

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06650

研究課題名（和文）ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を正確かつ効率的に達成する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism for accurately and efficiently retrograde cargo transport from the Golgi to the ER

研究代表者

黒川 量雄（Kurokawa, Kazuo）

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・専任研究員

研究者番号：40333504

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）：本研究課題では、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送機構の解明を目指し、積荷受容体 Emp24とゴルジ体シス槽、ERESの多色同時4Dライブイメージング解析をおこなった。Emp24は、ゴルジ体シス槽がERESに接触している間に、速やかにシス槽へ順行輸送された。Emp24は、その後、シス槽からERESへと速やかに逆行輸送され、ゴルジ体シス槽がERESに接触する間（ハグアンドキスアクション）に、積荷受容体の順行と逆行の両輸送が達成されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、生きた細胞内の複数の分子の4D動態を捉える多色同時高時空間分解能4Dイメージングと出芽酵母の自由度の高い遺伝学とを組み合わせた研究手法を進めることで、膜交通の新たなモデルを提案する結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of retrograde transport from the Golgi to the ER, I performed simultaneous multicolor 4D live imaging analysis of the cargo receptor Emp24, cis-Golgi, and ERES. Emp24 showed quick anterograde transport to cis-Golgi during the contact between cis-Golgi and the ERES. During this contact, Emp24 was then retrogradely transported to the ERES. It was shown that both anterograde and retrograde transport of the cargo receptor is achieved during the contact of cis-Golgi with the ERES (hug-and-kiss action).

研究分野：膜交通（小胞輸送）

キーワード：ゴルジ体 4Dライブイメージング 小胞体 積荷受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の生命機能の維持と発揮には、多種多様なタンパク質がそれぞれ固有の場所に適切な量輸送されて機能することが必須である。酵母からヒトに至る全ての真核生物の膜オルガネラ間を結ぶ輸送過程は、しばしば小胞を介することから小胞輸送とも呼ばれる膜交通機構が担っており、積荷となるタンパク質を正確に選別し、それぞれの目的地へと輸送する。この機構は、細胞の生命活動に必須であるとともに、組織・器官形成や環境応答に至るさまざまな高次生命機能をも支える重要な過程である。そのため、正確かつ効率的に選別輸送を達成するには、新たに合成された積荷を目的地へと順行輸送する機構とともに、誤って運ばれた積荷や、ゴルジ体で働く酵素を絶えず本来働くべき場所へと戻す逆行輸送も重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、その詳細な分子機構、時空間的な制御はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を真核生物のモデル生物として、小胞体-ゴルジ体間で順行・逆行輸送を制御している積荷受容体に焦点を当て、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を正確かつ効率的に達成する機構の解明を目指して研究を進めてきた。ゴルジ体から小胞体、ゴルジ体槽間の逆行輸送は、COPI小胞が担っていることがこれまでに明らかにされてきた。では、COPI小胞によりどのようにして積荷タンパク質の逆行輸送が達成されるのであろうか。ゴルジ体を遊離したCOPI小胞が細胞内を無作為に漂って、小胞体やゴルジ体の各槽に辿り着くのか？それとも順行輸送が行われた際に、それと同時に他の分子の逆行輸送が行われるのか？そこで、研究代表者がこれまで推進してきた多色高時空間分解能4次元(4D)ライブイメージングと出芽酵母の分子機能変異株の利用を組み合わせたアプローチで、逆行輸送の時空間制御機構の解明に取り組んできた。

小胞体からゴルジ体へ積荷タンパク質を輸送する積荷受容体Emp24は、積荷と複合体を形成し、積荷をゴルジ体へと輸送した後に積荷から離れ、積荷をゴルジ体へ残したまま自身は小胞体へと逆行輸送される。一方、ゴルジ体に局在する積荷受容体Rer1は、誤ってゴルジ体へと輸送されてしまった小胞体局在タンパク質などを小胞体へと逆行輸送するのに関わっている。そこで、蛍光タンパク質で標識したこれら積荷受容体の高時空間分解3D、4Dライブイメージング解析と出芽酵母のCOPI機能変異株などを組み合わせ、小胞体-ゴルジ体間の逆行輸送の分子機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究課題では、小胞体-ゴルジ体間の逆行輸送の時空間制御機構を明らかにする。そのために、小胞体-ゴルジ体間で働く積荷受容体に焦点を当て、生きた細胞内の複数の分子の4D動態を捉える多色同時高時空間分解能4Dイメージングによる可視化と出芽酵母の自由度の高い遺伝学とを組み合わせ、他にまねのできないアプローチで研究を進めてきた。

このアプローチのためには、多色蛍光シグナルの同時取得と高い時空間分解能の達成を両立する4Dライブセルイメージングに特化した顕微鏡システムが必要である。そのシステムが、高速で共焦点画像を取得できるスピニングディスク式共焦点スキャナ、複数種の蛍光分子の同時励起を可能にする多色励起レーザー、多色蛍光の分光装置、3次元画像の高速取得を可能にする対物レンズのZ軸駆動システム、得られた画像から相対的に高解像度成分(高空間周波数成分)を増強するためのデコンボリューションによる画像処理を組み合わせたシステム

からなる SCLIM (参考文献 1)である。

膜交通で働く分子とその機構は出芽酵母からヒトに至るまで良く保存されている。また出芽酵母は、多数の変異株が利用可能であり、分子機構解析に非常に有用なモデル生物である。ライブイメージングによる研究はともすると‘見ただけ’と判断される。またその真の意義の解明が困難な場合も多いが、出芽酵母変異株と SCLIM での 4D イメージングの組み合わせは、‘見ただけ’を乗り越え、分子機能と細胞内で実際に起きている現象とを完全に関連付けることが可能な研究方法である。

4 . 研究成果

小胞体で新たに合成された積荷タンパク質は、ゴルジ体シス槽が小胞体上の COPII 小胞が集積する ER Exit Sites (ERES) に接近・接触することでシス槽へと輸送される(参考文献 2)。小胞体からゴルジ体へ積荷タンパク質を輸送する積荷受容体 Emp24 は定常状態ではそのほとんどが小胞体に局在する。したがって、Emp24 は、ゴルジ体シス槽が ERES に接触して積荷タンパク質が小胞体からゴルジ体へと輸送された後、積荷を下ろし、自身は速やかにシス槽から小胞体へと COPI 小胞により逆行輸送される。一方、ゴルジ体から小胞体へ積荷タンパク質を逆行輸送する積荷受容体 Rer1 は、定常状態ではゴルジ体に局在することから、誤ってゴルジ体へと輸送されてしまった小胞体局在タンパク質などを常に小胞体へと逆行輸送していると考えられる。このように常に積荷受容体が逆行輸送されることで正確な輸送の達成が維持されていると推測される。そこで、積荷受容体と ERES、ゴルジ体シス槽の 3 者を異なる蛍光タンパク質で標識し、その 4D 動態を可視化し解析することで逆行輸送の時空間制御を明らかにすることを旨とし、研究を進めてきた。

- (1) ゴルジ体シス槽マーカー Mnn9-mCherry、ER exit sites(ERES) マーカー Sec13-iRFP、積荷受容体 Emp24-GFP または Rer1-GFP を発現する株を作成した。この株を用いて積荷受容体 Emp24 または Rer1、ERES、ゴルジ体シス槽それぞれの細胞内局在を多色同時 3D イメージング解析した。その結果、Emp24 はゴルジ体シス槽にはほとんど局在せず、ERES とその近傍に局在し、反対に Rer1 は ERES にはほぼ局在せず、シス槽に局在することが確認できた。
- (2) 次に、多色同時 4D イメージングにより積荷受容体 Emp24 の動態を解析した。ゴルジ体シス槽が ERES に接触している間に、Emp24 は速やかにシス槽へ順行輸送された(ハグアンドキスアクション)。Emp24 は、その後、シス槽から ERES へと速やかに逆行輸送され、ゴルジ体シス槽と ERES 接触の間に、順行輸送と逆行輸送の両輸送が達成されることを明らかにした。更に、シス槽を mRFP-Sed5 で標識した株も作成し、同様の多色同時 3D、4D イメージングを行った。Emp24 は同様の細胞内局在、4D 動態を示すことが明らかとなった。
- (3) 次にシスゴルジ体マーカー Mnn9-mCherry または mRFP-Sed5、ERES マーカー Sec13-iRFP を発現した COPI 高温感受性株を用いて Emp24-GFP と Rer1-GFP の細胞内局在を 3D 解析した。その結果、シス槽に局在する Emp24-GFP が増加した。また、ERES に局在する Rer1-GFP も増加する傾向が示された。更にシス槽を RFP-Sed5 で標識した COPI の高温感受性株を用いて、4D イメージング解析を行った結果、COPI の機能阻害が起きない際にはハグアンドキスアクションの間に速かに ERES へ戻る Emp24 が、COPI の機能を阻害すると遊離したシス槽にも留まる傾向があることが判明した。以上の結果より、ゴルジ体シス槽と ERES 接触の間に順行輸送と COPI 輸送小胞による逆行輸送が速やかに達成するモデルが示

唆された。

- (4) ゴルジ体から小胞体へ逆行輸送される COPI 輸送小胞は、ER arrival sites (ERAS) で補足されると考えられているが、未だ定義されていない。この ERAS が、出芽酵母 *Pichia pastoris* では細胞内に数個しかない ERES と物理的・機能的に繋がっていることが示された。そこで、ERAS のマーカーである Dsl1、TIP20 に光退色に強く安定な蛍光タンパク質 Stay Gold タグを付加し、Sec13-2 × mCherry で ERES を標識した出芽酵母 *S.cerevisiae* を作成し、ERES と ERAS の局在比較を行った。その結果、ERAS は ERES の周辺に局在し、一部が ERES と共局在することが明らかとなった。また、ERAS の動態を調べると、静的ではなく ERES 周辺にありながらもダイナミックにその局在、ERES との空間的な関連を変化させていることが明らかとなった。これらの結果より、ゴルジ体シス槽と ERES が接触すると共に ERAS がシス槽近傍に位置することにより、順行輸送と COPI 小胞による逆行輸送が正確に達成されるモデルが示唆された。

参考文献 (1) K. Kurokawa *et al.*, *Methods Cell Biol.* 2013 (2) K. Kurokawa *et al.*, *Nat Commun.* 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kakimoto-Takeda Yuriko, Kojima Rieko, Shiino Hiroya, Shinmyo Manatsu, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko, Endo Toshiya, Tamura Yasushi | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 105362 ~ 105362 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105362 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Rodriguez-Gallardo Sofia, Sabido-Bozo Susana, Ikeda Atsuko, Araki Misako, Okazaki Kouta, Nakano Miyako, Aguilera-Romero Auxiliadora, Cortes-Gomez Alejandro, Lopez Sergio, Waga Miho, Nakano Akihiko, Kurokawa Kazuo, Muniz Manuel, Funato Kouichi | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Quality-controlled ceramide-based GPI-anchored protein sorting into selective ER exit sites | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110768 ~ 110768 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110768 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Rodriguez-Gallardo Sofia, Kurokawa Kazuo, Sabido-Bozo Susana, Cortes-Gomez Alejandro, Perez-Linero Ana Maria, Aguilera-Romero Auxiliadora, Lopez Sergio, Waga Miho, Nakano Akihiko, Muniz Manuel | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Assay for dual cargo sorting into endoplasmic reticulum exit sites imaged by 3D Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy (SCLIM) | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0258111 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0258111 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Atsuko Ikeda, Philipp Schlarmann, Kazuo Kurokawa, Akihiko Nakano, Howard Riezman, and Kouichi Funato. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Tricalbins are required for nonvesicular ceramide transport at ER-Golgi contacts and modulate lipid droplet biogenesis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 101603 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101603. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Sofia Rodriguez-Gallardo, Kazuo Kurokawa, Susana Sabido-Bozo, Alejandro Cortes-Gomez, Atsuko Ikeda, Valeria Zoni, Auxiliadora Aguilera-Romero, Ana Maria Perez-Linero, Sergio Lopez, Miho Waga, Misako Araki, Miyako Nakano, Howard Riezman, Kouichi Funato, Stefano Vanni, Akihiko Nakano, Manuel Muniz. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 eaba8237 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba8237. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Syara Fujii, Kazuo Kurokawa, Ryota Inaba, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Tago, Yuri Nakamura, Akihiko Nakano, Takunori Satoh, and Akiko K. Satoh | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Recycling endosomes attach to the trans-side of Golgi stacks in Drosophila and mammalian cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 6. 最初と最後の頁 jcs236935 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.236935. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Syara Fujii, Kazuo Kurokawa, Tatsuya Tago, Ryota Inaba, Arata Takiguchi, Akihiko Nakano, *Takunori Satoh, and *Akiko K Satoh. | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Sec71 separates Golgi stacks in Drosophila S2 cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 6. 最初と最後の頁 jcs.245571 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.245571 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Riccardo Rizzo, Domenico Russo, Kazuo Kurokawa, Alfredo Budillon, Franck Perez, Seetharaman Parashuraman, Yusuf A Hannun, Akihiko Nakano, Daniela Corda, Giovanni D' Angelo and Alberto Luini et al.,. | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Golgi maturation-dependent glycoenzyme recycling controls glycosphingolipid biosynthesis and cell growth via GOLPH3. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The EMBO Journal | 6. 最初と最後の頁 e107238 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020107238 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Yutaro Shimizu, Junpei Takagi, Emi Ito, Yoko Ito, Kazuo Ebine, Yamato Komatsu, Yumi Goto, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Takashi Ueda, Kazuo Kurokawa, Tomohiro Uemura, and Akihiko Nakano. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 1901 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22267-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kazuo Kurokawa and Akihiko Nakano | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Live-cell Imaging by Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy (SCLIM): Simultaneous Three-color and Four-dimensional Live Cell Imaging with High Space and Time Resolution. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bio-Protocol | 6. 最初と最後の頁 e3732 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3732 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 黒川量雄, 宮代大輔, 中野明彦 | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 超解像ライブイメージング顕微鏡SCLIMの開発とSCLIMによるゴルジ体タンパク質輸送機構の解明 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 レーザー研究 | 6. 最初と最後の頁 271-275 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒川量雄 |
| 2. 発表標題 4Dライブイメージングによる小胞体, ゴルジ体の積荷タンパク質輸送機構の解明 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 黒川量雄, 中野明彦, 遠藤斗志也, 田村康 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリア- 小胞体間結合因子ERMES 複合体クラスターの解離がER ストレス軽減に寄与する |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒川量雄, Sofia Gallardo, Manuel Muniz, 中野明彦 |
| 2. 発表標題 小胞体における積荷タンパク質選別輸送機構 |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 須田恭之, 館川宏之, 黒川量雄, 中野明彦, 入江賢児 |
| 2. 発表標題 膜交通関連オルガネラの減数分裂に伴う再構成 |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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