

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2008 年度～2012 年度

課題番号：20001009

研究課題名（和文）膜交通における選別輸送の分子機構の解明と植物の高次システムへの展開

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Protein Sorting in Membrane Traffic and Roles in Higher Plants

研究代表者

中野 明彦（東京大学 大学院理学系研究科 教授）

研究者番号：90142140

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学／細胞生物学

キーワード：膜交通，選別輸送，ライブイメージング，出芽酵母，シロイヌナズナ

1. 研究計画の概要

(1) 膜交通の選別分子機構

主に発芽酵母を材料に，可視化の新たな方法論を積極的に開発し，選別輸送の分子機構の徹底的な理解を目指す。

(2) 生化学的再構成と 1 分子観察

COPII 小胞形成完全再構成系を用い，1 分子観察を駆使して選別分子機構を解明する。

(3) 高等植物における膜交通の役割

主にシロイヌナズナを材料に，膜交通が組織レベル，個体レベルでの高次機能で果たす役割を理解する。

2. 研究の進捗状況

(1) 膜交通の選別分子機構

① ゴルジ体槽成熟：酵母可視化積荷マーカーを開発し，小胞体からゴルジ体シス，トランス領域への経時的な移行観察に成功した。

② COPII 小胞からのゴルジ槽形成：時空間超高解像度観察により，小胞体出口に対してゴルジ体シス槽がアプローチして積荷の受け渡しを行う新しいモデルを提唱した。

③ ポストゴルジネットワーク：ゴルジ体トランス領域からトランスゴルジ網への遷移の過程を詳細に観察した。

④ 共焦点顕微鏡の改良開発：超高感度高速システムで，5 色同時観察系を開発した。

⑤ FRET イメージング：酵母 Ypt GTPase 群の活性を可視化する 1 分子 FRET プローブを開発し，活性動態の観察に成功した。

(2) 生化学的再構成と 1 分子観察

① COPII 小胞形成の完全再構成系：積荷の濃縮と非積荷の排除の分子機構を解明し，また新たな制御因子を発見した。

② 人工膜での 1 分子観察：Sar1 の GTPase 活性が，積荷の選別で果たす役割を可視化することに成功した。

(3) 高等植物における膜交通の役割

① 植物エンドサイトーシス：真核生物保存型と植物特異的 Rab5 が，異なる輸送経路を制御していることを明らかにした。

② 植物のポストゴルジ膜交通：トランスゴルジ網の SNARE および Rab11 が，種々のストレス応答に関与していることを示した。

③ 液胞形成と分化：可視化マーカーを確立し，液胞膜分化の意義について解析を行った。

④ 細胞極性形成と維持：シロイヌナズナのみオシン VIII および XI 全分子種について，細胞内局在解析を行った。また，積荷アダプターを同定した。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している

その理由：まず，ゴルジ体槽成熟の分子機構の完全理解のために大きな挑戦であった積荷の可視化について成功した。また，時空間超高分解能の共焦点システムで，5 色という多色の同時観察に目処があった。ゴルジ体の形成とポストゴルジ膜交通過程について，次々に新たな知見を得，既存のモデルを大きく書き換えようとしている。長年の謎であった植物の 2 種類の Rab5 の機能分化をついに解明し，また膜交通におけるみオシンの役割の解明も，分子レベルで進みつつある。

4. 今後の研究の推進方策

本研究の鍵を握る時空間超高解像度レーザー共焦点顕微システムで，ついに本格的な多色観察が可能になる。これを駆使し，ゴルジ体の槽成熟，小胞体 COPII より形成，そしてトランスゴルジ網以降の経路への選別輸送の分子機構を徹底的に解明していく。また，無細胞再構成系に生細胞の知見をフィードバックし，より定量的な理解を目指していく。植物においては，とくに陸上植物が獲得

した新規の膜交通経路の意義の解明に全力を上げる。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件)

- P. Dhonukshe, H. Tanaka, T. Goh, K. Ebine, A. P. Mähönen, K. Prasad, I. Blilou, N. Geldner, J. Xu, T. Uemura, J. Chory, T. Ueda, A. Nakano, B. Scheres, and J. Friml (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin gradient and cell-fate decisions. *Nature* **456**: 962-966.
- K. Ebine, Y. Okatani, T. Uemura, T. Goh, K. Shoda, M. Niihama, M. T. Morita, C. Spitzer, M. S. Otegui, A. Nakano, and T. Ueda (2008). A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 3006-3021.
- S. Naramoto, S. Sawa, K. Koizumi, T. Uemura, T. Ueda, J. Friml, A. Nakano, and H. Fukuda (2009). Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plants. *Development* **136**: 1529-1538.
- K. V. Tabata, K. Sato, T. Ide, T. Nishizaka, A. Nakano, and H. Noji (2009). Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J.* **28**: 3279-3289.
- Y. Hashiguchi, M. Niihama, T. Takahashi, C. Saito, A. Nakano, M. Tasaka and M. T. Morita (2010). Loss-of-function mutations of retromer large subunits suppress the phenotype of *zig* mutant that lacks Qb-SNARE VTI11. *Plant Cell* **22**: 159-172.
- M. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Sato, A. Yamagata, H. Mimura, A. Yoshikawa, K. Sato, A. Nakano, and S. Fukai (2010). Structural basis for the Rho1- and phosphoinositide-dependent localization of Sec3, a subunit of the exocyst complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 180-186.
- M. Fujimoto, S. Arimura, T. Ueda, H. Takanashi, Y. Hayashi, A. Nakano, and N. Tsutsumi (2010). *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 6094-6099.
- T. Uejima, K. Ihara, T. Goh, E. Ito, M. Sunada, T. Ueda, A. Nakano, and S. Wakatsuki (2010). GDP-bound and nucleotide-free intermediates of the guanine nucleotide exchange in the Rab5/Vps9 system. *J. Biol. Chem.* **285**: 36689-36697.

- T. Uemura, M. T. Morita, K. Ebine, Y. Okatani, D. Yano, C. Saito, T. Ueda, and A. Nakano (2010). Vacuolar/pre-vacuolar compartment Qa-SNAREs VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**: 864-873.

- S. Naramoto, J. Kleine-Vehn, S. Robert, M. Fujimoto, T. Dainobu, T. Paciorek, T. Ueda, A. Nakano, M. C. E. Van Montagua, H. Fukuda, and J. Friml (2010). ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 21890-21895.

- A. Nakano and A. Luini (2010). Passage through the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 471-478.

- C. Koder, T. Yorimitsu, A. Nakano, K. Sato (2011). Sed4p stimulates Sar1p GTP hydrolysis and promotes limited coat disassembly. *Traffic* **12**: 591-599.

(以上全て査読あり) [ほか 23 件]

[学会発表] (計 163 件)

- A. Nakano (invited speaker) (2009). Maturing cisterna. Golgi consensus meeting. CRG, Barcelona, Spain, June 13.

- A. Nakano (invited speaker) (2009). Golgi and post-Golgi traffic as revealed by uniquely evolved plant systems. Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology. Andover, NH, USA, July 8.

- A. Nakano (invited speaker) (2010). Mechanistic insights into the membrane trafficking through and around the Golgi apparatus. KITP Conf. on Evolutionary Perspectives on Mechanisms of Cellular Organization, Univ. of California. Santa Barbara, CA, USA, January 20.

- A. Nakano (invited speaker) (2010). ER structure regulates the organization of COPII assembly sites and thus the biogenesis of the Golgi apparatus. Special Symposium "Biochemistry of Membrane Traffic: Secretory and Endocytic Pathways," The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Tahoe City, CA, USA, October 28.

[ほか 159 件]

[図書] (計 2 件)

- Akihiko Nakano (2008). Yeast Golgi apparatus. *In The Golgi Apparatus, State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery*, eds. A. Mironov and M. Pavelka, pp. 623-629, Springer-Verlag, Wien.

[ほか 1 件]

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ URL:

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/HP/index.html>