

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221103

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) Understanding of Molecular Mechanisms of Membrane Traffic by Live Imaging and Its Extension to Plant Higher Systems

研究代表者

中野 明彦 (Nakano, Akihiko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：90142140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,100,000円

研究成果の概要(和文)：酵母と植物を材料に用い、高性能化した超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡(SCLIM)を駆使して、膜交通を可視化し、小胞体-ゴルジ体間、ゴルジ体内、ゴルジ体以降、およびエンドサイトーシスのさまざまな過程における選別輸送の分子機構を詳細に解析した。積荷の受け渡しを直接可視化することに成功し、従来信じられていたモデルを大きく覆す結果を得た。SCLIMについては、さらに劇的な性能向上に成功し、個々の小胞の空間ダイナミクスをリアルタイムに解析するスペックを達成した。膜交通が植物の高次機能に果たす役割についてもさまざまな解析を行い、トランスゴルジ網が病原菌応答に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By using yeast and plant cells as models and super-resolution confocal live imaging microscopy (SCLIM) as a powerful tool, we visualized membrane trafficking and analyzed molecular mechanisms of sorting during ER-to-Golgi, intra-Golgi, post-Golgi and endocytic transport steps. We succeeded in imaging cargo during transport and obtained amazing new results that overturn long-believed paradigms. SCLIM has achieved a massive progress in spatiotemporal resolutions and led to real-time and 3D analysis of individual vesicle dynamics. As for the functions of membrane traffic in plants, we have found that the trans-Golgi network plays a very important role in defense against pathogens.

研究分野：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(図1)。その分子機構について、重要な未解明の問題に加え、近年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。

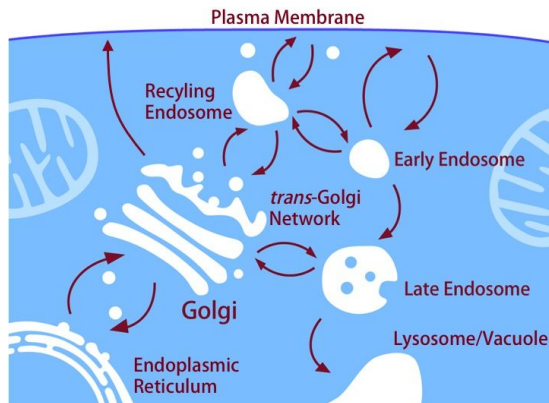


図1 細胞内膜交通

2. 研究の目的

本研究では、応募者等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ことを目的とした。

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、未解決の多くの謎の解決を目指した。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た。

4. 研究成果

(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、さらに高性能化した超解像共焦点ライブイメージング顕微鏡(SCLIM)を駆使して次のような研究を進めた。

ゴルジ体槽成熟の分子機構

積荷マーカールと同時に小胞体、ゴルジ体マーカールを発現する株で、積荷タンパク質が分泌経路を進んでいく過程を詳細に調べ、輸送装置の変異体等を用いてそのメカニズムを探った。可視化マーカールを増やし、超解像4D

解析(高分解能3D+高速ライブ)による解析を進め、異なる槽間で積荷が受け渡されていることを可視化した。また、槽成熟に必要なゴルジ酵素の逆行輸送にはCOPIが必須であることを証明した。

小胞体からゴルジ体 cis 槽を形成する分子機構

小胞体のCOPII小胞出芽部位(ERES)とゴルジ体 cis 槽マーカールの hug & kiss アクションを詳細に解析した。cis 槽のERESへの接近と接触によって積荷を直接受け渡すことを証明し、これまで信じられてきた小胞の細胞質基質への放出ではなく、より安全かつ効率的な選別輸送が行われていることを明らかにした。また、COPII形成の鍵を握る Sar1 GTPase が、ERESの縁にのみ局在していることを示した。

ポストゴルジ交通網

トランスゴルジ網の可視化を進め、異なる因子が時空間的に異なるゾーンで機能することを明らかにした。時間的に前半と後半に分け、ゴルジ槽とエンドソームからの積荷の選別を行う時期を early TGN、被覆タンパク質およびアダプタータンパク質複合体の種類に応じて異なるキャリアに積み込む時期を late TGN と呼ぶことを検討中である。

共焦点レーザー顕微鏡の改良開発

次世代機 SCLIM2 で、高速超解像観察の実証実験をさらに進めた。増感装置の S/N 向上と増感率向上、カメラの高速化により、単一光子計測に成功した。またデコンボリューションアルゴリズムも改良し、直径 100 nm 以下の小胞のダイナミクスを 3 次元的にかつ実時間で、完全に追跡できるスペックを実現した。

(2) 植物における膜交通の研究

植物の利点を生かした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の理解を目指した。

Rab5 GTPase をツールとした植物膜交通の研究

2 種類の Rab5 の機能分担とクロストークを明らかにするために、それぞれの相互作用分子の解析を進めた。植物固有型 Rab5 である ARA6 のエフェクターとして同定された PUF2 が、保存型 Rab5 と協調して液胞輸送に関わっていることを明らかにした。

植物のゴルジ体とトランスゴルジ網(TGN)が担う膜交通の制御

ゴルジ体の層板構造の形成過程を調べるために、薬剤 BFA でゴルジ体を一旦小胞体に吸収させ、除去後の層板再生過程を SCLIM で詳細に解析した。ゴルジ体の最も cis 側の区画が、小胞体からゴルジ体に入るための重要かつ特別な役割を担っていることを明らかにし、Golgi entry core compartment (GECCO) と名づけた(図2)。また、タンパク質の選別輸送における TGN ゾーンの挙動を SCLIM で詳細に調べた。異なるアダプタータンパク質複合体 AP-1 と AP-4 が異なるゾーンに選別さ

れ、前者がクラスリン被覆と挙動を共にすることをライブイメージングにより明らかにした。また、TGN が病原菌応答に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

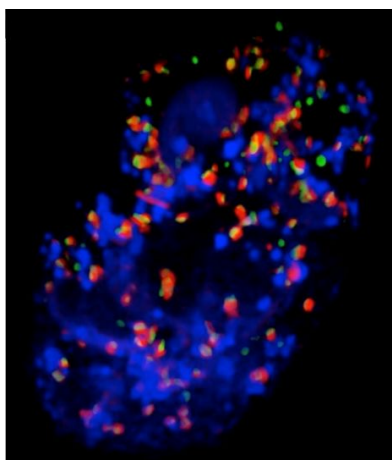


図2 SCLIM で撮影したゴルジ体の再形成

細胞極性形成と維持

シロイヌナズナに存在するミオシン XI とミオシン VIII の膜交通における役割について、ライブイメージングによる研究を進めた。とくにミオシン XI については、モータータンパク質としての高速化が植物の大型化につながることを示し、細胞内のオルガネラの流動が細胞伸張の制御につながる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 107 件)

E. Ito, K. Ebine, S.-W. Choi, T. Uemura, A. Nakano, and T. Ueda (2018). Integration of two RAB5 groups during endosomal transport in plants. *eLife* in press.

doi: 10.7554/eLife.34064

Y. Ito, T. Uemura, and A. Nakano (2018). Golgi Entry Core Compartment functions as the COPII-independent scaffold for ER-Golgi transport in plant cells. *J. Cell Sci.* **131**:jcs203893.

doi: 10.1242/jcs.203893

Y. Ito, K. Toyooka, M. Fujimoto, T. Ueda, T. Uemura, and A. Nakano (2017). The *trans*-Golgi network and the Golgi stacks behave independently during regeneration after Brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **58**:811-821.

doi: 10.1093/pcp/pcx028

M. Ishii, Y. Suda, K. Kurokawa, and A. Nakano (2016). COPI is essential for Golgi cisternal maturation and dynamics. *J. Cell Sci.* **129**:3251-3261.

doi: 10.1242/jcs.193367

K. Kurokawa, Y. Suda and A. Nakano (2016). Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes *in vivo*. *J. Cell Sci.* **129**:3231-3237.

doi: 10.1242/jcs.189423

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.

doi: 10.1038/ncomms4653

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.

doi: 10.1093/pcp/pcu010

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

doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00006-2

R. Hirata, C. Nihei, and A. Nakano (2013). Isoform-selective oligomer formation of *Saccharomyces cerevisiae* p24 family proteins. *J. Biol. Chem.* **288**:37057-37070.

doi: 10.1074/jbc.M113.518340

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.

doi: 10.1073/pnas.1308627110

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.

doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.005

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.

doi: 10.1016/B978-0-12-417164-0.00014-8

(以上すべて査読あり) [ほか 95 件]

[学会発表](計 188 件)

K. Kurokawa (2017). 4D imaging of cargo delivery in maturing Golgi cisternae in *S. cerevisiae*. Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology. Andover, NH, USA.

A. Nakano (2017). Development of high-speed live imaging microscopy with super-resolution: new horizons emerging in life sciences. RIKEN SAKURA Symposium 2017, Tsurumi, Japan.

A. Nakano (2016). Super-resolution live imaging approach to membrane trafficking. RIKEN QBiC Symposium 2016 "Decoding Organisms by Quantitative Cell Profiling," Osaka, Japan.

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.

A. Nakano (2015). Super-resolution confocal live imaging microscopy (SCLIM) as a tool to understand mechanisms of membrane trafficking. Symposium “Spatial Distribution of Cellular Processes,” 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguacu, Brazil.

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.

A. Nakano (2013). Cutting-edge live cell imaging to understand mechanisms of membrane traffic. UTokyo Forum “Systems Biology Across the Pacific: from Molecules to Ecosystems.” Santiago, Chile.

T. Uemura and A. Nakano (2013). Plant TGNs: dynamics and physiological functions. Golgi Apparatus Symposium. Bad Ischl, Austria.

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

(以上すべて招待講演) [ほか 179 件]

[図書](計 2 件)

中野明彦, 実験医学別冊「超解像イメージングができる!」, 羊土社, 2016, 257-262.

[ほか 1 件]

[産業財産権]

○出願状況(計 2 件)

名称: データ復元装置、蛍光顕微鏡システムおよびデータ復元方法

発明者: 宮代大輔、中野明彦

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/021420

出願年月日: 2017 年 6 月 9 日

国内外の別: 国外

名称: 成長が増強された形質転換植物及びその製造方法

発明者: 富永基樹、伊藤光二

権利者: 早稲田大学、千葉大学

種類: 特許

番号: 2018-007923

出願年月日: 2018 年 4 月 26 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 1 件)

名称: 対物レンズの駆動制御方法及び蛍光顕微鏡システム

発明者: 中野明彦、市原 昭

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: 6143098

取得年月日: 2017 年 5 月 19 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~hasseipl/japanese/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 明彦 (NAKANO, Akihiko)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 9 0 1 4 2 1 4 0

(2) 研究分担者

植村 知博 (UEMURA, Tomohiro)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 9 0 4 1 5 0 9 2

黒川 量雄 (KUROKAWA, Kazuo)

国立研究開発法人理化学研究所・

光量子工学研究領域・専任研究員

研究者番号: 4 0 3 3 3 5 0 4

上田 貴志 (UEDA, Takashi)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・教授

研究者番号: 1 0 3 1 1 3 3 3

須田 恭之 (SUDA, Yasuyuki)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 1 0 5 5 3 8 4 4

富永 基樹 (TOMONAGA, Motoki)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・

准教授

研究者番号: 5 0 4 1 9 8 9 2