

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 岩崎 寛彦

[背景]

小胞体で新たに合成されたタンパク質はゴルジ体へと運ばれ、その後目的のオルガネラへと輸送される。小胞体からゴルジ体へのタンパク質の輸送では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小胞が重要な役割を担っている。COPII小胞の形成は低分子量GTPaseであるSar1がguanine nucleotide exchange factor (GEF) であるSec12によりGDP型からGTP型へと変換されることで開始される。GTP型となったSar1は両親媒性ヘリックスを分子外に露出させ、これを介して小胞体膜に結合する。そこにCOPIIコートのインナーコートであるSec23/24複合体がSec23を介してGTP型Sar1と結合する。この時Sec24は膜上の積荷タンパク質 (cargo) と結合する。Sec23はSar1のGTPase activating protein (GAP)として働き、Sar1のGTPase活性を促進する。このためSec23と結合したSar1は速やかに自身のGTPを加水分解し膜上から脱離する。Sar1が脱離したSec23/24複合体は膜上から解離するが、Sec23/24複合体がcargoと結合している場合はSec23/24複合体が一時的に膜上に保持される。ここにSec12

によりGTP型Sar1が速やかに供給されることで、再びGTP型Sar1とSec23/24-cargo複合体が結合し、これを繰り返すことでSar1-Sec23/24-cargoからなる複合体が安定に膜上に保持される。このSar1のGTP加水分解サイクルによりcargoが結合した複合体同士のみが選択的に膜上に保持され、これらをCOPIIコートのアウターコートであるSec13/31複合体が架橋することにより、cargoが濃縮されたCOPII小胞が形成されると考えられている。しかしながらCOPII小胞は60~80 nm程度であり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、小胞形成過程における各因子の動態を直接解析することは困難であり、各因子が小胞体膜上に集合し小胞を形成する際の時空間的動態は未だ明らかにされていない。加えて、COPII小胞は小胞体出口部位 (ER exit sites ; ERES) と呼ばれるCOPIIコートが特異的に集合してできる特定のドメインで形成される。このERESの形成に必須の因子としてSec16が同定されている。Sec16はSar1のGTPase活性を制御し様々なCOPII小胞形成因子と相互作用することで、ERESにCOPIIコートを集合させるオーガナイザーとして働いていると考えられている。しかしながらCOPII小胞形成因子とSec16がどのような時空間的動態を経て小胞体膜上にCOPIIコートを集合させるのかということとは未だ解明されていない。

[研究目的と手法]

蛍光標識したcargoとSec12を全反射蛍光顕微鏡下で形成した人工脂質平面膜に再構成し、そこにSar1・Sec23/24・Sec13/31を加え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ができる。人工脂質平面膜には小胞が膜から縊り切られることを防ぐ仕組みが施してあるため、GTP存在下ではcargoが濃縮された遊離直前のCOPII小胞 (COPII bud) を観察することが可能である。加えてより長時間インキュベーションした場合、COPII budが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。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ため、COPIIコート形成過程での各因子の空間的動態を解析するのに非常に適している。そこで本研究では、この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。

[結果及び考察]

まず、COPII小胞形成開始のトリガーでありCOPIIコートを膜上に繫留するために必須の因子と考えられているSar1を蛍光標識することで可視化し、その動態を解析した。GTPの非加水分解アナログであるGMP-PNP存在下では、Sar1がcargoクラスター全域に局在していた。一方でGTP存在下ではSar1はcargoクラスターの辺縁部すなわちCOPIIコート伸張領域に局在し、クラスター内部にはほとんど局在していなかった。これはクラスターにおけるCOPIIコートの伸張と並行してGTPの加水分解に伴うSar1の脱離が生じていることを意味しており、COPII小胞の形成においてもCOPIIコートの伸張に伴いSar1が小胞形成起点から順次脱離するのではないかということを示唆している。

Sar1が膜上から脱離するとCOPIIコートは膜から解離すると考えられていることから、cargoクラスター上でもSar1の脱離に伴いCOPIIコートが解離するのかどうかを蛍光標識したSec13/31の動態を解析することで検証した。その結果Sar1が膜上から脱離するような状況であってもSec13/31はcargoクラスター全域に局在していた。このことはSec13/31が自身の形成するCOPIIコートの格子の中にアSEMBルされるとCOPIIコートを膜上に繫留するためにSar1はもはや必要無いことを意味している。つまり、COPII小胞形成過程及び小胞の遊離後もSar1の脱離に関わらずSec13/31は膜上に繫留されるのではないかということを示唆している。このためCOPII小胞がゴルジ体と膜融合するために必要なCOPIIコートの脱コートはSar1のGTP加水分解とは別のメカニズムにより制御されているのではないかと考えられる。

Sar1が膜上にリクルートされるにはGEFであるSec12との相互作用を必要とする。このためSec12もSar1と同様にクラスター辺縁部に集中して局在するのかどうかを検証した。Sec12に蛍光タンパク質を融合させSec12の動態を可視化したところ、Sec12はSar1のGTP加水分解の有無に関わらずcargoクラスター領域から排除され、cargoクラスター外に均一に局在していた。また、cargoクラスターからSar1のGTP加水分解サイクル依存的に排除されるcargoではない膜タンパク質(Ufe1)が存在することが報告されている。そこで、Ufe1とSec12の間でクラスターから排除される効率を直接比較したところGMP-PNP存在下ではSec12のほうが効率的に排除されていることが判明した。これらの結果はSar1のGTP加水分解サイクル非依存的にSec12をcargoクラスターから排除するメカニズムがCOPII小胞形成機構に備わっていることを示唆している。

最後にcargoクラスター形成過程におけるSec16の動態を蛍光タンパク質を融合させることで可視化した。その結果、GTP存在下でcargoクラスターを形成させたところSec16はcargoクラスター内に取り込まれていたが、GMP-PNP存在下では逆にSec16がcargoクラスターから排除されていた。さらにGTP存在下で最小構成因子によりcargoクラスターを形成させた後、Sec16を膜上加えたところSec16はcargoクラスター内には取り込まれずSar1と同様にcargoクラスター辺縁部に局在していた。これらの結果は、Sec16がCOPIIコート形成が完了し膜上に繫留されたCOPIIコート因子と非特異的に相互作用することでcargoクラスターに取り込まれるのではなく、COPIIコート伸長領域でのSar1のGTP加水分解サイクルに依存してCOPIIコートが形成する格子の中に取り込まれることを示唆している。

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、水平方向にCOPIIコートが伸長していく過程でのCOPII小胞形成因子及びSec16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コート形成過程でのCOPII小胞形成因子の動態モデルを構築した(Fig. 1)。加えて本研究により得られた知見はCOPII小胞やERESの形成を考える際にも重要な示唆を与えるものである。

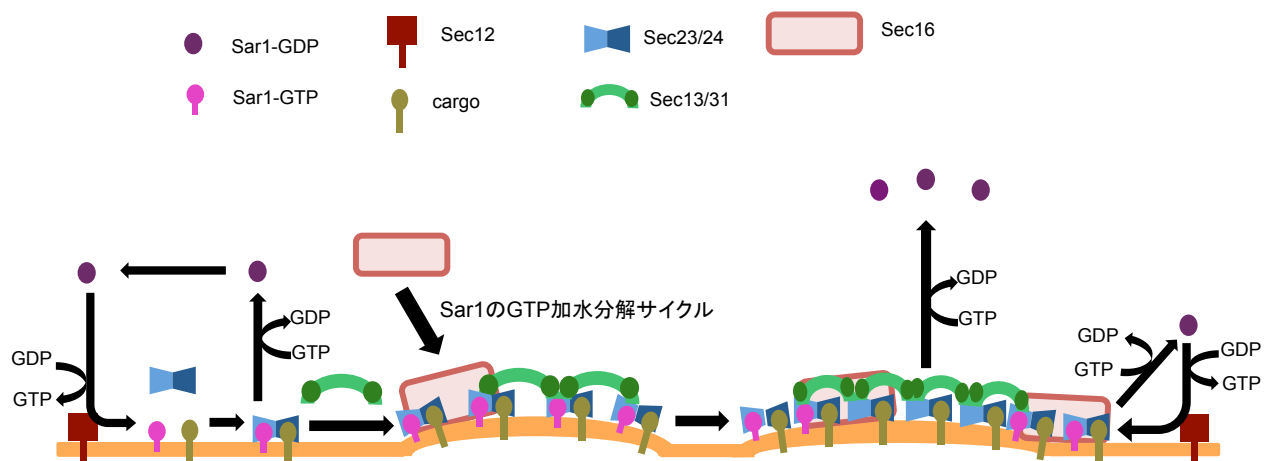


Figure 1. COPIIコート形成時の COPII小胞形成因子の動態モデル