

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770215

研究課題名 (和文) イメージングによるゴルジ体内タンパク質輸送機構の解明

研究課題名 (英文) Live imaging of protein transport through the Golgi apparatus

研究代表者

時田 公美 (松浦公美) (TOKITA KUMI)

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員

研究者番号：50415296

研究成果の概要 (和文)：

細胞周期ごとに形成・消失をくりかえすダイナミックな細胞小器官である小胞体やゴルジ体の形成・維持機構を解明するため、イメージングを中心とした手法により解析を行った。その結果、試験管内で小胞体の網目状構造を安定に再構成・定量することに成功し、タイムラプス観察も行うことができた。また、小胞体形成に関わる可溶性因子を生化学的手法により分画・同定した。この因子は単独でも網目形成を促進する機能をもつことが分かった。

研究成果の概要 (英文)：

The ER and Golgi are dynamic organelles that assemble and disassemble during the cell cycle. To elucidate the molecular mechanisms underlying these changes in organelle organization, I searched for novel factors that play a fundamental role in biogenesis and maintenance of the ER and Golgi, using live-imaging technique as a powerful tool. Using modified *in vitro* ER reformation assay technique and by biochemical approach, I identified a soluble factor sufficient for building and maintaining tubular ER lattice by itself.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官である小胞体(ER)とゴルジ体は細胞内の物質輸送において互いに密接に関連しながら重要な役割を果たしている。細胞内に網目状に広がる小胞体表面のリボ

ソームで合成されたタンパク質は小胞体のサブドメインであるER exit siteからCOPII小胞とよばれる輸送小胞にのってゴルジ体へと送り出され、ゴルジ体のシスからトランス槽へと通り抜ける間に段階的に修飾・選別

されてそれぞれの目的地へと運ばれていく。小胞体で作られ、ゴルジ体内を輸送されて分泌されたタンパク質は細胞や固体の恒常性の維持に極めて重要である。

小胞体やゴルジ体は細胞周期ごとに消失・形成をくりかえすダイナミックな細胞小器官であり、その形成・維持にはさまざまな因子がはたらいていると考えられるが、その機構に関しては明らかになっていないことが多い。

私は出芽酵母 *S. cerevisiae* のゴルジ体のライブイメージングを行うことにより、長年大きな論争となってきたゴルジ体形成の2つのモデル、「槽成熟モデル」と「小胞輸送モデル」のうち「槽成熟モデル」を支持する直接的なデータを示すことに成功し、この問題に決着をつけた。本研究では詳しいメカニズムの解明のため、イメージングを用いたさらなる解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究では小胞体・ゴルジ体のダイナミクスおよび分泌タンパク質の動態を、イメージングを中心とした手法により解析することを目的としている。

具体的には、以下の2つの研究を行う。

(1) 小胞体との関連を考慮しながら、ゴルジ体が *de novo* に形成されるメカニズムに迫りたい。小胞体とゴルジ体は機能的にも位置的にも密接に関係しており、ゴルジ体のシス槽は小胞体上の COPII 小胞形成の場である ER exit site の近傍に形成されるという報告もある。そこで、本研究ではライブイメージングの技術を応用し、小胞体～ゴルジ体の経路に焦点をあてゴルジ槽の形成を可視化していきたい。

(2) ゴルジ体内を輸送されるタンパク質とゴルジ体の槽成熟の同時可視化を試みる。イメージングに適したタンパク質の発現方法についても実験系を検討する。

3. 研究の方法

(1) 槽成熟モデルにおいて、ゴルジ体のシス槽は COPII 小胞どうしが融合して形成されると考えられている。シス槽の *de novo* 形成メカニズムについては多くの議論がされているが、特に

① COPII 小胞の融合とシス槽の構成要素のリクルートはどのタイミングで起こるのか
② ゴルジ体形成には足場となるような因子があるのか
という2点が注目されている。①に関しては最近の研究から、COPII 小胞のコートタンパ

ク質である Sec23p が膜融合の際の繫留にはたらく TRAPP1 complex と直接結合することが明らかになり、COPII 小胞同士または COPII とゴルジ体の融合が起きていることが示唆された。しかし、COPII 小胞とシス槽の *in vivo* でのダイナミクスはまだ全く分かっていない。②に関しては哺乳類でゴルジ体の層板形成や小胞の繫留にはたらく GRASP65 の酵母ホモログである Grh1p がシス槽に局在し、かつ COPII 小胞のコートタンパク質である Sec23/24p とも相互作用することが明らかになってきた。しかし、Grh1p の挙動についてもまだ知見は得られていない。これらのメカニズムを解明するためにも、本研究のライブイメージングの技術が強力なツールとなる。

そこでまず、Sec23p、Grh1p と蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成し、これまでに作成したシス槽のマーカーとの3次元連続観察を行って、これらが経時的にどのように共局在・消失するのかを調べる。GRASP65 との相同性から、Grh1p がゴルジ体のマトリックスとして機能して COPII 小胞をリクルートし、さらにそこにシス槽の構成要素がリサイクルされてくるのではないかと予想される。

(2) これらの因子の機能を詳しく解析するため、温度感受性の変異株によりシス槽の構成要素のリサイクリングを阻害し、挙動を追跡する。温度を変化させた直後の観察では対物レンズなどの影響でフォーカスのずれが予想されるため、細胞をアガロースに埋め込んで観察する等プレパレーションの工夫が必要となる。

4. 研究成果

当初の計画では、ゴルジ体内のタンパク質輸送に重点を置いて研究を行う予定であったが、研究の過程において、タンパク質輸送の出発点である小胞体のダイナミクスに重要な因子を複数発見するに至った。

(1) 小胞体の試験管内再構成の確立

アフリカツメガエル卵より分画し、蛍光標識したマイクロソームと、ラットの肝臓より分画したサイトゾルを用い、カバーガラスで作成したチャンバー内に網目状の小胞体を再現性よく再構成することに成功した。これまでの小胞体の再構成系はアフリカツメガエルのマイクロソームとサイトゾルを用いたものが一般的であり、哺乳類のサイトゾルを用いて研究を行った例はまだない。私は温度、イオン強度などの条件を工夫することにより、ラット肝臓由来のサイトゾルでも *in vitro* で安定に網目の再構成を行うことができる条件を確立した。

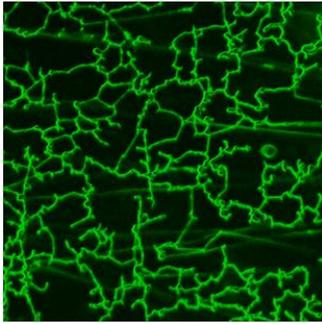


図1 カバーガラス上で再構成した小胞体

この結果を応用することにより、ゲノムプロジェクトの完了していないアフリカツメガエルでは不可能であった、サイトゾルから小胞体の形成に必要な可溶性因子を同定するという実験を行うことが可能になった。

(2) 小胞体形成に必要な可溶性因子の同定

ラット肝臓のサイトゾルを生化学的に分離し、*in vitro*再構成系で網目状構造の形成能の検証を行うことにより、小胞体の形成に必要な因子の同定を試みた。因子の最終的な同定には質量分析(Mass Spectrometry)を用いた。

その結果、小胞体の形成には少なくとも3つの可溶性因子が重要な役割を果たしている可能性が示され、このうち1つの因子を同定することができた(p86)。これらの因子が単独で網目状構造の形成に働いているのか、それとも協調して機能しているのかを調べるため、大腸菌内で発現させたリコンビナントタンパク質を用いて、そのメカニズムに迫ろうと考えた。

(3) 小胞体形成に必要な因子の発現と精製

(2)で同定した因子をcDNAライブラリーからクローニングし、大腸菌内での発現と精製を行った。精製したリコンビナントタンパク質を*in vitro*再構成系に加えると、網目状の構造が作られることが分かった。この因子のうち、86kDaのタンパク質(p86)は単独でも網目構造形成を促進したことから、小胞体の形成に非常に重要な役割を持つと予想される。

(4) 小胞体再構成系のリアルタイムイメージング

蛍光標識したマイクロソームを用いることで、小胞体の網目状構造が形成される様子を顕微鏡下でライブイメージングすることが可能になった。タイムラプス観察により、カバーガラス上でマイクロソームから網目状のネットワークが構築されていく様子を世界で初めて可視化することに成功した。

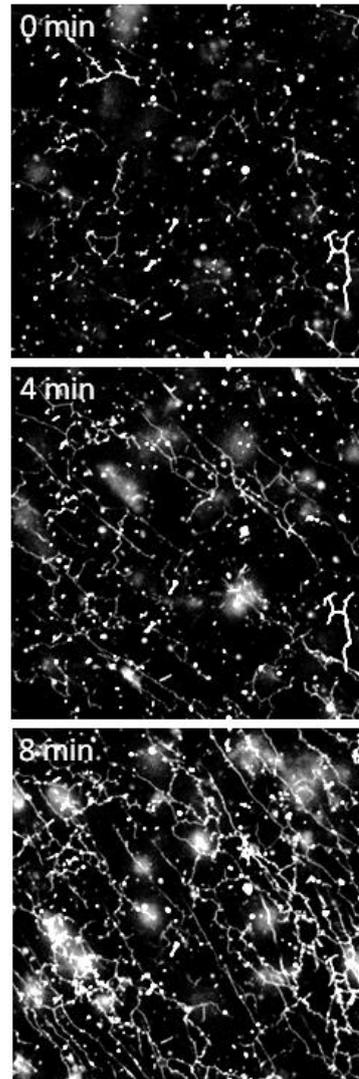


図2 小胞体再構成のタイムラプス観察

本研究で行った小胞体の再構成系の構築や可溶性の促進因子の同定は独創的なアプローチの研究であり、この分野の研究に与えるインパクトは大きい。また、イメージング技術を活かした小胞体再構成のカバーガラス上でのリアルタイムイメージングは世界的にも類を見ない重要な知見である。

今後は小胞体形成の分子メカニズムに迫ることにより、さらに画期的な結果が得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(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0件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Kumi Matsuura-Tokita, Kaori Tamura,
Go Totsukawa, Hisao Kondo

P97 ATPase-mediated ER and Golgi membrane
fusion

第 3 回 タンパク質の社会に関する国際会
議 (The 3rd International Symposium on
Protein Community), 2010.9

(2) Yayoi Kaneko, Go Totsukawa, Kumi
Matsuura-Tokita, Hisao Kondo

P97 ATPase-mediated biogenesis of the ER
and Golgi (p97ATPase による小胞体・ゴルジ
体の形成維持機構),

第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.06.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

時田 公美 (松浦公美) (TOKITA KUMI)

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員

研究者番号 : 50415296

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし