

## 脂質がタンパク質の選別輸送を制御

### —小胞体膜セラミドの長さが鍵—

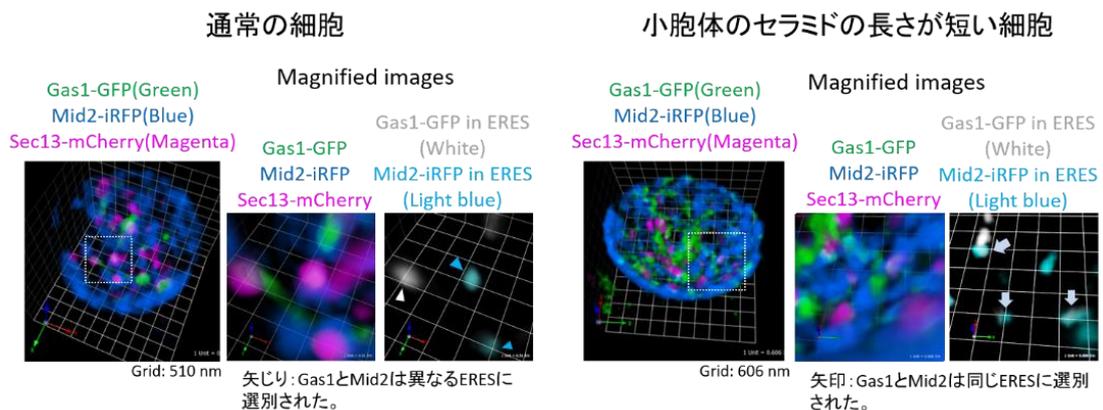
理化学研究所（理研）光量子工学研究センター生細胞超解像イメージング研究チームの黒川量雄専任研究員、和賀美保テクニカルスタッフⅡ、中野明彦チームリーダー（光量子工学研究センター副センター長）、広島大学大学院統合生命科学研究科の船戸耕一准教授、中ノ三弥子准教授らの国際共同研究グループ<sup>※</sup>は、小胞体<sup>[1]</sup>膜の脂質セラミド<sup>[2]</sup>の長さにより、GPI アンカー型タンパク質<sup>[3]</sup>「Gas1」の「ER exit sites (ERES)」<sup>[4]</sup>への選別が制御されることを発見しました。

本研究成果は、タンパク質輸送の異常やその破綻により発症する疾患のメカニズム研究の発展につながると期待できます。

小胞体で新たに作られたさまざまなタンパク質（積荷タンパク質<sup>[5]</sup>）は、小胞体に多数存在する ERES からゴルジ体<sup>[6]</sup>へ輸送されます。しかし、多様な積荷タンパク質がどのように ERES へと選別されるのか、その詳細は不明でした。

今回、国際共同研究グループは、3次元ライブイメージングにより、新たに合成された極長鎖セラミドが付加される Gas1 と膜貫通ドメインを持つタンパク質「Mid2」の輸送を解析しました。その結果、Mid2 は小胞体全体に局在する一方、Gas1 は小胞体のいくつかの ERES 近くのゾーンに集積し、両タンパク質はそれぞれ異なる ERES に選別されることが明らかになりました。さらに、小胞体膜のセラミドの脂肪酸長を短くした細胞では、Gas1 が小胞体全体に局在し、Mid2 と同じ ERES へ選別されたことから、脂質の長さがタンパク質の選別輸送を担っていることを証明しました。

本研究は、科学雑誌『*Science Advances*』オンライン版（12月11日付：日本時間12月12日）に掲載されます。



小胞体セラミドの長さがタンパク質の選別輸送を制御

**※国際共同研究グループ**

理化学研究所 光量子工学研究センター 生細胞超解像イメージング研究チーム

専任研究員 黒川 量雄 (くろかわ かずお)

テクニカルスタッフⅡ 和賀 美保 (わが みほ)

チームリーダー 中野 明彦 (なかの あきひこ)

(光量子工学研究センター 副センター長)

広島大学 大学院生物圏科学研究科

大学院生 池田 敦子 (いけだ あつこ)

広島大学 大学院統合生命科学研究科

准教授 船戸 耕一 (ふなと こういち)

准教授 中ノ 三弥子 (なかの みやこ)

スペイン セビリア大学

大学院生

ソフィア・ロドリゲスギャラルド

(Sofia Rodriguez-Gallardo)

大学院生

スサナ・サビド・ボゾ (Susana Sabido-Bozo)

教授

マヌエル・ムニーツ (Manuel Muñoz)

スイス フリブル大学

教授

ステファノ・バンニ (Stefano Vanni)

スイス ジュネーブ大学

教授

ハワード・リーツマン (Howard Riezman)

**研究支援**

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金基盤研究 S「ゴルジ体を中心とした選別輸送の超解像ライブイメージングによる完全解明 (研究代表者: 中野明彦)」、同新学術領域研究 (研究領域提案型)「細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読 (領域代表者: 清水重臣)」、同新学術領域研究 (研究領域提案型)「ER exit site での GPI アンカー蛋白質選別輸送ゾーンの解析 (研究代表者: 中野明彦)」、同基盤研究 B「糖脂質リモデリングによる蛋白質のソーティング機構 (研究代表者: 船戸耕一)」による支援を受けて行われました。

**1. 背景**

生命の基本単位である細胞の中では、多種多様なタンパク質がそれぞれ働くべき場所に運ばれて機能しています。ヒト、植物、酵母など真核生物の細胞内には、さまざまな細胞小器官<sup>[7]</sup>があります。その一つである小胞体は、細胞内の全タンパク質の約 1/3 を合成する場であり、タンパク質を正しく折り畳み種々修飾して、積荷タンパク質としてゴルジ体へ運び出すという重要な機能を担っています。

積荷タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送の基本的な仕組みは、全ての真核生物で共通しています。積荷タンパク質は、小胞体の特別な場所である「ER exit sites (ERES)」から COPII 小胞<sup>[8]</sup>を介して、ゴルジ体シス槽<sup>[6]</sup>により受け取られゴルジ体へ輸送されます<sup>注1)</sup>。

積荷タンパク質は、ゴルジ体でさらに糖鎖付加などの修飾を受け、細胞膜やリソソーム/液胞<sup>[9]</sup>などそれぞれ固有の目的地まで輸送されます。細胞膜には、膜

貫通ドメインを持つタンパク質や GPI アンカー型タンパク質など、異なる構造の多様なタンパク質が局在しています。GPI アンカー型タンパク質は、カルボキシル末端にアミド結合したグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）によって細胞膜外葉に局在する一群のタンパク質で、真核生物に広く存在しています。GPI アンカーの付加は小胞体で行われ、種々の修飾を受けて GPI の脂質と糖鎖部分の構造変化を受けながら、分泌経路により細胞膜へ輸送されます。GPI に関連する遺伝子の突然変異による多くの疾患が多数発見されてきています。

出芽酵母<sup>[10]</sup>を用いた生化学的な解析により、GPI アンカー型タンパク質が他のタンパク質と異なる COPII 小胞に含まれることや、蛍光タンパク質標識した GPI アンカー型タンパク質が他と異なる ERES に集積することが報告されてきました。しかし、どのような機構で小胞体での GPI アンカー型タンパク質の選別が行われるかは不明でした。

注1) 2014 年 4 月 14 日プレスリリース 「ゴルジ体シス槽は小胞体に接触し積荷タンパク質を受け取る」  
[http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414\\_2/](http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414_2/)

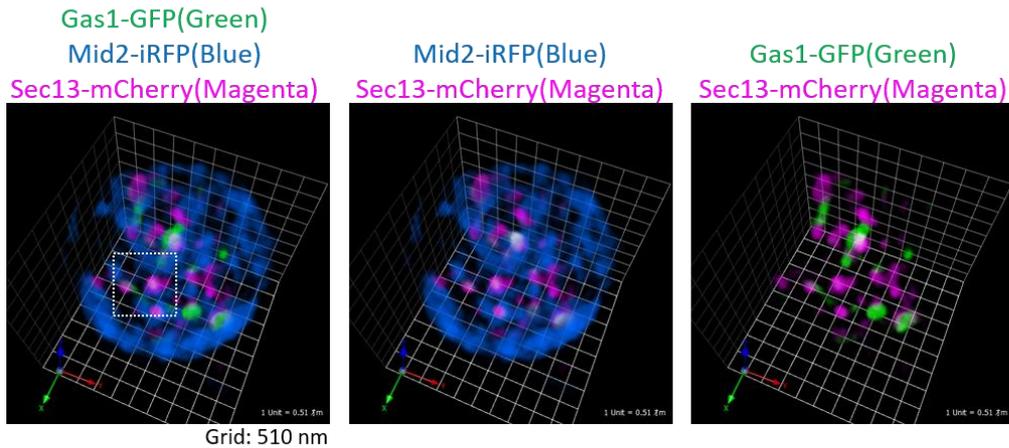
## 2. 研究手法と成果

今回、国際共同研究グループは、多色・超解像・高速で蛍光イメージングが可能な「高感度共焦点顕微鏡システム SCLIM<sup>[11]</sup>」を用いた 3 次元ライブイメージングにより、小胞体で新たに合成された異なる構造を持つ 2 種の細胞膜局在タンパク質の極長鎖セラミド化 GPI アンカー型タンパク質「Gas1」と膜貫通ドメインを持つタンパク質「Mid2」の ERES への選別を可視化することで、選別輸送機構の解明を目指しました。

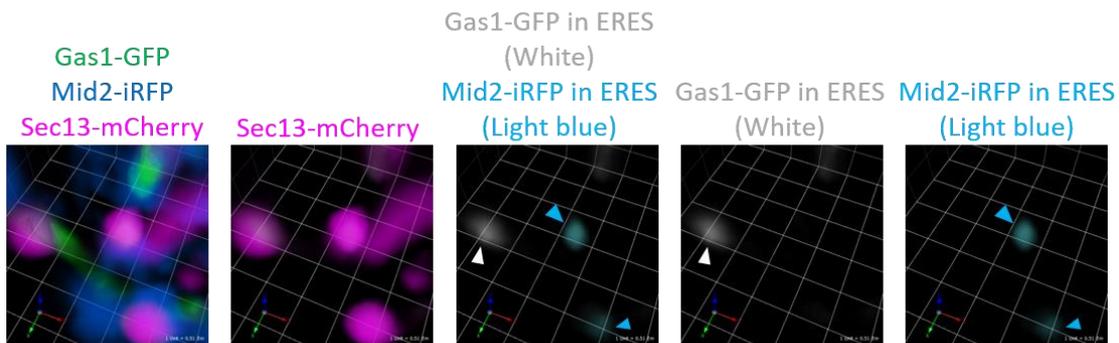
COPII 小胞の被覆タンパク質の遺伝子に変異を持つ温度感受性株出芽酵母 *sec31-1* 株は、37°C では小胞体からゴルジ体へ積荷タンパク質を輸送できません。この変異出芽酵母の ERES に局在する Sec13 に蛍光タンパク質 mCherry を融合した Sec13-mCherry を発現する細胞を作製し、ERES を可視化しました。次に、この細胞にさらに 2 種類の積荷タンパク質 Gas1 と Mid2 それぞれに蛍光タンパク質の GFP と iRFP を融合した Gas1-GFP と Mid2-iRFP が同時に発現誘導できるようにした出芽酵母を作製し、積荷タンパク質と ERES を可視化できるようにしました。そして、2 種類の蛍光タンパク質融合積荷タンパク質を新たに合成させ、37°C で小胞体からゴルジ体への輸送を一旦止めて小胞体内に両積荷タンパク質を留めた後、培養する温度を 24°C に下げて輸送が回復した両積荷タンパク質を観察しました。

すると、新たに合成された膜貫通ドメインを持つ Mid2-iRFP は小胞体全体に局在した一方で、GPI アンカー型タンパク質 Gas1-GFP は多数存在する ERES の一部の近くに集積しました。両タンパク質の ERES 内への取り込みを解析したところ、それぞれ異なる ERES に選別されていることが判明しました（図 1）。

## 通常の細胞 (WT cell)



## 拡大画像(上の画像の破線領域)



矢じり: Gas1とMid2は異なるERESに選別された。

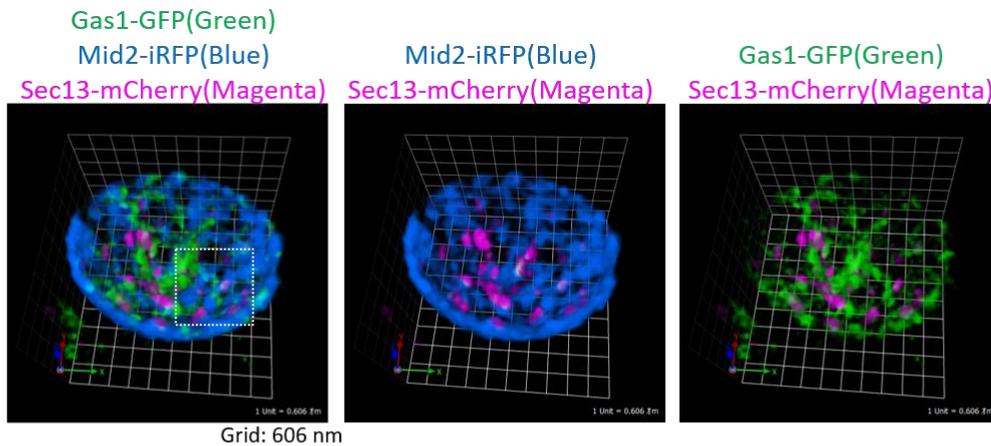
図 1 通常の細胞の Gas1 と Mid2 の小胞体局在と ERES へ選別輸送

通常の細胞では、Mid2-iRFP (青) は小胞体全体に局在する一方、Gas1-GFP (緑) は、一部の ERES 近傍に集積し、それぞれ異なる ERES (矢じり) に選別された。

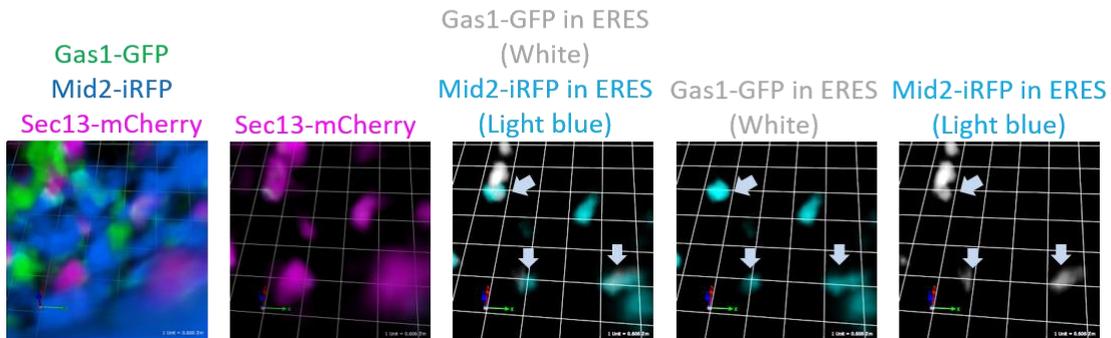
次に、Mid2 と同様に膜貫通ドメインを持つタンパク質 Axl2 と Mid2 を同時に発現する細胞を作製し、それらの小胞体局在と ERES への輸送を観察しました。すると、膜貫通ドメインを持つ両タンパク質はともに小胞体全体に局在し、同じ ERES に選別されることが明らかになりました。

出芽酵母は通常、極長鎖セラミドを生合成します。前述したように Gas1 の GPI アンカーは極長鎖セラミドで構成され、小胞体膜など細胞の膜構造にはこの極長鎖セラミドが含まれています。そこで、極長鎖セラミドをほとんど合成できず、主により短いセラミドを合成する変異出芽酵母を作製しました。この細胞では、Gas1-GFP の GPI のセラミドはごく少量合成される極長鎖セラミドでしたが、小胞体膜には短いセラミドしか含まれていませんでした。Gas1-GFP を観察すると、Gas1-GFP は小胞体全体に局在し、Mid2 と同じ ERES に選別されました(図 2)。このことから、小胞体膜の脂質セラミドの長さにより、タンパク質の選別輸送が制御されていることが初めて証明されました。

## 小胞体のセラミドの長さが短い細胞 (GhLag1 cell)



## 拡大画像 (上の画像の破線領域)



矢印：Gas1とMid2は同じERESに選別された。

図2 小胞体のセラミドの長さが短い細胞の Gas1 と Mid2 の小胞体局在と ERES へ選別輸送

小胞体のセラミドの長さが短い細胞では、Gas1-GFP (緑) も Mid2-iRFP (青) 同様に小胞体全体に局在し、同じ ERES (矢印) に選別された。

### 3. 今後の期待

細胞の生命活動を維持するためには、多種多様なタンパク質が働くべき場所に正確に輸送される必要があります。本研究では、細胞内の膜にある脂質の長さにより、タンパク質選別輸送が制御されることを生きた細胞で直接証明でき、脂質が関与するタンパク質選別輸送の制御機構の一端が明らかになりました。今後、さまざまな疾患の原因となるタンパク質輸送の異常や破綻により発症する疾患のメカニズム研究の発展につながると期待できます。

### 4. 論文情報

<タイトル>

Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites

## &lt;著者名&gt;

Sofia Rodoriguez-Gallardo, Kazuo Kurokawa, Susana Sabido-Bozo, Alejandro Cortes-Gomez, Atsuko Ikeda, Valeria Zoni, Auxiliadora Aguilera-Romero, Ana Maria Perez-Linero, Sergio Lopez, Miho Waga, Misako Araki, Miyako Nakano, Howard Riezman, Kouichi Funato, Stefano Vanni, Akihiko Nakano, Manuel Muñiz

## &lt;雑誌&gt;

*Science Advances*

**5. 補足説明**

## [1] 小胞体

シート状またはチューブ状の膜からなる細胞小器官の一つ。リボソームが付着している粗面小胞体では、ゴルジ体に運ばれる積荷タンパク質の合成が行われる。

## [2] セラミド

細胞の脂質二重層を構成する主要な脂質の一つ。スフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合した化合物の総称。小胞体で生合成される。シグナル伝達物質としても作用する。

## [3] GPI アンカー型タンパク質

カルボキシル末端にアミド結合したグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) によって、細胞膜外葉に局在する一群のタンパク質。真核生物に広く存在し、酵素や受容体、接着因子など多様な働きをしている。

## [4] ER exit sites (ERES)

小胞体膜上の特殊な領域。COP II 小胞が集積する領域。ER は小胞体を意味する endoplasmic reticulum の略。

## [5] 積荷タンパク質

膜交通により運ばれるタンパク質の総称。リボソームが付着している粗面小胞体で作られる。

## [6] ゴルジ体、シス槽

扁平な袋 (槽; シスターナ) からなる細胞小器官の一つで、タンパク質の翻訳後修飾や仕分け、脂質の合成を行う。多くの生物種では、積み重なった層板構造をしている。積荷タンパク質を受ける側をシス槽、積荷タンパク質が仕分けされ出ていく側をトランス槽、その間の槽をメディアル槽と呼ぶ。

## [7] 細胞小器官

真核細胞の内部に存在する一定の機能、形態を持つ膜構造の総称。

## [8] COP II 小胞

小胞体で新しく作られた積荷タンパク質を積み込む輸送小胞。COP II と呼ばれる被覆タンパク質 (膜) により覆われている。

## [9] リソソーム/液胞

細胞内外成分の分解機能を担う細胞小器官。内部に加水分解酵素を持つ。植物、酵母では、発達した液胞がこの機能を担っている。

## [10] 出芽酵母

パン酵母やビール酵母などと呼ばれる真核微生物で、出芽によって増えるのでこの名がある。細胞生物学や遺伝学実験のモデル生物として広く使われている。

## [11] 高感度共焦点顕微鏡システム SCLIM

研究チームが独自開発した蛍光顕微鏡システム。ニポウディスク方式共焦点スキャナー、拡大レンズ、高性能のダイクロイックミラー、フィルターシステムによる分光器、冷却イメージンテンシファイアー（電子増倍管）と複数の EMCCD カメラシステムから構成される。複数蛍光の同時取得と高 S/N 比の蛍光画像取得が可能。SCLIM は、Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy の略。

## 6. 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 光量子工学研究センター 生細胞超解像イメージング研究チーム

専任研究員 黒川 量雄（くろかわかずお）

テクニカルスタッフⅡ 和賀 美保（わが みほ）

チームリーダー 中野 明彦（なかのあきひこ）

（光量子工学研究センター 副センター長）

TEL：048-467-9548（黒川） FAX：048-462-4679（黒川）

E-mail：kkurokawa[at]riken.jp(黒川)



黒川 量雄



中野 明彦

広島大学 大学院統合生命科学研究科

准教授 船戸 耕一（ふなとこういち）

准教授 中ノ 三弥子（なかのみやこ）



報道解禁：日本時間 2020 年 12 月 12 日午前 4 時・12 日朝刊

---

<機関窓口>

\* 今般の新型コロナウイルス感染症対策として、理化学研究所では在宅勤務を実施しておりますので、メールにてお問い合わせ願います。

理化学研究所 広報室 報道担当

E-mail : ex-press[at]riken.jp

広島大学 財務・総務室 広報部 広報グループ

E-mail : koho@office.hiroshima-u.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。

---