

## 研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成

2 研究者氏名: 佐藤 健

3 研究のねらい:

真核生物の細胞内には、小胞体、ゴルジ体、リソソーム等のオルガネラ(細胞内小器官)が発達し、それぞれのオルガネラが独自の機能を担っている。これらのオルガネラ間では直径50-100nmの「輸送小胞」を介した小胞輸送と呼ばれるシステムにより、盛んに物質や情報のやりとりが行われている。特に代表的なオルガネラの一つである小胞体では、各オルガネラで機能するタンパク質や脂質、あるいは細胞外に分泌されるタンパク質の合成が行われ、必要な翻訳後修飾や高次構造の形成が完了したもののみが選択的に輸送小胞に取り込まれて目的の場所へと運ばれていく。本研究では、小胞体からの輸送小胞形成に関わる精製因子と再構成人工膜小胞を用いて、精製因子のみにより輸送小胞の形成と、輸送小胞へのタンパク質の選択的取り込みを再現する完全再構成系を構築し、輸送小胞形成とタンパク質選別輸送の分子機構について詳細に解析を行った。

4 研究成果:

(1) 精製因子のみによる輸送小胞形成反応の完全再構成系の開発

小胞体から形成される輸送小胞は、COPII コートと呼ばれるタンパク質複合体によって覆われていることから COPII 小胞と呼ばれる。COPII コートは、小胞体膜上の輸送されるタンパク質が持つ輸送シグナルと特異的に結合し、この複合体が膜上で集合することにより、目的のタンパク質を選択的に取り込んだ COPII 小胞が形成されると考えられている。COPII コートと輸送されるタンパク質が結合するには、低分子量 GTPase である Sar1p が必要であり、Sar1p の GTPase 活性により輸送されるタンパク質の輸送小胞への取り込みが厳密に制御されていると考えられている。本研究では、出芽酵母を材料として、小胞体から輸送されるタンパク質を再構成したプロテオリポソームを作成し、ここに COPII コートと低分子量 GTPase Sar1p を加えて、輸送されるタンパク質を選択的に取り込んだ COPII 小胞の形成過程を、精製因子のみで再現する完全再構成系の開発を行った(図1)(J. Biol. Chem. に掲載)。

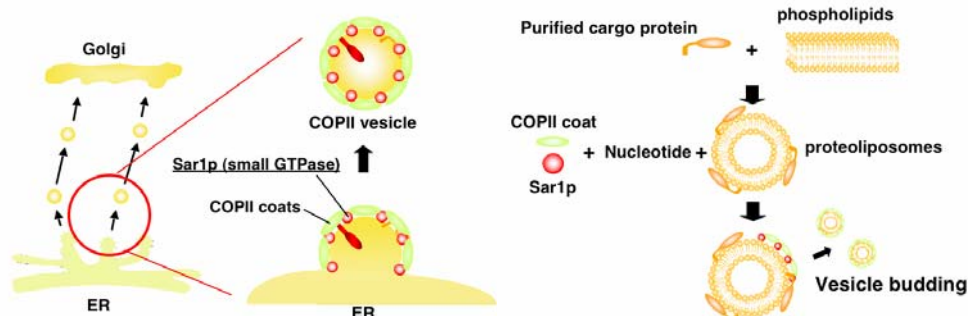


図1 小胞体からの輸送小胞形成(左)と精製因子による完全再構成系の構築(右)

(2) 低分子量 GTPase Sar1p によるタンパク質選別機構の発見

小胞体で機能する低分子量 GTPase Sar1p に限らず、細胞内すべての小胞輸送経路において、輸送小胞の形成は低分子量 GTPase によって制御されていると考えられているものの、その制御機構は長い間謎であった。その理由の一つとして、これまでの細胞から分画したオルガネラを用いた in vitro 実験系では、さまざまな種類の GTPase が混在しているため、輸送小胞形成過程で機能する GTPase 機能のみを切り離して解析することが非常に困難であったことが挙げられる。本研

究で開発した、小胞体からの COPII 小胞形成を必要最小限の精製因子で再現する完全再構成系を用いることにより、COPII 小胞形成反応で中心的な役割を担っている Sar1p の GTP 加水分解の様子を直接測定することが可能となった。さらに、COPII コートに YFP、プロテオリポソーム上の輸送されるタンパク質に CFP を融合させ、COPII 小胞形成過程における COPII コートと輸送されるタンパク質との分子間相互作用を CFP-YFP 間の FRET を指標としてリアルタイムで追跡することのできる実験系を開発した(図2)。これらのオリジナルな実験系を用いて詳細に解析を行った結果、Sar1p は GTP 加水分解のエネルギーを利用して、輸送小胞に取り込むタンパク質の選別を行っているという現象を見いだすことができた(Nat. Struct.& Mol. Biol. に掲載)。

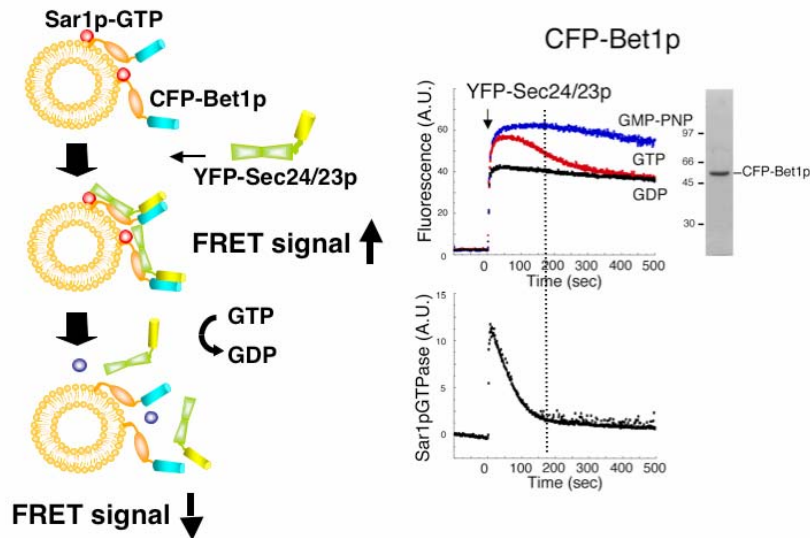


図2 FRET を利用した COPII コートのアセンブリーをリアルタイムで検出する実験系

### (3) 輸送小胞形成過程の可視化

これまで、輸送小胞が形成される様子は、電子顕微鏡による固定されたスナップショットという静止した情報しか得られないという限界があった。輸送されるタンパク質が輸送小胞に取り込まれる過程をリアルタイムで可視化することができれば、輸送小胞形成の分子レベルでの作用機序について詳細に解析を行うことができる。そこで、COPII 小胞形成の完全再構成系を人工脂質平面膜上に再現し、1分子観察用の全反射顕微鏡下で COPII 小胞形成過程における輸送されるタンパク質の動態を1分子レベルで可視化することを試みている(図3)。これまでに、平面膜上の蛍光標識された輸送されるタンパク質の二次元拡散が Sar1p の添加によって変化する様子を1分子レベルで計測できるまでに至っている。

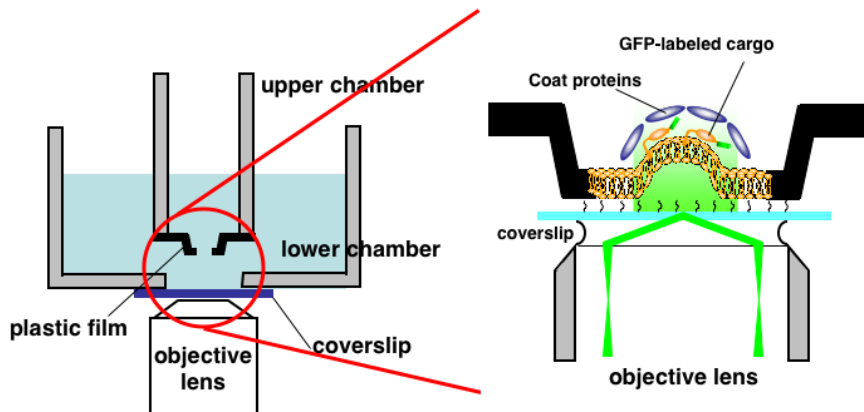


図3 COPII 小胞形成過程の可視化

## 5 自己評価:

生体膜とタンパク質複合体により機能発現している現象の分子レベルでの解析において、これまで最も大きな成果を残してきた手法の一つにプロテオリポソームへの再構成技術の活用が挙げられる。本研究では、この技術を小胞輸送に応用し、他のグループにさきがけて精製因子のみによる輸送小胞形成の完全再構成系の開発に成功した。この独自の実験系を用いることにより、従来の実験系では解析が困難であった輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase の役割を解明することができた。この結果は、本研究において開発した完全再構成系以外の手段ではまず解りそうもないことであり、大きなブレークスルーを達成したといえる。今後、この実験系を用いて他のグループに先行して解析を進めていくことは大きなメリットとなる。

また、完全再構成系を発展させて、顕微鏡下で人工脂質平面膜上に再現した輸送小胞形成反応の1分子計測を行うという試みでは、平面膜上に再構成した輸送されるタンパク質の動態が、輸送小胞形成因子の添加によって変化する様子が捉えられるまでに至っている。このように、完全再構成系と平面膜法を組み合わせる方法が、これまで行われてきた単一で機能する生体分子の1分子計測とは異なり、複数の因子がダイナミックな解離会合を行うことで始めて発現する小胞輸送のような現象の解析に非常に強力な手法となりえることを示した。今後、輸送小胞形成過程を完全に平面膜上に再現し、この現象に関わる因子を1分子単位で計測することにより、輸送小胞形成とタンパク質選別輸送のメカニズムの解明を目指していきたい。

## 6 研究総括の見解:

成功するには相当の技術レベルを必要とする難度の高い研究課題であったが、輸送小胞形成の完全再構成に関する独自の実験系を創出し、輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase Sar1p の役割を見事に解明した。本人の研究課題に対する問題意識が極めて明確で、かつ保有する技術レベルが極めて高いことが成功の要因と評価している。成果の背景には膨大なトライアル量があったと推測するが、本研究は全て本人が一人で地道にやり遂げたものであり、個人型研究さきがけの典型例であったことも付言したい。

## 7 主な論文等:

### 論文

#### 1. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles”

*Mol. Biol. Cell*, **14**, 3055–3063, (2003)

#### 2. Ken Sato and Akihiko Nakano

“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”

*J. Biol. Chem.* **279**, 1330–1335, (2004)

#### 3. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Kinetic dissection of COPII subunits assembly and disassembly on SNAREs during Sar1p GTP hydrolysis”

*Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 167–174, (2005)

\* 同誌同号の News and Views に掲載される (Vol. 12, p106–107 (2005))

#### 4. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Reconstitution of cargo-dependent COPII coat assembly on proteoliposomes”

*Methods Enzymol.* **404**, 83–94, (2006)

5. Tadashi Satoh, Ken Sato, Akira Kanoh, Katsuko Yamashita, Yusuke Yamada, Noriyuki Igarashi, Ryuichi Kato, Akihiko Nakano, and Soichi Wakatsuki  
“Structures of carbohydrate recognition domain of Ca<sup>2+</sup>-independent cargo receptors Emp46p and Emp47p”  
*J. Biol. Chem.* (2006) in press

#### 出版物

1. Ken Sato

“COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum”

*J. Biochem. (Minireview)* **136**, 755–760, (2004)

2. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体におけるタンパク質の選別輸送」実験医学 Vol. 21, No. 7, 886–891. (2003)

3. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体-ゴルジ体間輸送の制御」生化学 第 75 巻 第 6 号, 472–478. (2003)

4. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体における輸送小胞形成とタンパク質選別の分子機構」実験医学(増刊) Vol. 21, No. 14, 122–128. (2003)

#### 招待講演

1. 佐藤 健

シンポジウム「蛋白質の一生:ゆりかごから墓場まで」

「小胞体における輸送小胞形成機構～FRETを用いた解析～」

日本生物物理学会第 42 回年会 (京都) 2004 年 12 月

2. Ken Sato

シンポジウム”Membrane Dynamics and Cell Regulation”

“Dynamics of COPII subunits during GTP hydrolysis”

第 5 回日本蛋白質科学会年会サテライトシンポジウム (福岡) 2005 年 6 月

3. 佐藤 健、中野明彦

ワークショップ「蛋白質の一生を観て、操作して、知る」

「完全再構成系による輸送小胞形成のダイナミズム解析と高速高感度 3D 共焦点イメージングによる小胞輸送の可視化」

第 5 回日本蛋白質科学会年会 (福岡) 2005 年 7 月

4. Ken Sato

ミニシンポジウム「メンブレン・トラフィック研究の新しい流れ」

“Molecular mechanisms and dynamics of COPII vesicle formation”

第 78 回日本生化学会大会 (神戸) 2005 年 10 月