

Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane

Kazuhito V. Tabata¹, Ken Sato², Toru Ide³, Takayuki Nishizaka⁴, Akihiko Nakano^{5,6}, Hiroyuki Noji¹

¹阪大・産研, ²東大院・総合文化, ³阪大院・生命機能, ⁴学習院大学・理, ⁵理研・基幹研, ⁶東大院・理
EMBO J. 2009 Nov 4;28(21):3279–89.

【研究の背景・目的】 真核細胞内の小胞体からゴルジ体への輸送は、COPII と呼ばれるタンパク質複合体によってなされている。COPII 小胞は、Sec23/24p と Sec13/31p からなる COPII コートによって覆われており、この COPII コートと輸送されるタンパク質との結合は、低分子量 GTPase である Sar1p によって制御されていると考えられている。ところが、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。そこで我々は、COPII 小胞形成反応を顕微鏡下で再現し、小胞形成過程における輸送されるタンパク質の動態を可視化する。

【結果】 本実験のために、我々が開発したシステムは、顕微鏡上に、水平に脂質二重膜である平面膜を再構成できるシステムである (Fig. 1)。また同時に、レーザー光によるエバネッセント照明も可能にしている。まず、顕微鏡上に作成した平面膜に対して、蛍光ラベルした輸送タンパク質 (Bet1p-Cy3) を導入し、その拡散を観察した。Bet1p-Cy3 単独では、その拡散係数が $4.5 \mu\text{m}^2/\text{sec} \pm 2.0$ とほぼ膜中を拡散する膜タンパクの拡散係数と一致した。つまり、脂質二重膜内に導入された Bet1p-Cy3 は単独で拡散していることが示唆される。さらにここへ Sar1p を加えると、その拡散係数は $2.6 \mu\text{m}^2/\text{sec} \pm 1.4$ まで減少した。これは、Bet1p-Cy3 と Sar1p が相互作用することで、見かけの Bet1p-Cy3 の大きさが大きくなり、拡散係数が低下したものと考えられる。次に、この脂質膜を用いて、小胞形成が起きるかどうかを調べた。実験は、脂質二重膜に Bet1p-Cy3 を導入し、upper chamber と lower chamber の間に COPII コンポーネントを加え、lower chamber 側に budding してくる小胞を Bet1p-Cy3 由来の輝点として時

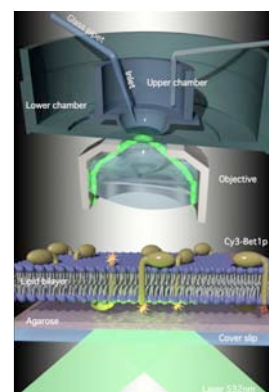


Fig. 1 平面膜顕微鏡システム

間ごとにカウントし、その増加割合をプロットした (Fig. 2)。すると、小胞形成が起こる GTP 存在下では輝点の増加が確認され、小胞形成が起こらない GDP 存在下では増加が見られなかった。つまり、この脂質二重膜より小胞形成が起きることが示された。続いて、この小胞形成過程をイメージングした。まず、作成した脂質膜に Bet1p-Cy3 を導入し、upper chamber に残りの COPII コンポーネントを加え、Bet1p-Cy3 を観察した。すると、GTP 存在下では、Bet1p-Cy3 がクラスターを形成することが明らかとなった (Fig. 3a)。また、GTP の加水分解されないアナログである GMP-PNP を用いた場合、クラスターの蛍光強度が著しく低下することが分かった (Fig. 3b)。この場合、蛍光強度は単位面積当たりの Bet1p-Cy3 の個数になるため、GTP 条件下では、GMP-PNP 条件下と比べて Bet1p-Cy3 の密度が高く、より濃縮されていると言える。つまり、GTP の加水分解によって、輸送タンパクを濃縮していることが示された。次に、輸送されないタンパク質を蛍光ラベルしたもの (Ufe1p-ATTO) を Bet1p-Cy3 とともに膜内に導入し、クラスター化させる実験を行った。このタンパク質は認識されないため、膜上での分布は常に均一であることが予測される。しかしながら、クラスター化後に Ufe1p-ATTO を観察すると黒く抜けたような構造が見られた (Fig. 4)。Bet1p-Cy3 を観察するとそれと一致するようなクラスターの形状が確認された。つまり、Ufe1p-ATTO はクラスター内部より排除されていることが示された。では、なぜ全く認識されないタンパク質が、クラスターより排除を受けることができるのか？我々は、最近明らかになった COPII のカゴの構造から、構造的に輸送されないタンパク質が入れなくなるほどタイトな構造を形成することで、排除しているのではないかと考えている。これらの結果より、COPII 小胞形成は、GTP の加水分解によって、輸送されるタンパクを濃縮し、同時にタイトなカゴを作ることで輸送されないタンパク質を排除する効率的なシステムであると考えられる。

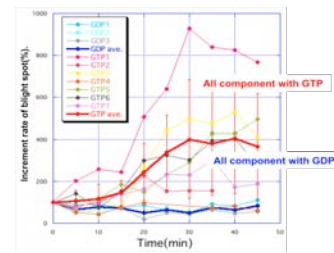


Fig. 2 人工脂質二重膜からの COPII 小胞の生成

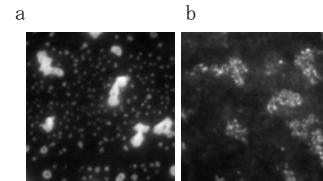


Fig. 3 COPII コンポーネントによる Bet1p-Cy3 クラスター形成 a, GTP 存在下 b, GMP-PNP 存在下

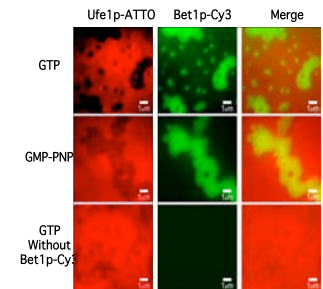


Fig. 4 クラスター形成における輸送されないタンパク質の排除