

称号及び氏名	博士（獣医学）	中川 博史
学位授与の日付	平成24年8月31日	
論文名	COPII 小胞による粗面小胞体-Golgi 装置間輸送の制御に関する研究	
論文審査委員	主査	松尾 三郎
	副査	中村 洋一
	副査	三宅 眞実

## 論文要旨

### 緒言

粗面小胞体（**rER: rough-surfaced endoplasmic reticulum**）において新規合成されたタンパクは、**COPII** 輸送小胞によって **Golgi** 装置へと輸送される。この **COPII** 小胞輸送は細胞の生存に必須であり、輸送の破綻は **ER** ストレスを導き細胞障害を起こす。**rER** での **COPII** 輸送小胞の形成は、先ず細胞質に存在する **secretion-associated and Ras-related protein 1 (Sar1)** が **GTP** 結合型となり、**rER** 膜へ移動することにより始まる。**rER** 膜に結合した **Sar1** は細胞質より **Sec23/24** 複合体、次いで **Sec13/31** 複合体を **rER** 膜へ移動させ、コートを形成し小胞出芽を導く。従って **Sar1** の **rER** 膜への移動の調節が **COPII** 輸送小胞の形成ひいては **rER-Golgi** 間小胞輸送の調節に働くと考えられる。

セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤である **H89** が **Sar1** の **rER** 膜への移動を阻害することから **rER-Golgi** 間の小胞輸送への **H89** 感受性キナーゼの関与が示唆されている。しかし、この **H89** 感受性キナーゼについてはキナーゼ自体が同定されていないことに加え、エフェクタータンパクも見つかっておらず、小胞出芽での作用機序は全く不明な

ままであり、エフェクタータンパクの同定が制御機構の解明につながると考えられる。

一方、乳幼児のフッ素中毒による風土病として知られる斑状歯は、歯芽形成細胞内の小胞輸送阻害によるエナメル質形成不全が原因である。フッ化アルミニウム錯イオンは三量体 **G** タンパクを活性化することが知られている。**rER** 膜には三量体 **G** タンパクが存在することから、**rER** 膜からの輸送小胞出芽を抑制的に調節している可能性が考えられる。

本研究では小胞輸送の調節機構を明らかにすることを目的とし以下の実験を行った。**rER-Golgi** 間小胞輸送の促進に働く **H89** 感受性キナーゼのエフェクタータンパクの同定を試みた。また **Sar1** の **rER** 膜への移動を評価する実験系を確立し、**H89** 感受性キナーゼによる輸送調節機構と **rER** 膜局在三量体 **G** タンパクによる輸送調節機構について検討し、さらに二つの調節機構の関係についても検討した。

## 第1章 H89感受性キナーゼを介する rER-Golgi 間小胞輸送の促進性制御

### 第1節 H89 感受性キナーゼのエフェクタータンパクの同定

**H89** 感受性キナーゼによりリン酸化されるエフェクタータンパクを探索する目的で、**rER** 膜画分を用いた **phosphorylation assay** を行い、二次元電気泳動オートラジオグラフにより解析した。その結果 **55 kDa**, **pI** 値 **5.5** のリン酸化タンパクを見出し、質量分析装置を用いた **peptide mass fingerprinting** 法により  **$\beta$ -tubulin** であることを同定した。

### 第2節 **Sar1** の移動と **$\beta$ -tubulin** の動態に対する **H89** の効果

**H89** 感受性キナーゼによる **Sar1** の **rER** 膜への移動調節および  **$\beta$ -tubulin** の **rER** 膜への結合動態への影響を **cell free** 系で評価するため、ミクロソーム結合実験の構築を試みた。抗 **Sar1** 抗体の作成のため、ラット **Sar1** 全長をクローニングし、大腸菌でのリコンビナントタンパク発現系を作出した。得られたタンパクを抗原として抗ラット **Sar1** ウサギポリクローナル抗体を作成した。ラット腎由来株化細胞である **NRK** 細胞のミクロソーム膜画分とラット肝細胞質画分をインキュベート後、膜画分を回収しウエスタンブロットによる定量で、**Sar1** および  **$\beta$ -tubulin** の移動・結合量の変化を調べた。**H89** 処置は **Sar1** のミクロソーム膜画分への移動を抑制し、 **$\beta$ -tubulin** のミクロソーム膜結合量を増加させた。しかし、**Taxol** 処置により  **$\beta$ -tubulin** を重合化させ、ミクロソーム膜結合  **$\beta$ -tubulin** 量を増加させた場合では、**Sar1** のミクロソーム膜画分への移動に影響を与えなかった。このことから、 **$\beta$ -tubulin** の **rER** 膜結合量の増加が原因ではなく、リン酸化抑制が **Sar1** 移動抑制に関係すると考えられた。以上より、**H89** 感受性キナー

ゼが $\beta$ -tubulin のリン酸化を伴って rER-Golgi 間小胞輸送の促進に働くことが示唆された。

## 第2章 rER 膜局在三量体 G タンパクによる rER-Golgi 間小胞輸送の抑制性制御

rER 膜に局在する三量体  $G_{i/o}$  タンパクが Sar1 移動調節に関与しているか検討した。ミクロソーム膜画分での三量体 G タンパクの同定を試みたところ、 $G_{o12}$  タンパクの存在を確認した。次に rER 膜局在三量体  $G_{i2}$  タンパクの Sar1 移動への関与を、ミクロソーム結合実験で検討した。三量体  $G_{i/o}$  タンパク活性化物質である mastoparan-7 (MP-7) は Sar1 のミクロソーム膜への移動を濃度依存的に抑制した。一方、MP-7 の陰性対照ペプチドである MP-17 は Sar1 のミクロソーム膜への移動を抑制しなかった。さらに、三量体  $G_{i/o}$  タンパクを ADP リボシル化することで  $G_{i/o}$  タンパクの刺激反応性を消失させる百日咳毒素を添加培養した NRK 細胞から採取したミクロソーム膜を用いてミクロソーム結合実験を行った。百日咳毒素前処置は MP-7 による Sar1 のミクロソーム膜への移動抑制を完全とはいわないまでも回復した。以上より rER-Golgi 間小胞輸送に rER 膜局在三量体  $G_{i2}$  タンパクを介した抑制性の調節機構が存在することが明らかとなった。

## 第3章 輸送の促進機構と抑制機構の関係および細胞レベルでの輸送調節の検証

### 第1節 rER 膜局在三量体 G タンパクと H89 感受性キナーゼの関連

H89 感受性キナーゼが関与する輸送の促進に働く機構と、rER 膜局在  $G_{i2}$  タンパクが関与する抑制性に働く機構の二つの調節機構が独立しているのか、または関連を持つのかについて検討した。第2章にて百日咳毒素の前処置は MP-7 による Sar1 の移動抑制を回復することを示したが、この百日咳毒素の前処置は、第1章第2節で観察した H89 処置による Sar1 の移動抑制には全く影響を与えなかった。また H89 と MP-7 の併用処置は更なる抑制効果を示したが、併用群における百日咳毒素前処置の回復の程度は MP-7 単独処置における回復の程度と差が無かったことから、百日咳毒素前処置は H89 の作用に影響しないと考えられた。また COPII コートタンパクのひとつである Sec23 のミクロソーム膜への移動についても、Sar1 と同様の結果が得られ、H89 や MP-7 による抑制効果が単に Sar1 の rER 膜への移動に対するだけではなく COPII コート小胞形成に対する作用であることが確認された。さらに、第1章で見られた H89 処置による  $\beta$ -tubulin のリン酸化抑制は、MP-7 処置では見られなかった。以上の結果より、rER-Golgi 間小胞輸送の促進の調節および抑制の調節は、シグナリング経路が異なっており、それぞれ独立に作用していることが示唆された。

## 第2節 細胞レベルでの COPII 小胞輸送調節

細胞レベルにおいても **rER-Golgi** 間小胞輸送に促進と抑制の調節機構が働いていることを **NRK** 細胞を用いた **Golgi** 回復実験で確認した。 **Brefeldin A (BFA)** 処置により **Golgi** 装置は可逆的に断片化し **rER** と融合するが、 **BFA** 除去後の **Golgi** 装置の回復は **COPII** 小胞輸送に依存しているため、 **Golgi** 装置の回復の程度をもって **COPII** 小胞輸送を評価することができる。 **H89** 処置および **MP-7** 処置は共に **Golgi** 装置の回復を抑制し、 **rER-Golgi** 間小胞輸送が抑制されていることが示された。 以上から細胞レベルにおいても、 **COPII** 小胞輸送の **H89** 感受性キナーゼを介した促進に働く経路と、 **rER** 膜局在三量体 **G<sub>12</sub>** タンパクを介した抑制に働く経路の存在が示された。

### 総括

1. **H89** 感受性キナーゼによりリン酸化を受けるタンパクとして **β-tubulin** を同定した。 **H89** 処置による **Sar1** の **rER** 膜への移動抑制は、 **rER** 膜結合 **β-tubulin** のリン酸化抑制を伴っていた。 **rER-Golgi** 間小胞輸送に **H89** 感受性キナーゼが **β-tubulin** リン酸化を伴って働くことが示された。
2. **rER** 膜には三量体 **G<sub>12</sub>** タンパクが存在し、その活性化に伴い **Sar1** の **rER** 膜への移動を抑制することから、 **rER-Golgi** 間小胞輸送に **rER** 膜局在三量体 **G<sub>12</sub>** タンパクを介した抑制性調節機構の存在が示された。
3. **H89** 感受性キナーゼを介した小胞輸送の促進機構と、 **rER** 膜局在三量体 **G<sub>12</sub>** タンパクを介した小胞輸送の抑制機構は、共に **Sar1** の **rER** 膜への移動調節を伴うが、百日咳毒素前処置への感受性および **β-tubulin** のリン酸化調節能の有無に差異があることから、独立した作用機構であることが示唆された。

### 審査結果の要旨

粗面小胞体 (**rER: rough-surfaced endoplasmic reticulum**) において新規合成されたタンパクは、 **COPII** 輸送小胞によって **Golgi** 装置へと輸送される。 この **COPII** 小胞輸送は細胞の生存に必須であり、輸送の破綻は **ER** ストレスを導き、 **autophagy** や **Unfolded Protein Response** を介し、時に自殺的細胞死を導く。 **rER** での **COPII** 輸送小胞の形成は、細胞質に存在する **secretion-associated and Ras-related protein 1 (Sar1)** が **GTP** 結合型となり、 **rER** 膜へ移動することにより始まる。 膜に結合した **Sar1** は、細胞質より順次移動してくる **Sec23/24** 複合体、 **Sec13/31** 複合体と **rER** 膜上で結合し

て、COPII コートを形成し小胞を出芽させる。従って Sar1 の rER 膜への移動の調節が、rER-Golgi 間小胞輸送を COPII 輸送小胞出芽レベルで調節する重要なカギとなっている。

セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤である H89 は Sar1 の移動を阻害することが報告されている。しかし、この H89 感受性キナーゼについてはキナーゼ自体が同定されていないことに加え、キナーゼのエフェクタータンパクも見つかっておらず、作用機序は不明である。エフェクタータンパクの同定が起点となり、小胞輸送の促進的な制御機構の解明につながると考えられる。一方、rER 膜局在三量体 Gi タンパクの活性化により rER-Golgi 間小胞輸送が阻害されることから、三量体 G タンパクを介した Sar1 の移動調節機構の存在も予想される。本研究では H89 感受性キナーゼを介した促進性と三量体 Gi タンパクを介した抑制性の小胞輸送調節機構の存在を示し、両者のシグナル経路の関連を検討をしている。得られた成績の概要は以下のとおりである。

第 1 章第 1 節では、H89 感受性キナーゼのエフェクタータンパクの探索を試みている。rER 膜画分を用いた二次元電気泳動オートラジオグラフによる探索で、H89 感受性キナーゼによりリン酸化される分子量 55 kDa、pI 値 5.5 のタンパクを見出し、質量分析装置を用いた peptide mass fingerprinting 法によりこれが  $\alpha$ -tubulin であることを同定している。第 2 節では H89 感受性キナーゼによる Sar1 の rER 膜への移動調節を、細胞質画分とミクロソーム膜画分を用いた無細胞系で評価するミクロソーム結合実験系を確立し調べている。キナーゼ阻害剤である H89 が Sar1 移動を抑制することを示し、第 1 節でのリン酸化変化の結果と合わせて、H89 感受性キナーゼが  $\alpha$ -tubulin のリン酸化を伴って Sar1 の rER 膜への移動に働く可能性を示している。

第 2 章では、rER 膜での三量体 Gi タンパクの局在と、Sar1 移動調節への関与を検討している。最初に Gi2 タンパクが rER 膜に局在していることを示し、次に Gi2 タンパクの Sar1 移動への関与をミクロソーム結合実験で検討している。三量体 Gi タンパク活性化物質である mastoparan-7 (MP-7) は Sar1 の rER 膜への移動を濃度依存的に抑制するが、陰性対照ペプチドである MP-17 は Sar1 の rER 膜への移動を抑制しないこと、三量体 Gi2 タンパクの刺激反応性を消失させる百日咳毒素前処置により MP-7 による Sar1 の rER 膜への移動抑制が有意に回復されることを示している。これらの結果から、新規な小胞輸送調節メカニズムとして、rER 局在三量体 Gi2 タンパクを介した抑制性の調節機構の存在を明らかにしている。

第 3 章では、H89 感受性キナーゼが関与する促進性経路と、rER 膜局在 Gi2 タンパクが関与する抑制性経路の二つの調節経路がどのような関連を持つのかについて検討している。ミクロソーム結合実験において、百日咳毒素の前処置は、H89 処置による Sar1 の移動抑制には影響を与えないこと、そして H89 と MP-7 の併用処置は更なる抑制効果を示すが、百日咳毒素の前処置による抑制回復効果は併用処置群においても H89 の抑制効果には影響していないことを示している。また、第 1 章で見られた H89 処置に

よる **-tubulin** のリン酸化抑制は、**MP-7** 処置では見られないことを示している。これらの結果より、**rER-Golgi** 間小胞輸送の促進と抑制の調節は、それぞれ独立したシグナル経路で調節されていることを強く示唆している。

以上の研究は、**rER-Golgi** 間小胞輸送が、**H89** 感受性キナーゼを介する促進性と **rER** 膜局在三量体 **Gi2** タンパクを介する抑制性の2つの調節機構で調節されていることを示している。**rER-Golgi** 間小胞輸送阻害は **ER** ストレス性細胞死を導くことから、本研究は細胞毒性学的観点から生命現象を捉えるうえで重要な知見であり、獣医学の基礎分野である細胞生物学と応用分野である毒性学に貢献すると考えられる。従って、学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。