

# 出芽酵母の小胞体における分泌制御メカニズムの解明

佐藤 健

(東京大学 大学院総合文化研究科)

## 研究の目的

真核細胞の小胞輸送による分泌反応は、細胞内輸送の代表的なものであるが、この反応の分子メカニズムについては依然として不明な点が多い。特にすべての分泌タンパク質の合成が行われる小胞体（ER）は、小胞輸送の出発点となる細胞小器官であり、分泌タンパク質を選別して分泌輸送経路へと導くための制御メカニズムについて、さらにいっそうの理解が必要とされている。小胞体からの輸送を担う輸送小胞は COPII コートと呼ばれるコートタンパク質によって覆われていることから COPII 小胞と称され、小胞体膜上で COPII コートが低分子量 GTPase である Sar1 によって制御されながら集合することによって形成される<sup>1)</sup>(図 1)。この COPII 小胞の形成は、小胞体出口部位と呼ばれる小胞体膜上の特定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動態が小胞体からの小胞輸送を時空間的に制御していると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、小胞体出口部位の構築メカニズムや時空間制御機構についての知見は驚くほど少ない。本研究では、出芽酵母の小胞体における小胞体出口部位の構築メカニズム、およびこのコンパートメントが受ける高度な時空間制御について解析を行った。

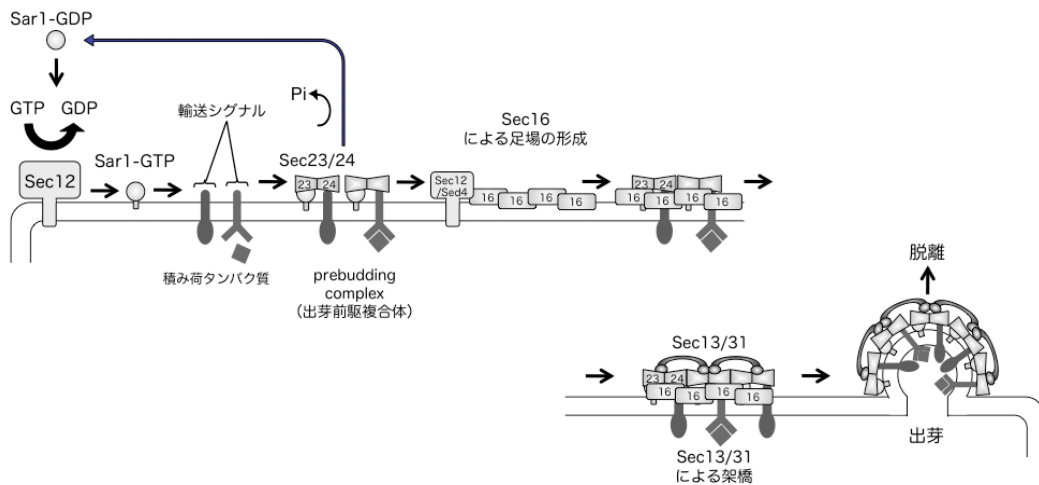


図 1 小胞体（ER）からの COPII 小胞形成

## 方法

小胞体出口部位の形成に関与することが遺伝学的に示唆されている Sec16 について、活性に必要な機能ドメインの同定を行うため、種々の Sec16 断片を発現させた酵母細胞を用いて活性評価を行った。また、Sec16 の小胞体膜への結合に必要な機能ドメイン、および小胞体出口部位形成に必要な機能ドメインの同定を行うため、蛍光タンパク質を融合させた種々の Sec16 断片を発現させて共焦点顕微鏡による局在解析を行った。また、COPII サブユニット Sec23 の新規ホモログ Nel1 について、Sec23 の機能と比較しながら精製 Nel1 を用いた生化学

的解析、および共焦点顕微鏡による細胞内局在の解析を行った。さらに、一つの出芽酵母細胞あたり 50~100 個程度形成される小胞体出口部位について、これらの小胞体出口部位ごとに運び出される積み荷タンパク質の種類が均一であるかどうかを調べるため、COPII コート中の積み荷タンパク質を認識して結合する Sec24 サブユニット、および Sec24 とは異なる積み荷タンパク質を結合する Lst1 サブユニットを蛍光標識し、小胞体出口部位ごとに含まれるこれら Sec24/Lst1 の構成比を蛍光強度を指標として解析した。

## 結果

### 1) Sec16 の機能ドメインの同定

Sec16 の中央部に位置する 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、またこのドメインと協同して Sec16 の C 末端領域が小胞体膜上の低分子量 GTPase Sar1 を介して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。さらに、Sec16 の N 末端領域は、小胞体膜上における COPII コートのアセンブリーとそれに伴うコンパートメント化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### 2) Sec23 の新規ホモログ Nel1 の機能解析

*sec23* 温度感受性変異株に Nel1 を過剰発現させたところ、制限温度下において Nel1 は Sec23 の機能を相補することができず、また、Sec23 と複合体を形成する Sec24 あるいはそのアイソフォームと Nel1 の結合は見られなかったことから、Nel1 は細胞内において Sec23 とは異なる機能を持つ因子であることが示唆された。精製 Nel1 を用いた生化学実験から、Nel1 は Sar1 に対して強い GAP 活性を示すものの、Sar1-Nel1 複合体に COPII コートのサブユニットである Sec13/31 が結合しないことから、Nel1 は Sar1 の GAP として機能するものの、COPII コートのサブユニットとしては機能していないことが示された。また、Nel1 を単独で欠損させても細胞の生育に影響はないものの、温度感受性となる *sar1D32G* 変異と組み合わせると、細胞の生育が遅くなることから (図 2)、Nel1 は細胞内において Sar1 と機能的に相互作用していることが示された<sup>3)</sup>。

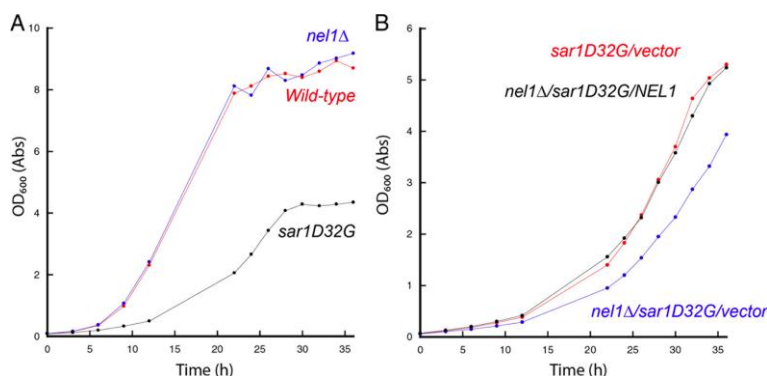


図 2 NEL1 と SARI との遺伝学的相互作用

A, 野生株、NEL1 欠損株、および *sar1D32G* 株の 23°C における生育表現型

B, *sar1D32G* 株および *sar1D32G*/NEL1 二重変異株の 23°C における生育表現型

### 3) 小胞体出口部位の多様性についての解析

Sec24 とそのアイソフォームである Lst1 にそれぞれ GFP と mCherry を融合させたものを酵母細胞内で同時に発現させ、小胞体出口部位ごとに含まれる Sec24-GFP と Lst1-mCherry の構

成比を蛍光強度を指標として解析した。20～30細胞についてデータを収集し、統計学的な解析を行ったところ、定常状態において小胞体出口部位ごとに含まれる Sec24 と Lst1 の比は有意に偏りがあることが明らかとなった。この結果は、小胞体出口部位ごとに運び出している積み荷タンパク質の種類に偏りがあることを示している。

## 結論

これまで COPII 小胞形成のための単なる足場として考えられていた Sec16 は、COPII コートの機能的なアセンブリーにも深く関わっていることが明らかとなった。また、Sec23 の新規ホモログである Nel1 は、COPII コートのサブユニット以外で Sar1 と機能的に相互作用する初めての因子であることを発見し、小胞体からの COPII 小胞形成に関わる因子の機能が多岐にわたる可能性を示唆する重要な知見が得られた。さらに、出芽酵母細胞で 50～100 個程度観察される小胞体出口部位は、定常状態において小胞体出口部位ごとに運び出す積み荷タンパク質の種類に偏りがあり、何らかの役割分担が存在していることが明らかとなった。

## 文献

- 1) Sato, K. and Nakano, A. (2007) Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett.* **581**: 2076-2082.
- 2) Yorimitsu, T., and Sato, K. (2012) Insight into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol. Biol. Cell* **23**: 2930-2942.
- 3) Kodera, C., Yorimitsu, T., and Sato, K. (2014) Sec23 homolog Nel1 is a novel GTPase-activating protein for Sar1 but does not function as a subunit of the COPII coat. *J. Biol. Chem.* **289**: 21423-21432.