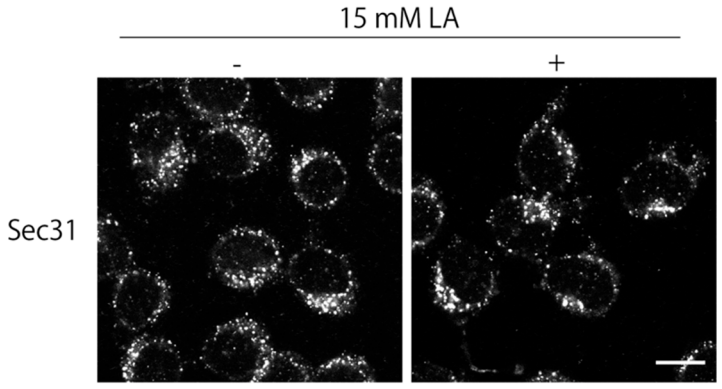
160　小胞体出芽部位の局在は分泌機能と関連するか？	馬場　崇

【目的】分泌タンパク質は小胞体内で合成されたのち、小胞体上の特別なドメインである ER exit site（ERES、小胞体出芽部位）から COPII 被覆小胞に詰め込まれ、ゴルジ体を経由して細胞外、もしくは細胞内の様々な膜区画へ運ばれる。1 細胞あたり数百個存在する ERES は、小胞体上に一様に存在するわけではなく、以下の二種類に大別される。ゴルジ体近傍に凝集した ERES（GERES）と細胞質に点状に散らばった ERES（CERES）である。CERES から出芽した小胞は、GERES から出芽した小胞に比べて、ゴルジ体まで長距離移動する必要がある。しかしながら、GERES と CERES の機能的差異に関する知見はほとんどない。細胞外の pH の低下は小胞体―ゴルジ体間輸送を遅延させることから、分泌経路における細胞外環境の重要性が増しつつある。腫瘍内では、がん細胞が解糖系亢進により多量の乳酸を産生・分泌し、結果、酸性環境である。乳酸は pH の低下だけでなく、腫瘍内に浸潤したマクロファージに作用し、*VEGFA* や *IL23A* の遺伝子発現の増加を引き起こす。一方で、乳酸がマクロファージの ERES の局在やタンパク質分泌に与える影響、また、分泌経路の各々の膜区画に与える影響は詳細に解析されていない。今回、1. 高乳酸環境における ERES の局在変化と小胞輸送との相関関係の解明、2. ERES が小胞体上を移動する分子機構の解明を試みた。

【方法】マクロファージ 様細胞株である J774.1 細胞を用いて乳酸存在下における ERES 及びその他分泌経路のオルガネラの細胞内局在や形態を免疫染色及び共焦点顕微鏡により観察した。さらに HeLa 細胞を用いた COPII タンパク質の発現抑制により ERES 局在を決定するタンパク質を探索した。

【結果】非乳酸存在下において、球状の J774.1 細胞の ERES は、主に核以外の領域に点状に局在していた。加えて、一部の細胞では核近傍に ERES が集積していたが、その割合は少なかった。これは細胞の形態が丸い影響か、もしくは細胞種差によるものであると考えられる。一方で、乳酸添加によりゴルジ体付近の ERES（GERES）の割合が多くなり、また数も少なくなった。乳酸が ERES の局在に何かしらの影響を与えることが示唆された。また、細胞膜―エンドソーム間をリサイクリングするトランスフェリン受容体は、乳酸により核近傍の局在が増加した。HeLa 細胞を用いた実験では Sec23 以外の COPII 因子も ERES 局在に寄与することが分かった。

乳酸存在下における J774.1 細胞の ERES の局在



160. 小胞体出芽部位の局在は分泌機能と関連するか？

馬場　崇

*秋田大学 大学院医学系研究科 情報制御学 実験治療学講座

Key words：小胞輸送，小胞体出芽部位，高乳酸環境

緒　言

分泌タンパク質は小胞体内で合成されたのち、小胞体上の特別なドメインである ER exit site（ERES、小胞体出芽部位）から COPII 被覆小胞に詰め込まれ、ゴルジ体を経由して細胞外、もしくは細胞内の様々な膜区画へ運ばれる。1 細胞あたり数百個存在する ERES は、小胞体上に一様に存在するわけではなく、以下の二種類に大別される。ゴルジ体近傍に凝集した ERES（GERES）と細胞質に点状に散らばった ERES（CERES）である。CERES から出芽した小胞は、GERES から出芽した小胞に比べて、ゴルジ体まで長距離移動する必要がある。しかしながら、GERES と CERES の機能的差異に関する知見はほとんどない。

細胞外の pH の低下は小胞体―ゴルジ体間輸送を遅延させることから［1］、分泌経路における細胞外環境の重要性が着目されつつある。腫瘍内環境では、がん細胞が解糖系亢進により多量の乳酸を産生・分泌し、結果、酸性である。乳酸は、また、免疫抑制作用が示唆されており［2］、腫瘍内に浸潤したマクロファージの *VEGFA* や *IL23A* の遺伝子の転写を増加させる［3, 4］。一方で、乳酸がマクロファージの ERES の局在やタンパク質分泌に与える影響、また分泌経路の各々の膜区画に与える影響は詳細に解析されていない。今回、1. 高乳酸環境における ERES の局在変化と小胞輸送との相関関係の解明、2. ERES が小胞体上を移動する分子機構の解明を試みた。

方法および結果

1.　高乳酸環境におけるマクロファージ 様細胞株 J774.1 細胞の ERES の局在

最初に高乳酸環境におけるマクロファージの ERES 局在を調べるために、マウス由来のマクロファージ様細胞株である J774.1 をカバーガラスに播種し、15 mM 乳酸存在下で一晩培養した。その後、ERES マーカーである Sec31A の抗体で免疫染色を行い、共焦点顕微鏡（LSM900）で観察と撮影を行った。

非乳酸存在下において、球状の J774.1 細胞の ERES は、主に核以外の領域に点状に局在していた（図 1 左）。加えて、一部の細胞では核近傍に ERES が集積していたが、その割合は少なかった。これは細胞の形態が丸い影響か、もしくは細胞種差によるものであると考えられる。一方で、乳酸添加によりゴルジ体付近の ERES（GERES）の割合が多くなり、また数も少なくなった（図 1 右）。乳酸は ERES の局在に何かしらの影響を及ぼすことが示唆される。

*現在の所属：和歌山県立医科大学 医学部 分子遺伝学講座

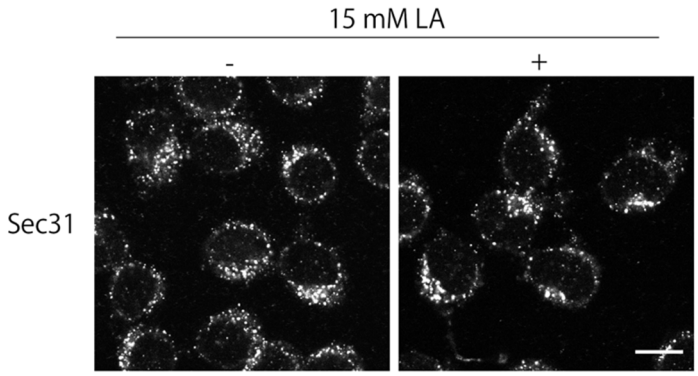


図 1. 乳酸存在下における J774.1 細胞の ERES の局在分布
J774.1 細胞を 15 mM の乳酸で一晩処理し、抗 Sec31A 抗体で免疫染色を行った。
LA : lactic acid（スケールバー：10 μ m）。

2. 高乳酸環境におけるマクロファージ 様細胞株 J774.1 細胞のその他の分泌経路に関わるオルガネラへの影響

細胞膜に局在する受容体は小胞体から細胞膜へ輸送され、さらに一部の受容体は細胞膜―エンドソーム間をリサイクリングする。高乳酸環境が細胞膜受容体輸送へ与える影響を調べるために、細胞膜―エンドソーム間輸送の代表的な輸送基質であるトランスフェリン受容体（TfR）の局在を調べた。J774.1 細胞を 15 mM 乳酸で一晩培養し、抗トランスフェリン受容体抗体にて免疫染色を行った。通常の培地の J774.1 細胞において、TfR はサイトゾル全体に点状に局在し、さらに核近傍に一部集積していた（図 2 上段左）。一方で、乳酸存在下の J774.1 細胞では、TfR の核近傍に集積する割合が増加していた（図 2 上段右）。

次に、高乳酸環境におけるゴルジ体への影響も観察した。ゴルジ体の形態は小胞体―ゴルジ体間の順行輸送、逆行輸送の割合に依存する。J774.1 細胞を同様に 15 mM の乳酸存在下で培養後、シスゴルジ体のマーカータンパク質である GM130 の抗体で免疫染色を行った。乳酸非存在化では核近傍に GM130 は局在していた。その様な局在パターンは、乳酸添加でも同様であった（図 2 下段）。乳酸はゴルジ体の形態には影響しないことが示唆される。

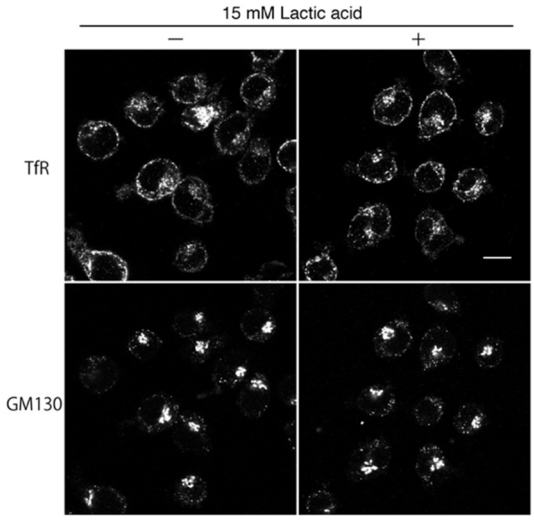


図 2. 乳酸存在下における J774.1 細胞の ERES の局在分布
J774.1 細胞を 15 mM の乳酸で一晩処理し、抗トランスフェリン受容体抗体及び GM130 で二重染色を行なったのち、Hoechst33342 核染色した。LA : lactic acid、TfR : トランスフェリン受容体（スケールバー：10 μ m）。

3. COPII 構成タンパク質の発現抑制が GERES と CERES の割合に与える影響

ERES の局在の差異に伴う分泌経路への影響を調べるため、最初に ERES の移動に必要なタンパク質を探索した。既に、COPII タンパク質である Sec23 がモータータンパク質ダイニンと相互作用し、ERES を移動させることは Stephens らにより報告されている［5］。今回、その他の COPII タンパク質が GERES と CERES の割合に関与するかどうかを調べた。様々な COPII タンパク質遺伝子の siRNA を HeLa 細胞に導入することで発現抑制を行ったのち、ERES の局在を調べた。その結果、Sec23 以外の COPII タンパク質も ERES 局在に寄与することが分かった。

考　察

高乳酸環境ではJ774.1細胞のERESは核近傍に集積しており、ERESの数も少なく観察された。高乳酸環境では特定の遺伝子の転写量が10倍以上増加することから、ERESの減少は、小胞体に過剰な輸送基質が蓄積した結果を反映しているのかもしれない。実際に同様の現象が小胞体に積み荷タンパク質が蓄積したときに認められる［6］。今後はRUSHアッセイなど実際の輸送を定量解析し、ERESの局在パターンとの関係性を調査していく。

TfRも同様に核近傍に集積することが分かった。TfRのエンドソームから細胞膜への輸送が滞っていることが示唆される。乳酸によりERESの局在が変化したが、ゴルジ体の形態や局在には影響がなかった。乳酸は小胞体―ゴルジ体間輸送に大きな影響は与えないと考えられる。

また、今回Sec23以外のCOPIIタンパク質もERESの移動に寄与することが明らかにされた。ERES局在化機構の解明に伴い、鍵となるタンパク質を発現抑制・過剰発現することでERES局在を制御し、分泌経路との関連を明らかにできればと考えている。

共同研究者・謝辞

乳酸に関する研究は和歌山県立医科大学分子遺伝学講座の井上徳光教授、COPII タンパク質の発現抑制に関する研究は秋田大学情報制御学実験治療学講座の齋藤康太教授のご支援を賜り、深く感謝致します。本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A, Nakamura N. Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. Exp Cell Res. 2014 Nov 1;328(2):325-39. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.09.009. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25257606.

2) Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? J Pathol. 2013 Aug;230(4):350-5. doi: 10.1002/path.4218. PMID: 23729358; PMCID: PMC3757307.

3) Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. J Immunol. 2008 Jun 1;180(11):7175-83. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7175. PMID: 18490716.

4) Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature. 2014 Sep 25;513(7519):559-63. doi: 10.1038/nature13490. Epub 2014 Jul 13. PMID: 25043024; PMCID: PMC4301845.

5) Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. Nat Cell Biol. 2005 Jan;7(1):48-55. doi: 10.1038/ncb1206. Epub 2004 Dec 5. PMID: 15580264; PMCID: PMC1592520.

6) Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP. Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. EMBO J. 2008 Aug 6;27(15):2043-54. doi: 10.1038/emboj.2008.136. Epub 2008 Jul 24. PMID: 18650939; PMCID: PMC2516884.