

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06566

研究課題名(和文) リサイクリングエンドソームとゴルジ体の接着・分離の分子機構

研究課題名(英文) Mechanism of repetitive attachment of RE to TGN

研究代表者

佐藤 卓至 (Sato, Takunori)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・研究員

研究者番号：00596934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質を選別して適切な細胞膜ドメインへと送る極性輸送は、真核生物の複雑な細胞構造を保つ基盤である。

申請者らは、膜タンパク質選別の中核であるトランスゴルジ網(TGN)とリサイクリングエンドソーム(RE)が接触と分離を繰り返していることを見出していた。本研究ではTGNとREの境界に局在するARFGEFに着目し、ゲノム編集と薬剤投与によりTGNからの選別輸送を可逆的に停止する実験系を開発した。この実験系でARFGEFの活性化阻害を解除すると、全方向への選別輸送が急速に回復し、一部の積荷タンパク質が速やかにTGNからREへと受渡される様子が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多種の疾患の原因として細胞内輸送の異常が同定されており、細胞内輸送のネットワークを分子レベルで明らかにすることは診断・予防・創薬の為に重要である。本研究では、トランスゴルジ網-リサイクリングエンドソーム間の輸送についてこれまで知られていなかった新たな経路を明らかにするとともに、その薬理的制御を可能にした。これにより細胞内輸送経路に関わる分子の探索が容易になり、新たな創薬ターゲットの発見につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Polarized transport of integral membrane proteins is an indispensable basis of highly developed structure of eukaryotic tissue. We have reported the two centers of protein sorting, trans-golgi-network (TGN) and recycling end-some (RE), are repetitively interacting. In this work, by the combination of genome-editing and pharmacology, we developed a system to regulate TGN-RE interaction, quickly and reversibly. In response to the removal of inhibitors, post-TGN transport to multiple directions was immediately restarted.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜交通 低分子量Gタンパク質 ゴルジ体

### 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は小胞体で生合成されたタンパク質(積荷)を受け取り修飾した後、積荷を選別し様々な細胞小器官や細胞膜へ輸送する。その最小単位をゴルジ層板という。リサイクリングエンドソーム(RE)は、エンドサイトーシスされた物質を細胞膜へ戻す役割を持つ。申請者らは、微小管破壊した哺乳類細胞とショウジョウバエ細胞/組織の両方で、ゴルジ層板のトランス側にリサイクリングエンドソームが付着していることを見出した(図1)。さらに理化学研究所の高速超解像度共焦点レーザー顕微鏡(SCLIM)を用いたライブイメージングにより、リサイクリングエンドソームから付着しているゴルジ層板へチューブ構造が微小管非依存的に伸長/縮退する様子や、このゴルジ層板に付着しているリサイクリングエンドソームが、ゴルジ層板から離れて、別のゴルジ層板や他のリサイクリングエンドソームに付着する様子が観察された。またリサイクリングエンドソーム同士は接着と分離を繰り返していたが、ゴルジ層板同士が接着することは稀だった。

膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体膜上で合成された後、ゴルジ体で修飾を受け、トランスゴルジ網(TGN)に到達する。TGNは選別の中枢であり、様々な細胞膜ドメインやオルガネラへ輸送されるポストゴルジ小胞が形成され、選別されたタンパク質が積み込まれて輸送される。これらTGNから細胞膜ドメインへの特異的輸送を極性輸送と呼ぶが、この極性輸送の分子機構については知見が乏しい。極性輸送は生命機能の維持には不可欠であり、その破綻は微絨毛封入体病・多発性嚢胞腎・網膜変性症など様々な疾患を引き起こす。極性輸送の分子機構解明は、細胞生物学の基本的命題であるとともに、極性輸送欠損が引き起こす疾患についての治療法の開発に繋がること期待される。

代表者らはTGNから細胞膜に直接輸送される経路に加えて、TGNからリサイクリングエンドソーム(RE)を経て細胞膜に至る輸送経路も存在することが見出した。また、TGNとREが反復的に相互作用していることを見出し報告した。これらの結果から、REがTGNと相互作用する際に積荷が受け渡され、REが特異的な輸送キャリアとして働いていると考えられた。

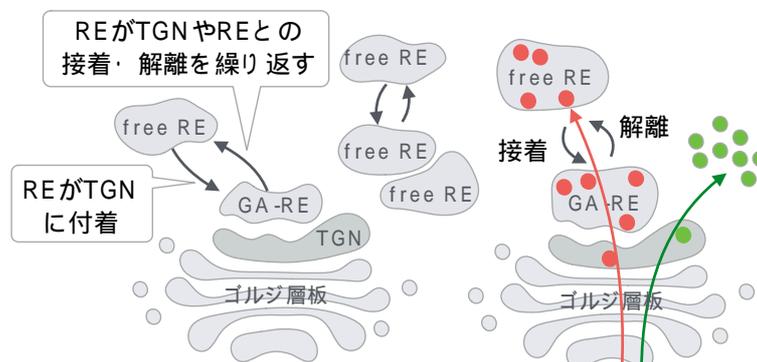


図1. TGNとREの接着と解離

### 2. 研究の目的

代表者らは、ゲノム編集と薬剤投与を組み合わせることにより、TGNとREの反復的な相互作用を可逆的に停止して安定な接着状態を作り出す実験系を考案した。本研究ではこの実験系を実証し、TGN/RE相互作用と選別輸送の関係を明らかにする。さらにそれを通じて、極性輸送の分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

**ゴルジ層板からREへの積荷タンパク質輸送の観察:** ゴルジ層板とREの接着が積荷タンパク質のゴルジ層板からREへの移動と時空間的に関連していることを示すため、i)同調輸送させた積荷タンパク質とゴルジ層板/REを同時に可視化して、ii)ライブイメージングを行う。

i) **同調輸送:** 申請者らはゴルジ層板とREを蛍光タンパク質でラベルしたHeLa細胞の安定株を作成しSCLIM観察を行っているが、この細胞でRUSH system(Boncompain et. al., 2012 Nature Methods)による積荷タンパク質の同調輸送を行う。

ii) **ライブイメージング:** 代表者の所属研究科に導入された共焦点レーザー顕微鏡は、BFP, GFP, RFP, iRFP713の4色まで同時観察できる。同調輸送させた積荷タンパク質とゴルジ層板・REのマーカについて、同時ライブイメージングを行う。また、より詳細な観察を必要とすると考えられたタンパク質セットについて、理化学研究所中野明彦研究室との共同研究により、同研究室の高速・超解像度共焦点レーザー顕微鏡であるSCLIMを用いた観察を行う。

#### APEX2融合タンパク質を用いた電子顕微鏡レベルでのタンパク質局在解析

APEX2は強力な固定処理を施しても酵素活性を保つペルオキシターゼであり、膜構造を通常の電子顕微鏡観察レベルに保持した状態でDABポリマーを生成させ、融合タンパク質の局在解析が出来る。ゴルジ嚢やREのマーカや積荷タンパク質などにAPEX2を融合させ、その局在を電子顕微鏡レベルで明らかにする。また、細胞内膜の内腔側・細胞質側にそれぞれ融合したAPEX2は、はっきりと異なる染色を示すので、2つのマーカの局在を同時に観察することができる。

### 4. 研究成果

## TGN・REの反復的な相互作用を可逆的に停止する実験系

細胞内輸送に最もよく使われている HeLa 細胞に対してゲノム編集を行い、薬剤で TGN/RE の解離を特異的に阻害できる HeLa 細胞の作成・クローン化に成功した。この細胞株において、薬剤投与により可逆的に TGN と RE の解離を阻害できることを確認した。ライブイメージング下で薬剤を急速投与・急速除去すると、確かに RE と TGN の接着・解離状態が変化した。また、焦点レーザー顕微鏡および SCLIM により、この可逆的な操作において様々なマーカーが、どのように局在変化するか解析した。その結果、一部の水溶性 TGN マーカーの拡散・再結合は、接着状態の変化よりも急速で、薬剤投与・除去に反応して数秒で変化していた。

## TGN・REの接着固定状態における輸送阻害

さらにこの細胞で接着固定状態を制御しながら RUSH 法による同調輸送を試みた。接着固定状態を維持しながら積荷輸送を開始させた場合でも、TGN までの積荷輸送には大きな影響は見られず、ER からゴルジ体への順行性輸送は正常であると考えられた。一方、接着固定状態では調べた全ての積荷タンパク質が TGN に蓄積し、そこからの搬出は著しく遅延していた。タンパク質合成の阻害と合わせると、TGN にのみ積荷が蓄積した状態を作り出すことができた。共焦点レーザー顕微鏡および SCLIM による観察で、この輸送停止状態のゴルジ体は正常であった。

上記の TGN における積荷蓄積状態から、薬剤の除去により TGN・RE の解離を再開させると、TGN からの積荷の搬出は急速に回復した。このとき調べた全て積荷の輸送が速やかに回復し、正常に細胞膜まで輸送された。とくに、TGN から RE を経由して輸送される積荷に関して SCLIM による高速ライブイメージングを行ったところ、薬剤除去後数十秒で積荷の RE への搬出が始まり、RE に移動した積荷は速やかに RE 内を移動して行くことがわかった。

また、この薬剤が輸送を阻害する際のターゲットの候補遺伝子をそれぞれ薬剤耐性に改変するゲノム編集を行ったところ、2つの候補遺伝子を共にゲノム編集した場合には輸送と TGN/RE 接着にたいする薬剤の効果が完全に失われた。したがって、この薬剤が TGN・RE の解離と積荷の TGN からの搬出を阻害する際のターゲット遺伝子が確定した。これらの実験により、TGN/RE 境界における選別輸送の停止・再開実験系が確立された。

## TGN・REの接着固定状態に関わる Rab タンパク質の解析

上記の TGN/RE 境界領域と Rab タンパク質の関係を明らかにするため、TGN と RE にそれぞれ特徴的な Rab タンパク質である Rab6/Rab11 について、Degron システムによるコンディショナル KO 細胞を作成した。これらの KO 細胞で 5 Ad-IAA の投与によって Rab11/Rab6 が急速に失われることを確認した。また予想されるように、その表現型は恒常的 KO 細胞のそれとは異なっていた。現在は、これらコンディショナル KO 細胞での輸送阻害効果の変化を、KO 後の時間を追って解析している。

## APEX2 融合タンパク質を用いた電子顕微鏡レベルでのタンパク質局在解析

接着固定/輸送停止状態のオルガネラ構造を理解するため、積荷タンパク質および各種マーカータンパク質に APEX2 を融合して発現させた。この細胞を、通常の状態・接着固定/輸送停止状態・薬剤除去により輸送再開直後、の各条件で固定し、微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。さらに同様のサンプルについて、理化学研究所豊岡公則博士との共同研究によりアレイトモグラフィ走査型顕微鏡による 3D 解析を行った。

輸送停止状態の積荷タンパク質はゴルジ体とそれに付着した RE の間にある膜構造に蓄積しており、その場は薬剤により安定化したトランスゴルジ網であると考えられた。その形状は正常状態の TGN よりも肥大しており、特徴的な膜の構造が見られた。

さらに RE マーカーとの 2重 APEX2 染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。薬剤投与と下で固定した輸送停止状態では、本来は RE を経由して輸送される積荷タンパク質についても RE 膜へは移行せず、隣接した TGN 膜に留まっていた。これは光学顕微鏡で観察された結果と一致しており、積荷タンパク質が蓄積する膜構造を、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で同定することができた。現在は、この状態の膜構造の更に詳細な解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ochi Yuka, Yamashita Hitomi, Yamada Yumi, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.  | 4. 巻<br>33            |
| 2. 論文標題<br>Stratum is required for both apical and basolateral transport through stable expression of Rab10 and Rab35 in <i>Drosophila</i> photoreceptors | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Biology of the Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>online  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1091/mbc.E21-12-0596  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Fujii Syara, Kurokawa Kazuo, Tago Tatsuya, Inaba Ryota, Takiguchi Arata, Nakano Akihiko, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.                         | 4. 巻<br>133           |
| 2. 論文標題<br>Sec71 separates Golgi stacks in <i>Drosophila</i> S2 cells   | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science   | 6. 最初と最後の頁<br>online  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1242/jcs.245571   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Nakamura Yuri, Ochi Yuka, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.  | 4. 巻<br>133           |
| 2. 論文標題<br>Rab10, Crag and Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase in <i>Drosophila</i> photoreceptors          | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science   | 6. 最初と最後の頁<br>online  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1242/jcs.238790   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Fujii Syara, Tago Tatsuya, Sakamoto Naoaki, Yamamoto Takashi, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.  | 4. 巻<br>13            |
| 2. 論文標題<br>Recycling endosomes associate with Golgi stacks in sea urchin embryos  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Communicative & Integrative Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>59 ~ 62 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/19420889.2020.1761069  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Yuri, Ochi Yuka, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.  | 4. 巻<br>133     |
| 2. 論文標題<br>Rab10, Crag and Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na+K+ATPase in Drosophila photoreceptors | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/jcs.238790  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Fujii Syara, Kurokawa Kazuo, Inaba Ryota, Hiramatsu Naoki, Tago Tatsuya, Nakamura Yuri, Nakano Akihiko, Satoh Takunori, Satoh Akiko K. | 4. 巻<br>133     |
| 2. 論文標題<br>Recycling endosomes attach to the trans-side of Golgi stacks in Drosophila and mammalian cells  | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/jcs.236935   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ogi Sakiko, Matsuda Atsushi, Otsuka Yuna, Liu Ziguang, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.           | 4. 巻<br>146     |
| 2. 論文標題<br>Syndapin constricts microvillar necks to form a united rhabdomere in Drosophila photoreceptors | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Development   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/dev.169292  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Otsuka Yuna, Satoh Takunori, Nakayama Nozomi, Inaba Ryota, Yamashita Hitomi, Satoh Akiko K. | 4. 巻<br>132     |
| 2. 論文標題<br>Parcas is the predominant Rab11-GEF for rhodopsin transport in Drosophila photoreceptors   | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/jcs.231431  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>多胡辰哉、小川巧、佐藤卓至、佐藤明子                   |
| 2. 発表標題<br>新規輸送開始法 RudLOV の開発とdynamore の新規作用の発見 |
| 3. 学会等名<br>オルガネラ疾患研究拠点                          |
| 4. 発表年<br>2023年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>瀧口新、Shek Ho Tung, 佐々木捷梧, 佐藤卓至、佐藤明子 |
| 2. 発表標題<br>オルガネラ接着とポストゴルジ輸送の可逆的制御システムの開発      |
| 3. 学会等名<br>オルガネラ疾患研究拠点                        |
| 4. 発表年<br>2023年                               |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>多胡辰哉、佐藤卓至、佐藤明子        |
| 2. 発表標題<br>薬剤によるシス槽特異的なゴルジ槽成熟の阻害 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会 名古屋            |
| 4. 発表年<br>2022年                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>多胡辰哉、小川巧、佐藤卓至、佐藤明子                        |
| 2. 発表標題<br>新規光同調輸送開始法 RudLOV 法による dynamore の新たな作用の観察 |
| 3. 学会等名<br>日本細胞生物学会 東京                               |
| 4. 発表年<br>2022年                                      |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>瀧口新、佐藤卓至、佐藤明子         |
| 2. 発表標題<br>ポストゴルジ輸送におけるGARP機能の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本細胞生物学会 東京           |
| 4. 発表年<br>2022年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>多胡辰哉、小川巧、佐藤卓至、佐藤明子                 |
| 2. 発表標題<br>シヨウジョウバエ視細胞を用いた極性輸送におけるARFRP1の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会                             |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山下愛美・佐藤卓至・佐藤明子         |
| 2. 発表標題<br>GARP欠損による順行性輸送の分子機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                   |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>瀧口新、佐藤卓至、佐藤明子          |
| 2. 発表標題<br>GARP欠損による順行性輸送の分子機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山下愛美・越智優果・佐藤卓至・佐藤明子      |
| 2. 発表標題<br>ショウジョウバエ視細胞におけるnSybの機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本細胞生物学会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤井しゃら・佐藤卓至・黒川量雄・白江麻貴・植木龍也・トリ-クストノ-アジ・稲葉諒多、佐藤明子 |
| 2. 発表標題<br>多様な生物種におけるゴルジ体とREの関係性                          |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>越智優果・中村祐里・佐藤卓至・佐藤明子                                 |
| 2. 発表標題<br>ショウジョウバエ視細胞において Crag/Rab10/Ehbp1は 側底面膜方向への極性輸送を制御する |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤井しゃら・黒川量雄・佐藤卓至・稲葉諒多・佐藤明子 |
| 2. 発表標題<br>ゴルジ層板の分散と凝集のメカニズムの解析      |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤井しゃら・佐藤卓至・黒川量雄・中野明彦・佐藤明子                            |
| 2. 発表標題<br>リサイクリングエンドソームはゴルジ層板のトランス側に付着し、生合成された膜タンパク質の選別に関わっている |
| 3. 学会等名<br><異分野融合による次世代光生物学>研究会(招待講演)                           |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山下愛美・中山望美・佐藤卓至・佐藤明子                        |
| 2. 発表標題<br>APEX2を用いた電子顕微鏡レベルでの局在解析法のショウジョウバエ視細胞研究への導入 |
| 3. 学会等名<br>中国四国動物生理シンポジウム                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤井しゃら・佐藤卓至・佐藤明子                |
| 2. 発表標題<br>ゴルジ体とリサイクリングエンドソームの相互作用による極性輸送 |
| 3. 学会等名<br>中国四国動物生理シンポジウム                 |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>瀧口新・藤井しゃら・佐藤卓至・佐藤明子     |
| 2. 発表標題<br>SBF-SEM を用いたゴルジ体の集合性の解析 |
| 3. 学会等名<br>中国四国動物生理シンポジウム          |
| 4. 発表年<br>2019年                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|