



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A New Class of Endoplasmic Reticulum Export Signal ΦΧΦΧΦ for Transmembrane Proteins and its Selective Interaction with Sec24C [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大津, 航
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11069号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53801
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wataru_Otsu_abstract.pdf, 「論文内容の要旨」



様式 4

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名： 大津 航

学位論文題名

A New Class of Endoplasmic Reticulum Export Signal $\Phi X \Phi X \Phi$ for Transmembrane Proteins and its Selective Interaction with Sec24C

(膜蛋白質小胞輸出の分子機構：新規シグナル配列 $\Phi X \Phi X \Phi$ と Sec24C の選択的相互作用)

小胞体(ER)で合成された膜内在性蛋白質は、Sar1-GTP と Sec23/Sec24、Sec13/Sec31 各複合体から構成される coatmer protein complex II (COPII)小胞に組み込まれてゴルジ装置へ運ばれる。この小胞輸出には、積荷蛋白質の特定アミノ酸配列モチーフ(ER 輸出シグナル)が Sec24 と選択的に結合することが必要である。Di-acidic 配列、di-hydrophobic 配列をはじめとする多様な ER 輸出シグナルと Sec24 分子の多様性が、多くの蛋白質の COPII 小胞への組み込みを可能としているとされるが、具体的な相互作用が明らかにされている例は少ない。

AE1 (anion exchanger 1、バンド3)は、赤血球と腎臓集合管上皮細胞に分布する膜内在性蛋白質である。AE1 遺伝子の異常に起因する遺伝性球形赤血球症や遠位尿細管アシドーシスの分子病態解析から、ヒト AE1 の極性分布や非極性細胞における細胞膜への輸送には C 末端 11 アミノ酸残基が必須であることが明らかにされている。例えば、HEK293 細胞に発現させた C 末端 11 アミノ酸を欠く変異体(AE1 Δ 11)は、細胞膜に輸送されず ER に滞留する。ところが、牛の AE1 を HEK293 細胞に導入すると、AE1 Δ 11 は野生型と同様の効率で細胞膜に運ばれ、ER への滞留はみられない。したがって、その ER からの輸出は、ヒトとは異なる未知のシグナルで規定されることが示唆される。本研究の目的は、AE1 の ER 輸出に関わる新たなシグナルを同定し、そのメカニズムを解明することにある。

まず、AE1 と AE1 Δ 11 の N 末端細胞質ドメインに焦点をあて、一連の牛-ヒトキメラ蛋白質を作製し HEK293 細胞に発現させてそれらの細胞内局在を比較した。AE1 蛋白質は N 末端に enhanced green fluorescent protein (EGFP)を付加して細胞内分布を観察し、また細胞表面ビオチン化法で細胞膜における発現を解析した。その結果、N 末端領域の ²⁵SVSIPM³⁰ 配列が牛 AE1 の細胞膜における発現を規定することが判明した。この配列のアミノ酸置換変異体について同様の解析を行った結果、²⁶VSIPM³⁰ 部分が (V/L/F)X(I/L)X(M/L) である場合に EGFP-AE1、EGFP-AE1 Δ 11 はいずれも細胞表面に効率よく輸送される一方、いずれかの疎水性アミノ酸のアラニン置換体は全て ER への滞留を示した。したがって、この $\Phi X \Phi X \Phi$ 配

列(Φ は疎水性、X は任意のアミノ酸残基)が、ER からの小胞輸出を規定するシグナルとなる可能性が示された。

次に、II 型膜貫通性蛋白質である Ly49E の N 末端細胞質領域を AE1 のそれと組み換えた EGFP 標識キメラレポーター蛋白質の細胞内局在を、上記の手法に糖鎖成熟の解析を加えて検討した。 $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列を持たないヒト AE1 の N 末端領域を組み込んだ hN[1-39]Ly の蛍光シグナルの大部分が ER に分布したのとは対照的に、牛 AE1 由来の ²⁶VSIPM³⁰ 配列をもつ bN[1-37]Ly とヒト AE1 N 末端領域に $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列を持たせた hN[P27V/S29I]Ly のシグナルは主に細胞膜に認められた。また、hN[1-39]Ly の *N*-結合型糖鎖が endoglycosidase H に感受性の高マンノース型でありゴルジ装置における糖鎖成熟が生じていないのに対し、bN[1-37]Ly と hN[P27V/S29I]Ly は同酵素に耐性であった。さらに、Sar1 H79G 変異体を同時に発現させて COPII 小胞の形成を阻害したところ、bN[1-37]Ly と hN[P27V/S29I]Ly の *N*-結合型糖鎖の成熟が阻害された。加えて、牛 AE1 と同様、 $\Phi X\Phi X\Phi$ に相当する配列をもつ馬(¹¹IEVIV¹⁵)とマウス(³⁵LTIPV³⁹)の AE1 Δ 11、ならびにその N 末端領域と Ly49E のキメラ蛋白質(それぞれ eqN[1-41]Ly と mN[1-49]Ly)は、導入した HEK293 細胞で、いずれも細胞膜における発現を呈したが、相当する配列のない犬 AE1 Δ 11 とキメラ蛋白質 cN[1-46]Ly は ER への滞留を生じた。これらの結果から、 $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列は、レポーター蛋白質の COPII 小胞による ER からの輸出シグナルとして働くことが明らかになった。

最後に、この $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列の COPII 小胞側の受け手となる分子の検討を行った。牛 AE1 の N 末端領域に Halo tag を付加したリコンビナントペプチド bN[1-37]-Halo を作製し、同じくヒト配列由来の hN[1-39]-Halo を対照として、HEK293 細胞の可溶化抽出蛋白質と孵置し、特異的に結合する蛋白質を得た。これらの蛋白質をトリプシン消化のうえ質量分析装置で解析したところ、Sec24C と Sec23A であることが示唆された。そこで、Sec24A~Sec24D を発現させた HEK293 細胞抽出液と上記のリコンビナントペプチドを孵置したところ、Sec24C が bN[1-37]-Halo と特異的に結合することが判明した。さらに、Sec24C/Sec24D 上の IXM モチーフ結合部位として知られる ⁸⁹⁵LIL⁸⁹⁷ をアラニンに置換した Sec24C-AAA 変異体では、リコンビナントペプチドとの結合が失われ、またこれを同時に細胞に導入すると、bN[1-37]Ly と hN[P27V/S29I]Ly の糖鎖成熟が阻害された。これらの結果は、Sec24C が $\Phi X\Phi X\Phi$ 配列を特異的に認識・結合する COPII 小胞側の受け手として機能し、その結合が ⁸⁹⁵LIL⁸⁹⁷ を含む領域で生じることを明示している。

以上の知見から、新たなモチーフ配列 $\Phi X\Phi X\Phi$ が膜内在性蛋白質の ER 輸出シグナルとして働くこと、この $\Phi X\Phi X\Phi$ シグナルは Sec24C との特異的結合を介して積荷蛋白質の COPII 小胞への組み込みと ER-ゴルジ間小胞輸送を効率化することが解明された。