

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月15日現在

可視化による膜交通の分子機構の解明と植物高次システムへの展開

Understanding of Molecular Mechanisms of Membrane Traffic
by Live Imaging and Its Extension to Plant Higher Systems

課題番号：25221103

中野 明彦 (NAKANO AKIHIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

生きた細胞内の膜交通を最先端のライブイメージングで観察し、タンパク質選別のメカニズムを解明するとともに、植物における生理的意義に迫る。自ら開発した超解像ライブイメージング顕微鏡 SCLIM を駆使し、小胞体-ゴルジ体間輸送の新しいメカニズムを発見し、ダイナミックに変化するトランスゴルジ網の機能を解明するなど、重要な成果を得た。

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ形成・動態、膜交通

1. 研究開始当初の背景

膜交通は、細胞内のさまざまなオルガネラの間で、小胞の出芽、繫留・融合などを通じてタンパク質の選別輸送を行う過程である。その分子機構について、重要な未解明の問題に加え、最近の研究の進展によってさらに新たな謎が次々に生まれ、解決が待たれていた。

2. 研究の目的

研究代表者が自ら開発した超解像ライブイメージング顕微鏡を駆使し、生きた細胞の中で起こっている現象を精密に観察し、定量し、操作する方法論を推進する。優れた実験系である出芽酵母を用いた研究に加え、植物の形態形成や環境応答反応において重要な役割を果たす膜交通の意義を理解する。

3. 研究の方法

膜交通の選別分子機構の解明については、主に酵母を材料に用い、超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡 (SCLIM) をさらに高性能化し、これを駆使して、未解決の多くの謎を解決していく。また、植物における膜交通に関しては、植物を用いる利点（ゴルジ体の独立性と明瞭な層板構造、ポストゴルジ交通網の分業化など）を大いに生かすとともに、膜交通が組織レベル、個体レベルでの高次機能で果たす生理的な意義に結びつける研究を、シロイヌナズナやタバコを材料にして進める。

1) 膜交通の可視化による選別分子機構の解明：主に酵母を材料に用い、開発した超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡 (SCLIM)

をさらに高性能化し、これを駆使して次のような研究を進める。

- (i) ゴルジ体槽成熟の分子機構
- (ii) 小胞体からゴルジ体を形成する分子機構
- (iii) ポストゴルジ交通網
- (iv) 共焦点レーザー顕微鏡の改良開発

2) 植物における膜交通の研究：植物の利点を生かしたメカニズム研究を進めると同時に、膜交通が組織、個体レベルでの高次機能で果たす役割を理解する。

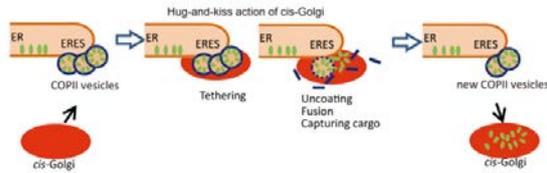
- (i) Rab5 GTPase をツールとした植物膜交通研究
- (ii) 植物のゴルジ体と TGN が担う膜交通の制御
- (iii) 細胞極性形成と維持

4. これまでの成果

特筆すべき成果を3つ挙げる。

1) 小胞体—ゴルジ体間輸送の新しいメカニズムを発見

細胞内のオルガネラ間輸送は小胞を介して行われるとされ、たとえば小胞体からゴルジ体への輸送では、小胞体から形成された COPII 小胞が細胞質中を漂って行ってやがてゴルジ体に到達する、と考えられていた。我々は、酵母ゴルジ体の SCLIM 観察により、ゴルジ体 *cis* 槽が小胞体の COPII 形成部位 (ER exit site; ERES) に近づいて行って接触し、そこで COPII 小胞に詰め込まれた積荷タンパク質を直接手渡しで受け取ることを明らかにした (Kurokawa *et al.* 2014)。



ER exit siteに *cis*-Golgi が接触し、積荷を受け取って離れる“Hug-and-kiss” action

2) トランスゴルジ網の機能とダイナミクス

SCLIM による詳細なライブイメージングにより、シロイヌナズナでは、発生過程の組織分化が進むにつれ、ゴルジ体とは独立に挙動する TGN が増えていることを発見し、また非常にダイナミックにゴルジ体との接触と脱離を繰り返すことを明らかにした (Uemura *et al.* 2013)。また TGN は、分泌経路、液胞経路、エンドサイトーシス経路の全てが交わる交差点でもあるが、分泌方向に向かうクラスリン被覆小胞を形成するアダプター複合体 AP-1 と液胞方向に向かうクラスリン被覆小胞を形成するアダプター複合体 AP-4 は、同一のゴルジ体に隣接する TGN の中で分離したドメインを形成し、それが分かれて小胞形成に向かうことを観察した。病原体応答における役割を解析中である。

3) 超解像ライブイメージング顕微鏡 SCLIM の性能大革新

光増感システムの背景光を下げる技術とデバイスの進歩により、感度と撮像速度が劇的に向上した新型機の稼働に成功した。SCLIM-II と名付けたこの新型機では、生細胞中の蛍光タンパク質が発した蛍光シグナルを単一光子レベルで検出できる。

5. 今後の計画

超解像ライブイメージング顕微鏡の次世代型機 SCLIM-II の活用が大きなブレークスルーとなる。1つ1つの小胞の挙動が明らかになれば、これまで静的な電顕像で推定していたモデルを検証し、曖昧なベールに包まれていた小胞の役割を徹底的に調べていくことができる。残る期間2年間で可能な限り謎の解明に挑み、さらにその次の目標を設定していきたい。

6. これまでの発表論文等

【主な原著論文】

K. Ebine, T. Inoue, J. Ito, E. Ito, T. Uemura, T. Goh, H. Abe, K. Sato, A. Nakano, and *T. Ueda (2014). Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr. Biol.* **24**:1375-1382.

*K. Kurokawa, M. Okamoto, and A. Nakano (2014). Contact of *cis*-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat. Commun.* **5**:3653.

*T. Uemura, Y. Suda, T. Ueda, and A. Nakano (2014). Dynamic behavior of the *trans*-Golgi network in root tissues of Arabidopsis revealed by super-resolution live imaging. *Plant Cell Physiol.* **55**:694-670.

*Y. Suda, K. Kurokawa, R. Hirata, and A. Nakano (2013). Rab GAP cascade regulates dynamics of Ypt6 during the Golgi maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:18976-18981.

*M. Tominaga, A. Kimura, E. Yokota, T. Hamaguchi, T. Shimmen, K. Yamamoto, A. Nakano, and K. Ito (2013). Cytoplasmic streaming velocity as a plant size determinant. *Dev. Cell* **27**:345-352.

【主な総説】

Y. Ito, T. Uemura, and *A. Nakano (2014). Formation and maintenance of the plant Golgi apparatus. *Intl. Rev. Cell Mol. Biol.* **310**:221-287.

K. Kurokawa, M. Ishii, Y. Suda, A. Ichihara, and *A. Nakano (2013). Live cell visualization of Golgi membrane dynamics by super-resolution confocal live imaging microscopy. *Methods Cell Biol.* **118**:235-242.

【主な招待講演】

A. Nakano (2015). Super-resolution live imaging approach to understanding molecular mechanisms of membrane traffic. Commemorative Symposium for the 31st International Prize for Biology “New horizons in life science through advances in cell biology,” Kyoto, Japan, December 5.

A. Nakano (2015). Super-resolution live imaging approach to understanding ER-Golgi and intra-Golgi cargo transport. Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology. Andover, NH, USA, July 13.

A. Nakano and K. Kurokawa (2013). Live imaging of cargo delivery from the ER to the Golgi apparatus. Golgi Apparatus Symposium. Bad Ischl, Austria, September 17.

ホームページ等

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