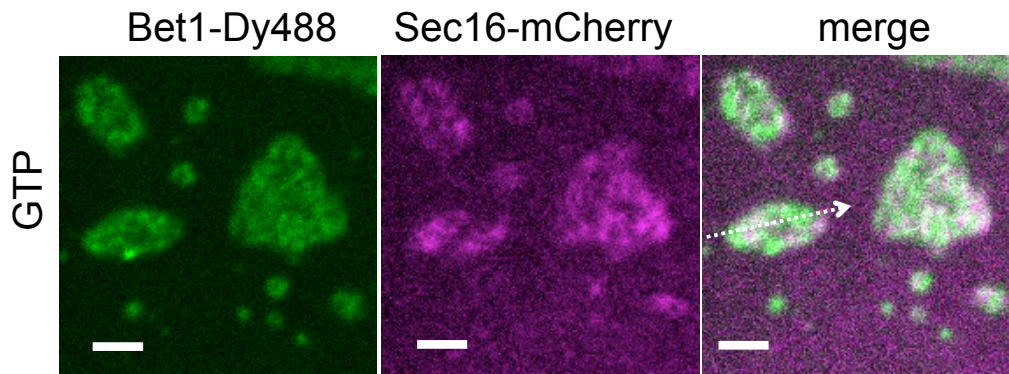


Figure 29. GTP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sec16-mCherry の局在

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 380 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31)と Sec16-mCherry (93.6 ng) を上部チャンバー側から加え GTP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と Sec16-mCherry の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微により得たものである。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得たものである。スケールバーは 2 μ m

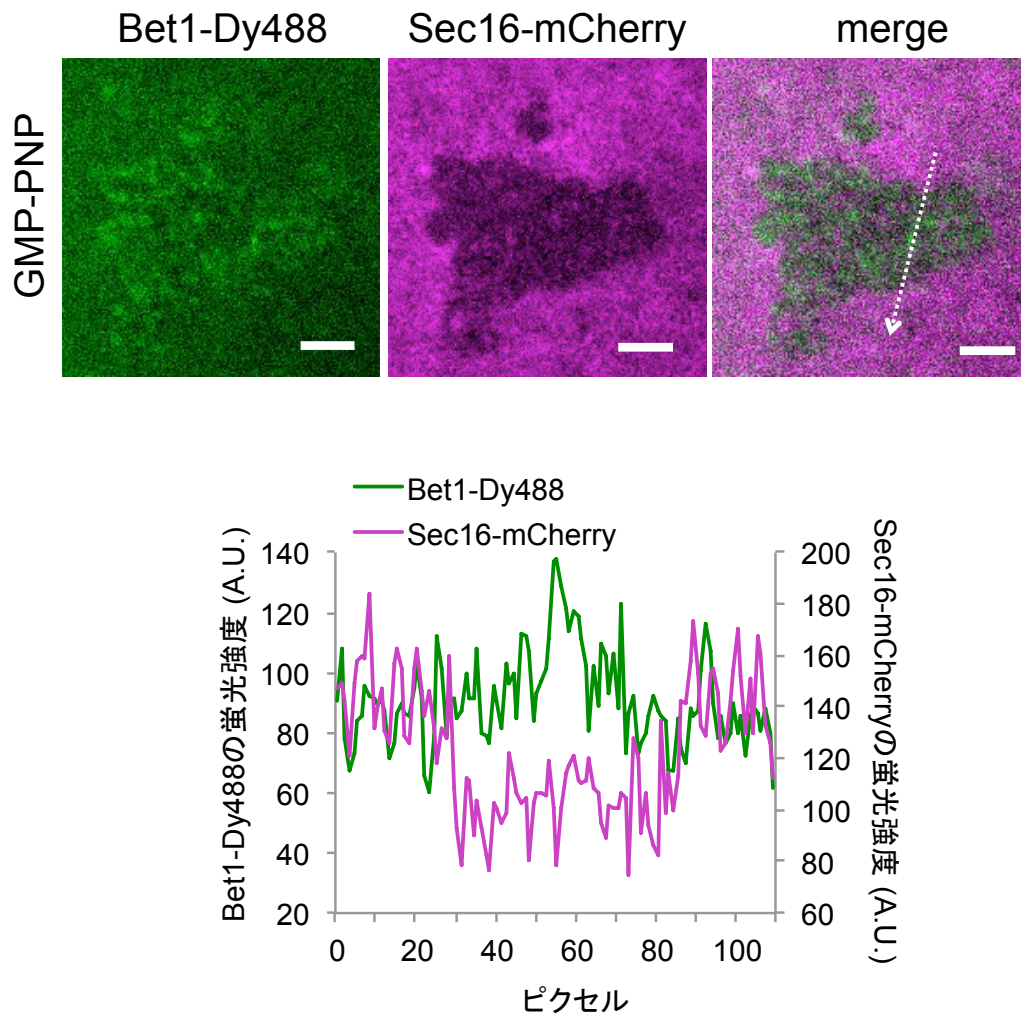


Figure 30. GMP-PNP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sec16-mCherry の局在

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 380 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31)と Sec16-mCherry (93.6 ng) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Bet1-Dy488 と Sec16-mCherry の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微により得た。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得たものである。スケールバーは 2 μ m

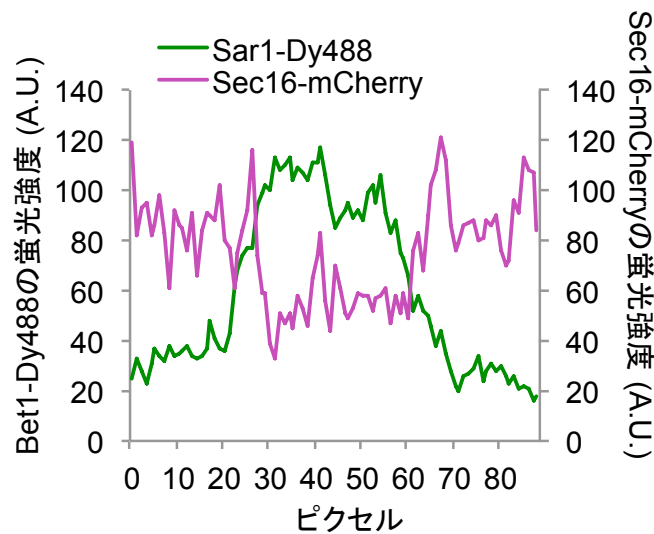
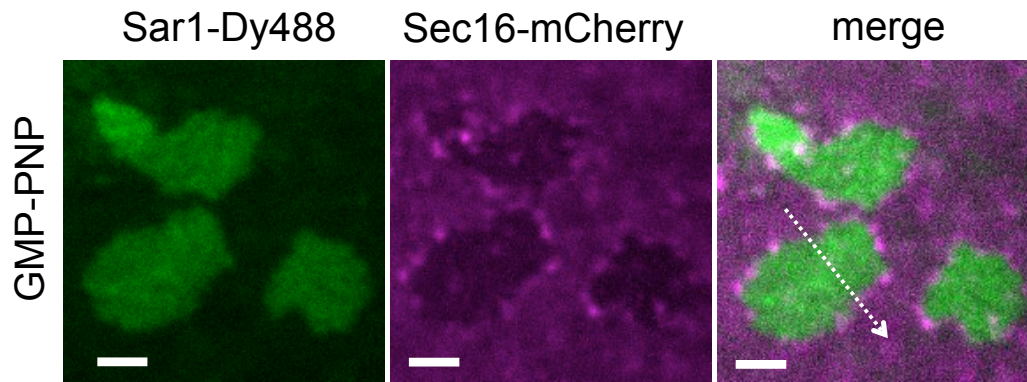


Figure 31. GMP-PNP 存在下で形成させた cargo クラスタにおける Sar1-Dy488 と Sec16-mCherry の局在

Bet1 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(86 ng Sar1-Dy488 , 380 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31)と Sec16-mCherry (93.6 ng) を上部チャンバー側から加え GMP-PNP 存在下で cargo クラスタを形成させた。ここでは典型的な cargo クラスタ形成時の Sar1-Dy488 と Sec16-mCherry の蛍光イメージを示している。蛍光イメージは共焦点蛍光顕微により得た。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

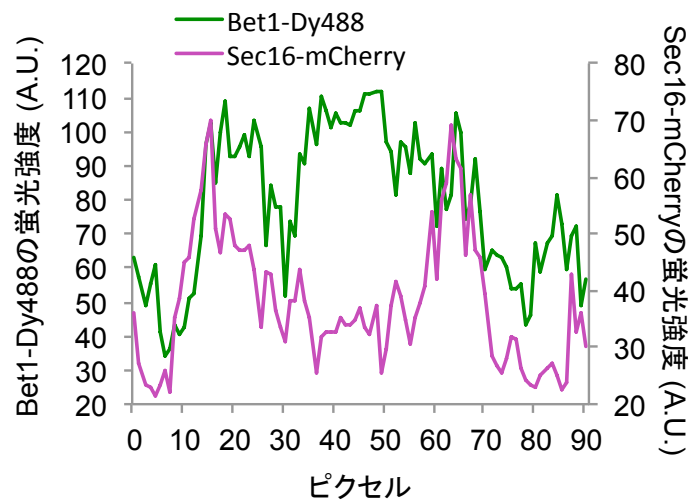
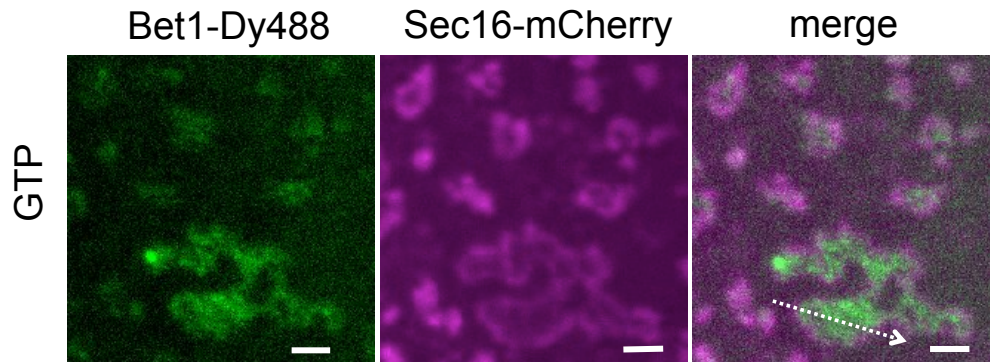


Figure 32. GTP 存在下で形成させた cargo クラスタに Sec16-mCherry を加えた場合の Sec16-mCherry の動態

Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に COPII 小胞形成因子(100 ng Sar1, 380 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31)を添加し 10 分インキュベーションし GTP 存在下で cargo クラスタを形成させた。その後、Sec16-mCherry (124.8 ng) を加え、cargo クラスタに対する Sec16-mCherry の動態を共焦点蛍光顕微鏡で可視化した。ここでは典型的な cargo クラスタにおける Bet1-Dy488 と Sec16-mCherry の蛍光イメージを示している。下のグラフは右の蛍光イメージで示された矢印領域のラインスキャン蛍光強度解析により得られたものである。スケールバーは 2 μ m

3.5 小胞体チューブネットワーク構造の再構成

小胞体はシート状の構造とチューブ状の構造が組み合わされた1枚の膜からなるオルガネラである。チューブ状の構造は互いに繋がりネットワーク構造を形成している。このネットワーク構造の三又の領域（チューブ状構造同士が互いに繋ぎ合わされた部分）では膜の曲率が極めて高くなっており、この曲率を作り出すために必須な因子として *reticulon (Rtn)* と *REFP*（出芽酵母では *Yop1*）という二つのタンパク質ファミリーが特定されている(Voeltz et al., 2006)。*Rtn* と *REFP* ファミリーのタンパク質は全ての真核細胞に保存されており、膜の曲率を維持するため互いにリダンダントに働いている。加えてこれらのタンパク質はC末端領域に両親媒性ヘリックスを持っており、これが膜に結合することで曲率を生み出しているのではないかと考えられている(Brady et al., 2015; Voeltz et al., 2006)。実際にこれらのタンパク質をリポソームに再構成すると、リポソームが小胞構造からチューブ状構造に変化することが報告されている(Hu et al., 2008)。一方でチューブ構造を繋ぎ合わせネットワーク構造にするためには膜融合が不可欠である。この膜融合は *atlastin*（出芽酵母では *Sey1*）というタンパク質ファミリーにより引き起こされているのではないかと考えられている。このタンパク質は膜結合型の *GTPase* であり、*GTP* 加水分解依存的に膜融合を引き起こすことが報告されている(Hu et al., 2009; Orso et al., 2009)。そして、上記のタンパク質がチューブネットワーク構造を形成するための最小構成因子であるということが報告されている(Powers et al., 2017)。

出芽酵母では ERES が小胞体チューブネットワークの三又の領域に形成されやすいことが報告されている(Okamoto et al., 2012)。加えて ERES の形成に必須の因子である Sec16 は *Drosophila* や哺乳類の細胞では小胞体膜上で凹状カップ型構造をとる領域に局在することが報告されている(Budnik and Stephens, 2009; Hughes et al., 2009; Ivan et al., 2008)。このように、膜の曲率が高い領域に Sec16 は局在し COPII コートは集積しているが、膜の曲率それ自体が選択的な Sec16 や COPII コートのリクルートに影響を与えるのかどうかということについては未だ明らかになっていない。本研究に用いた人工脂質平面膜は小胞の縊り切りを防ぐために膜の湾曲を強く阻害するため、COPII 小胞形成因子や Sec16 の動態に膜の曲率がどのような影響を与えるのかを解析することはできず、上記の謎にも答えられなかった。

そこでより細胞内に近い条件で COPII 小胞形成因子や Sec16 の動態を解析することを目的として、再構築したチューブネットワーク上で COPII 小胞形成因子や Sec16 の動態を直接可視化するための実験系の構築を行うこととした。ここでは、チューブネットワークを構成するための最小因子である Yop1 と Sey1 を共に再構成したプロテオリポソームを用いてチューブネットワーク構造を再構成可能かどうか検証した。Yop1 と AcGFP を N 末端に融合させた Sey1 (GFP-Sey1) を再構成したプロテオリポソームそして GTP もしくは GDP を混合した溶液をアガロースコートした 2 枚のカバーガラスで挟み込み、20 分ほど反応させて共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察を行った (Fig. 33)。その結果、Sey1

の GTP 加水分解依存的にプロテオリポソームの融合が起こり、Fig. 33 に矢じりで示されたチューブ状の構造とそれらが互いに融合したチューブネットワーク構造が確認できた。再構成したチューブネットワークは曲率の高い膜構造を備えていることから、ここで COPII 小胞形成を再構成すればより生理的機能を反映した Sec16 や COPII 小胞形成因子の動態を可視化し解析することができると期待される。

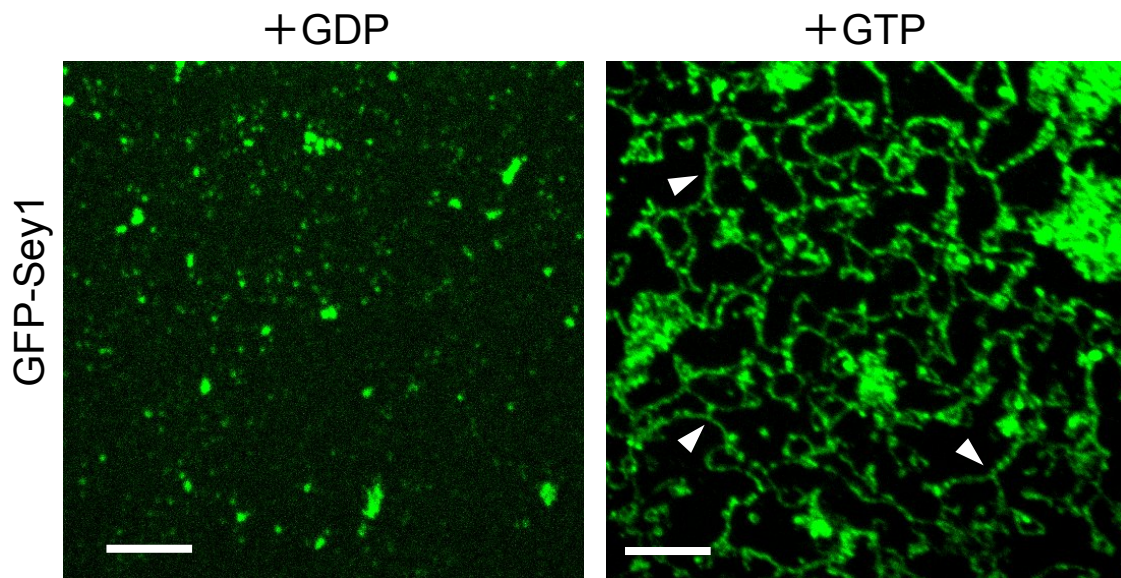


Figure 33. リポソームを用いたチューブネットワークの再構成

Yop1 と GFP-Sey1 を共に再構成したリポソームを用いてチューブネットワークを再構成させた。ここに示した蛍光イメージは共焦点蛍光顕微鏡を用いて得た。左の蛍光イメージは GDP 存在下で得られたものである。この場合 Sey1 の GTP 加水分解が起こらないため膜融合が起こらずチューブネットワークは形成されない。右の蛍光イメージは GTP 存在下で得られたものである。Sey1 の GTP 加水分解により膜融合が起こり矢じりで示されたチューブネットワークを構築する。スケールバーは 10 μm

第 4 章 考察

本研究では人工脂質平面膜を用いた実験系に蛍光イメージングを組み合わせることで、膜上で水平方向に COPII コートが伸長していく過程での COPII 小胞形成因子の動態を可視化し解析することに成功した。これにより COPII 小胞形成過程における COPII 小胞形成因子と Sec16 の時空間的動態を解析した。

Sec23 と Sec31 により誘発される Sar1 の GTP 加水分解により、膜上から Sar1 が脱離し COPII コートの脱コートを引き起こすことで、ゴルジ体膜と COPII 小胞が膜融合可能になる。しかしながら、COPII 小胞形成過程においていったいどのタイミングで Sar1 と COPII コートが膜上から脱離するのかということは全く分かっていなかった。本研究により、Sar1 は GTP 存在下において cargo クラスターの辺縁部に集中して局在し機能していることが明らかとなった (Fig. 9~16)。この結果は、COPII 小胞形成過程の初期段階、すなわち COPII 小胞が小胞体膜上から絞り切られるよりも前の段階で膜上から Sar1 が脱離していることを示唆している。一方で、Sar1 が膜上から脱離しても cargo クラスター上に Sec13/31 が繫留されていたことから (Fig. 17~21)、COPII コートは小胞形成過程の初期段階では脱コートされないことが示唆された。最近 *S. cerevisiae* を用いたライブセルイメージングにより、Sar1 が小胞体膜上の COPII コートに覆われた領域を取り囲むように局在することが報告された (Kurokawa et al., 2016)。本研究の結果はこの報告と一致する。また本研究では COPII コートのインナーコートである Sec23/24 を可視化することができなかった。しかしながら、Sec23 が Sec31 と結合し Sec13/31 を膜上に繫留するための足場となっ

ていることを考慮すると(Bi et al., 2007)、Sec23/24 が cargo クラスター全域に局在していると予測される。Sec24 と cargo とのアフィニティーは Sar1 と Sec23 のものに比べ低く(Mossessova et al., 2003)、Sec12 に依存した GTP 型 Sar1 の供給がなければ cargo と結合した Sec23/24 はごく短時間しか膜上に維持されない(Sato and Nakano, 2005a)。しかしながら本研究により、一度膜上での COPII コートの形成が完了すると Sar1 はもはや COPII コートの膜上への繫留には必要とされないことが示唆された (Fig. 17~21)。これらの示唆及び結果は、GTP 存在下で試験管内再構成系により形成された COPII 小胞には COPII コートが残存しているが Sar1 は存在しないという報告と整合性のとれるものである(Barlowe et al., 1994)。また COPII 小胞がゴルジ膜と膜融合するためには膜上から COPII コートを脱コートさせ SNARE タンパク質を膜上に露出させなければならない。Sar1 による GTP 加水分解が COPII 小胞からの脱コートを制御しているのではないことが本研究で示唆されたことから、脱コートを引き起こす何らかの制御機構が別に存在する可能性が考えられる。実際に COPII コート形成因子 (Sec23 及び Sec31) に対するリン酸化・脱リン酸化が COPII コートの脱コートに関与しているのではないかという報告がなされている(Lord et al., 2011)。

所属する研究室の先行研究は、Sar1 の GTP 加水分解サイクルに依存して cargo ではない膜タンパク質 (non-cargo) が cargo クラスターから選択的に排除されていることを示した(Tabata et al., 2009)。COPII コートにおいて小胞膜上を直接覆う因子は Sar1 と Sec23/24 であり(Bi et al., 2002)、直径 60nm の COPII 小

胞 1 つあたり 48 個の Sar1-Sec23/24 複合体が含まれる。Sar1 及び Sec23/24 の結晶構造解析から Sar1-Sec23/24 複合体 1 個あたりの表面積が判明しており、直径 60nm の COPII 小胞を 48 個の Sar1-Sec23/24 複合体で覆った場合、覆われる表面積は 80%になる(Fath et al., 2007)。ここに cargo が Sec24 を介して結合すると表面積の大部分が覆われることとなる。このことから、Sec13/31 により架橋された出芽前駆複合体が物理的な障害となることで、輸送シグナルを持たない膜タンパク質が cargo クラスターに取り込まれるのを防いでいると考えられている。実際に本研究により non-cargo である Sec12 は選択的に cargo クラスターから排除されていた。しかしながら、Sec12 の排除は Sar1 の GTP 加水分解サイクルに依存しないものであった (Fig. 22~27)。本研究では Sec12 が GTP 加水分解非依存的に排除を受ける理由を明確にすることはできなかった。しかしながら Sec12 は単なる膜タンパク質ではなく Sar1 と相互作用することにより直接的に COPII 小胞の形成に関わるという事実と GTP 加水分解非依存的に排除を受ける理由には何か関係があるのかもしれない。

Sec23/24・Sec13/31 及び GTP 型 Sar1 をリポソームに加えると COPII 小胞を作り出すことが可能であり、Sec16 存在下では小胞の形成効率が促進されることが報告されている(Supek et al., 2002)。このため、Sec16 は COPII コートの膜へのリクルートに貢献していると考えられている。事実、Sec16 は個々の COPII 小胞形成因子と相互作用する領域を持っており、小胞体膜上で COPII コートの形成を促進するということが示唆されている(Gimeno et al., 1996;

Shaywitz et al., 1997; Yorimitsu and Sato, 2012)。しかしながら、Sec16-mCherry や 蛍光標識していない Sec16 が cargo クラスターの形状や形成効率に影響を与える様子は見られなかった (Fig. 34)。Sec16 は COPII 小胞形成過程のごく初期に影響を与える可能性が考えられ、本研究に用いたイメージング装置ではこの動態を追うための十分な時間分解能がなかったため Sec16 の影響を検出できなかったと推測される。一方で、Sec16 は *S. cerevisiae* や *Drosophila* そしてヒトの細胞において COPII 小胞もしくは小胞体-ゴルジ体間の中間区画の膜上に存在することが報告されている (Espenshade et al., 1995; Hughes et al., 2009; Ivan et al., 2008)。しかしながら、それらの膜上には COPII サブユニットの量に対して Sec16 はごくわずかしか存在していないのではないかと示唆されている (Connerly et al., 2005)。本研究では Sec16 が GTP 存在下で cargo クラスターに選択的に取り込まれることを示した (Fig. 29)。本研究に用いた実験系が選択的な cargo の濃縮と non-cargo の排除を再現可能である (Tabata et al., 2009) ことを考慮すると、この結果は COPII 小胞に取り込まれる Sec16 の量がどんなに低いものであっても、それは非特異的に取り込まれたものではないということを示唆している。Sec16 は 2000 残基程度の巨大なタンパク質であり、これがどのようにして COPII コート (Sar1-Sec23/24-cargo) により密に覆われた膜上に取り込まれるのだろうか? Sec16 ファミリーのタンパク質では、様々な種で高度に保存された central conserved domain (CCD) という 400 残基程度の特定の構造をとったドメインを持っている (Pietrosemoli et al., 2013; Whittle and Schwartz, 2010)。

一方でこの CCD の N 末端側と C 末端側の領域は特定の構造を持たない天然変性領域である。このことから、Sec16 の CCD ドメインのみが Sar1-Sec23/24-cargo により覆われた膜直上の領域に存在し、天然変性領域はその上の Sec13/31 が連結した比較的密度の低い領域に収納されることで、Sec16 の COPII コートへのリクルートを可能にしているのではないかと推測される。

所属する研究室の先行研究により、mOrange で蛍光標識した Sec16-mOrange を人工脂質平面膜上に添加すると、Sec16-mOrange がホモオリゴマーを形成し、膜上に均一に分散した蛍光スポットとして観察されることが報告されている (Yorimitsu and Sato, 2012)。本研究では Sec16 と COPII 小胞形成因子が同時に存在する場合、Sec16 が比較的均一に cargo クラスタ内に分布することを示した。このことは COPII コートと Sar1 が存在した影響によるものであり、これら因子が Sec16 の自己集合を制御する可能性があることを示唆している。

また、GTP の非加水分解アナログである GMP-PNP 存在下で GTP ロックされた Sar1 を用いて cargo クラスタを形成させると Sec16 は主にクラスタから排除されることが判明した (Fig. 30 及び 31)。どのようにして Sar1 の GTP 加水分解サイクルが Sec16 の取り込みに寄与するのか、そしてなぜ Sar1 の GTP 加水分解サイクルが働かない条件では COPII コートから Sec16 が排除されるのかということ的直接明らかにすることはできなかった。この原因として、膜に結合した GTP 型 Sar1 が Sec16 の COPII コートへの取り込みにおいては立体障害を引き起こしているという可能性が考えられる。また、Sar1 の GTP 加水分解

サイクルが働かない条件では Sec16 が COPII コート形成に関与出来ず、その結果 cargo クラスタ内への能動的な取り込みが行われなかったのではないかとすることも考えられる。試験管内再構成系において Sec16 による COPII 小胞形成効率の促進は Sar1 の GTP 加水分解サイクルに依存しているという報告もなされており (Supek et al., 2002)、本研究の結果はこの報告と一致するものである。加えて、Sar1 の GTP 加水分解サイクルと Sec16 の機能の間には更なる制御機構が存在するのではないかとということが本研究により強く示唆される (Fig. 35)。

Pichia pastoris における研究では Sec16 が COPII 小胞形成領域の末端で働くことが報告されており (Bharucha et al., 2013)、超解像度蛍光顕微鏡を用いた *Drosophila* に関する研究では Sec16 が COPII コートに覆われた膜上領域を取り囲むように局在していることがごく最近報告された (Liu et al., 2017)。しかしながら、*S. cerevisiae* において Sec16 が COPII コートに被覆された領域の辺縁部を取り囲むように局在するという報告はなされていない。Sec16 は *Drosophila* や哺乳類の細胞では小胞体膜上で凹状カップ型構造をとる領域に局在することが報告されている (Budnik and Stephens, 2009; Hughes et al., 2009; Ivan et al., 2008)。しかし、Sec16 が湾曲した膜構造を作り出す役割を担うのかどうかということや、膜の曲率それ自体に選択的に Sec16 をリクルートする役割があるのかどうかということについては未だ明らかになっていない。本研究に用いた人工脂質平面膜は小胞の縊り切りを防ぐために膜の湾曲を強く阻害するため、ERES を形成するために必要な膜の変形が制限されている。このため、cargo クラスタ

内に Sec16 が存在するという観察結果は、ERES における Sec16 の生理的機能を反映したものではない可能性がある。しかしながら、平面上に形成される COPII コートの格子は Sec16 をその中に収容することが可能であることが判明した。このことは、COPII 小胞形成過程においても Sec16 が COPII の格子の中に取り込まれる可能性があることを考慮する必要があることを強く意味している。

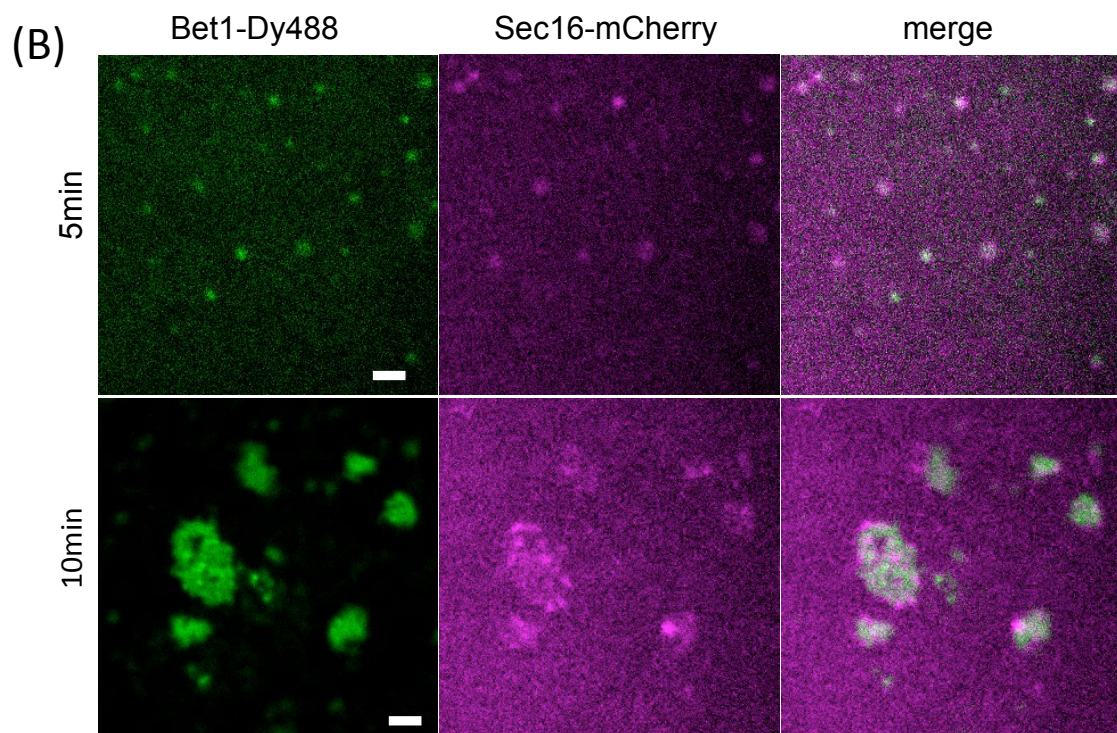
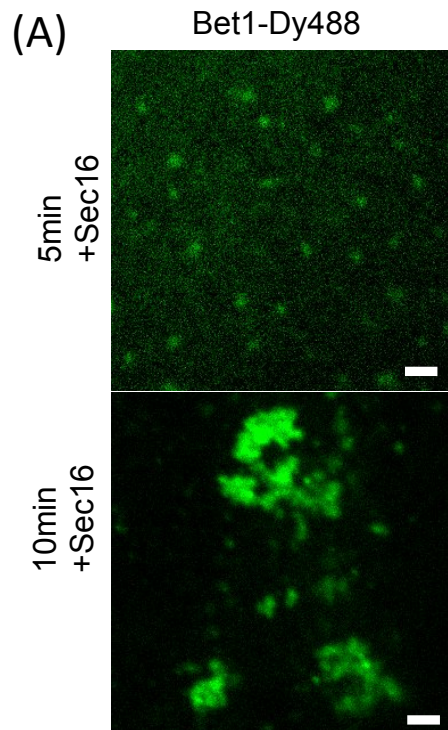


Figure 34. Sec16 及び Sec16-mCherry 存在下における cargo クラスターの形成

(A) GTP 存在下で Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に、Sec16 (68.4 ng) 及び COPII 小胞形成因子 (100 ng Sar1, 345 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を添加し、cargo クラスターを形成させた時の 5min と 10min の経時的な蛍光イメージを示した。

(B) GTP 存在下で Bet1-Dy488 及び Sec12 Δ lum を再構成した人工脂質平面膜に、and Sec16-mCherry (62.4 ng) 及び COPII 小胞形成因子 (100 ng Sar1, 345 ng Sec23/24, and 1.3 μ g Sec13/31) を添加し、cargo クラスターを形成させた時の 5min と 10min の経時的な蛍光イメージを示した。

(A)、(B)いずれの蛍光イメージも共焦点蛍光顕微鏡を用いて可視化したものである。スケールバーは 2 μ m

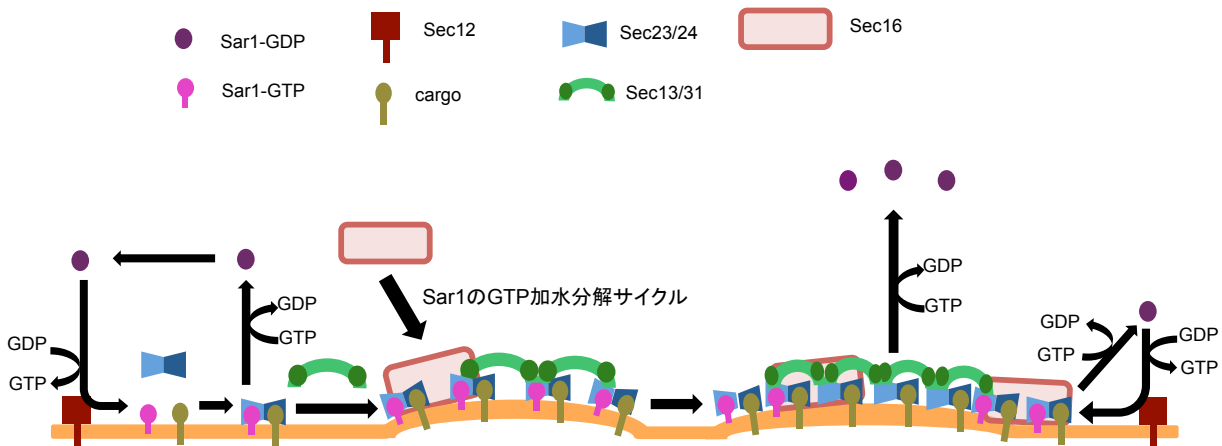


Figure 35. COPII コート形成時の COPII 小胞形成因子の動態モデル

COPII コートの形成は GEF である Sec12 により Sar1 が GTP 型となることで開始される。活性化され膜に結合した GTP 型 Sar1 と輸送シグナルを細胞質側に提示した cargo と Sec23/24 が結合することで出芽前駆複合体を形成する。この出芽前駆複合体同士を Sec13/31 が架橋することで COPII コートが形成され、これが連続的に続くことで cargo クラスターとなる。この過程で Sec16 は cargo クラスターに取り込まれる。実際に形成される COPII 小胞に Sec16 が取り込まれるかどうかは未だ明らかになっていないが、少なくとも平面膜上に形成される COPII コートの格子の中には Sec16 を収納し留めておける立体的余地がある。加えて Sar1 は cargo クラスター辺縁部すなわち COPII コート伸長部にのみ局在し機能しており、COPII コートの伸長と共にコート形成起点からは順次脱離していると考えられる。

第 5 章 参考文献

Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature cell biology* *3*, 531-537.

Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nature cell biology* *1*, 330-334.

Bannykh, S.I., Rowe, T., and Balch, W.E. (1996). The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of cell biology* *135*, 19-35.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* *77*, 895-907.

Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* *365*, 347-349.

Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* *193*, 383-410.

Belden, W.J., and Barlowe, C. (2001). Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science (New York,*

N.Y.) *294*, 1528-1531.

Bharucha, N., Liu, Y., Papanikou, E., McMahon, C., Esaki, M., Jeffrey, P.D., Hughson, F.M., and Glick, B.S. (2013). Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Mol Biol Cell* *24*, 3406-3419.

Bhattacharyya, D., and Glick, B.S. (2007). Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell* *18*, 839-849.

Bi, X., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* *419*, 271-277.

Bi, X., Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Developmental cell* *13*, 635-645.

Brady, J.P., Claridge, J.K., Smith, P.G., and Schnell, J.R. (2015). A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, E639-648.

Budnik, A., and Stephens, D.J. (2009). ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett* *583*, 3796-3803.

Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., and Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *10*, 186-200.

Connerly, P.L., Esaki, M., Montegna, E.A., Strongin, D.E., Levi, S., Soderholm, J., and Glick, B.S. (2005). Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Curr Biol* *15*, 1439-1447.

D'Arcangelo, J.G., Stahmer, K.R., and Miller, E.A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta* *1833*, 2464-2472.

Espenshade, P., Gimeno, R.E., Holzmacher, E., Teung, P., and Kaiser, C.A. (1995). Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *The Journal of cell biology* *131*, 311-324.

Fath, S., Mancias, J.D., Bi, X., and Goldberg, J. (2007). Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* *129*, 1325-1336.

Fromme, J.C., Ravazzola, M., Hamamoto, S., Al-Balwi, M., Eyaid, W., Boyadjiev, S.A., Cosson, P., Schekman, R., and Orci, L. (2007). The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Developmental cell* *13*, 623-634.

Gee, H.Y., Noh, S.H., Tang, B.L., Kim, K.H., and Lee, M.G. (2011). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional

secretion pathway. *Cell* 146, 746-760.

Gimeno, R.E., Espenshade, P., and Kaiser, C.A. (1996). COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol Biol Cell* 7, 1815-1823.

Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M.M., Rapoport, T.A., and Prinz, W.A. (2008). Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* (New York, N.Y.) 319, 1247-1250.

Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., and Blackstone, C. (2009). A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* 138, 549-561.

Huang, M., Weissman, J.T., Beraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I.A., and Balch, W.E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH₂ terminus in ER export. *The Journal of cell biology* 155, 937-948.

Hughes, H., Budnik, A., Schmidt, K., Palmer, K.J., Mantell, J., Noakes, C., Johnson, A., Carter, D.A., Verkade, P., Watson, P., *et al.* (2009).

Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J Cell Sci* 122, 2924-2934.

Ivan, V., de Voer, G., Xanthakis, D., Spoorendonk, K.M., Kondylis, V., and

Rabouille, C. (2008). *Drosophila* Sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif. *Mol Biol Cell* *19*, 4352-4365.

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

Jones, B., Jones, E.L., Bonney, S.A., Patel, H.N., Mensenkamp, A.R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., *et al.* (2003). Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nature genetics* *34*, 29-31.

Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* *61*, 723-733.

Kung, L.F., Pagant, S., Futai, E., D'Arcangelo, J.G., Buchanan, R., Dittmar, J.C., Reid, R.J., Rothstein, R., Hamamoto, S., Snapp, E.L., *et al.* (2012). Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *The EMBO journal* *31*, 1014-1027.

Kurokawa, K., Okamoto, M., and Nakano, A. (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat Commun* *5*, 3653.

Kurokawa, K., Suda, Y., and Nakano, A. (2016). Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes in vivo. *J Cell Sci* *129*, 3231-3237.

Liu, M., Feng, Z., Ke, H., Liu, Y., Sun, T., Dai, J., Cui, W., and Pastor-Pareja, J.C. (2017). Tango1 spatially organizes ER exit sites to control ER export. *The Journal of cell biology* *216*, 1035-1049.

Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P., and Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* *473*, 181-186.

Malhotra, V. (2013). Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *The EMBO journal* *32*, 1660-1664.

Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* *93*, 263-275.

Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO journal* *21*, 6105-6113.

Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport

vesicles. *Cell* 114, 497-509.

Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483-495.

Nakano, A., and Muramatsu, M. (1989). A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology* 109, 2677-2691.

Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.

Oka, T., Nishikawa, S., and Nakano, A. (1991). Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. *The Journal of cell biology* 114, 671-679.

Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R., and Nakano, A. (2012). High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 125, 3412-3420.

Orci, L., Ravazzola, M., Meda, P., Holcomb, C., Moore, H.P., Hicke, L., and Schekman, R. (1991). Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8611-8615.

Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Toso, J., Moss, T.J., Faust, J.E., Micaroni, M., Egorova, A., Martinuzzi, A., McNew, J.A., *et al.* (2009). Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* *460*, 978-983.

Peng, R., De Antoni, A., and Gallwitz, D. (2000). Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *The Journal of biological chemistry* *275*, 11521-11528.

Pietrosemoli, N., Pancsa, R., and Tompa, P. (2013). Structural disorder provides increased adaptability for vesicle trafficking pathways. *PLoS Comput Biol* *9*, e1003144.

Powers, R.E., Wang, S., Liu, T.Y., and Rapoport, T.A. (2017). Reconstitution of the tubular endoplasmic reticulum network with purified components. *Nature* *543*, 257-260.

Saito, Y., Kimura, K., Oka, T., and Nakano, A. (1998). Activities of mutant Sar1 proteins in guanine nucleotide binding, GTP hydrolysis, and cell-free transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Biochem* *124*, 816-823.

Sato, K., and Nakano, A. (2004). Reconstitution of coat protein complex II (COPII) vesicle formation from cargo-reconstituted proteoliposomes reveals the potential role of GTP hydrolysis by Sar1p in protein sorting. *The*

Journal of biological chemistry *279*, 1330-1335.

Sato, K., and Nakano, A. (2005a). Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 167-174.

Sato, K., and Nakano, A. (2005b). Reconstitution of cargo-dependent COPII coat assembly on proteoliposomes. *Methods Enzymol* *404*, 83-94.

Shaywitz, D.A., Espenshade, P.J., Gimeno, R.E., and Kaiser, C.A. (1997). COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *The Journal of biological chemistry* *272*, 25413-25416.

Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., and Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* *151*, 973-984.

Shindiapina, P., and Barlowe, C. (2010). Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *21*, 1530-1545.

Stagg, S.M., LaPointe, P., Razvi, A., Gurkan, C., Potter, C.S., Carragher, B., and Balch, W.E. (2008). Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* *134*, 474-484.

Supek, F., Madden, D.T., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2002).

Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *The Journal of cell biology* *158*, 1029-1038.

Tabata, K.V., Sato, K., Ide, T., Nishizaka, T., Nakano, A., and Noji, H. (2009). Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *The EMBO journal* *28*, 3279-3289.

Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* *124*, 573-586.

Watson, P., Townley, A.K., Koka, P., Palmer, K.J., and Stephens, D.J. (2006). Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *7*, 1678-1687.

Whittle, J.R., and Schwartz, T.U. (2010). Structure of the Sec13-Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *The Journal of cell biology* *190*, 347-361.

Yorimitsu, T., and Sato, K. (2012). Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell* *23*, 2930-2942.

Yoshihisa, T., Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic

reticulum. *Science* (New York, N.Y.) *259*, 1466-1468.

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて下さるとともに、指導教員としてご指導ご鞭撻賜りました東京大学総合文化研究科広域科学専攻佐藤健教授に深く感謝の意を表します。また東京大学総合文化研究科広域科学専攻依光朋宏助教には、日頃の実験やセミナーでのディスカッション等様々な面でご助言・ご指導頂きました。ここに深く感謝の意を表します。そして、多くの助言とご協力を頂きました佐藤健研究室の皆様に深く御礼申し上げます。最後に研究生活を送る上で常に支えて頂いた両親に心から感謝いたします。

本論文に記した研究は *Journal of Cell Science* にて出版されている。

Hirohiko Iwasaki, Tomohiro Yorimitsu and Ken Sato. Microscopy analysis of reconstituted COPII coat polymerization and Sec16 dynamics. *Journal of Cell Science*. 2017; Vol. 130: No. 17, pp. 2893-2902.