

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06160

研究課題名（和文）新規ゴルジ体-液胞間輸送制御機構の解析

研究課題名（英文）Mechanisms of selective Golgi-vacuole/lysosome trafficking pathway

研究代表者

神 奈亜子（Jin, Natsuko）

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・研究員

研究者番号：90827362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物においてゴルジ体は、生命活動を支える上で重要な必須細胞内小器官である。本研究課題ではゴルジ体膜交通異常により活性化される、「ゴルジ体-液胞間輸送経路」に着目し、分子機構の解明を目指した。膜交通異常時に選択的に液胞へ輸送されるゴルジ体タンパク質の同定を行った結果、様々なゴルジ体タンパク質が標的タンパク質であった。標的ゴルジ体タンパク質の分類から、選択的液胞輸送への境界はゴルジ体トランス層に存在すると考えられる。更に膜交通異常時に、分解標的ゴルジ体が液胞までどのように輸送されるのかその詳細な解析のため、超解像高速ライブセルイメージング技術を組み合わせた酵母RUSH法の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新規合成タンパク質輸送とは異なる「選択的ゴルジ体-液胞間輸送経路」の存在が示唆された。また、酵母RUSH法の構築及び高速超解像ライブセルイメージングと組み合わせることにより、これまで酵母研究では困難であった積荷輸送の全容を詳細にライブセルイメージングにより追跡することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：In all eukaryotic cells, intracellular membrane trafficking is an essential process. There is an anterograde trafficking flow for transport of newly synthesized proteins from endoplasmic reticulum (ER) to their final destination through Golgi apparatus. On the other hand, retrograde trafficking flow is required for protein retrieval from Golgi to ER and intra-Golgi protein transport. I found that an unknown machinery is triggered to transport several and selective Golgi resident proteins into vacuole/lysosome for degradation, when the retrograde flow is inhibited. The studies in this proposal are aimed at understanding the molecular mechanisms and a biological significance for this degradation process. Based on the classification of target Golgi proteins, the boundary to selective vacuolar trafficking is thought to reside in the trans-Golgi. In addition, I developed a yeast RUSH assay to analyze how the target Golgi-residents are sorted to the vacuole.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 液胞 膜交通 ライブセルイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、ゴルジ体は必須細胞内小器官(オルガネラ)であり、その機能維持は細胞の生命活動を支える上で重要な役割を持つ。申請者は出芽酵母を用いた実験において、ゴルジ体上での膜交通に異常が生じると、複数のゴルジ体タンパク質が液胞へ運ばれ分解される現象を見出した。申請者は、新しい「ゴルジ体-液胞間輸送経路」の存在を想定し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

新規合成タンパク質の約3分の1は、小胞体(ER)を通過しゴルジ体に運ばれる。運び込まれたタンパク質(積荷)はシス槽からトランス槽へ向かいながら、順次、糖鎖修飾や脂質付加等の修飾を受け、積荷の選別・仕分けが行われるトランスゴルジ網(TGN)に到達する。この一連の輸送過程は順行性輸送と呼ばれ、小胞等が標的膜画分へ融合する「膜交通」を介し積荷は運搬される。一方、TGNからゴルジ体を経由しERへ、逆方向の膜交通経路;逆行性輸送が存在する。逆行性輸送の積荷は、ゴルジ体へ誤輸送されたERタンパク質、ER-ゴルジ体間輸送に関わる因子等があり、ゴルジ体上で Coat Protein complex I(COPI) 被覆輸送小胞に運び込まれ、本来局在していた区画へ引き戻される。COPI 被覆構成因子 Ret1 の変異体 *ret1-1* 株ではゴルジ体における逆行性輸送が阻害される。その際、幾つかのシス及びメディア槽タンパク質はゴルジ体へ留まるのではなく、液胞へ輸送されることを申請者は見出した(未発表、図1)。一方、トランス槽タンパク質を含め、液胞へ輸送されないゴルジ体タンパク質も存在する。これらの結果は以下の2点を示唆する;(1)ゴルジ体における逆行性輸送に異常が生じると、何らかの「ゴルジ体-液胞間輸送経路」が活性化する、(2)輸送・分解されるゴルジ体タンパク質には選択性がある。本研究では、この新規「ゴルジ体-液胞間輸送経路」の詳細な分子機構解明を目指した。

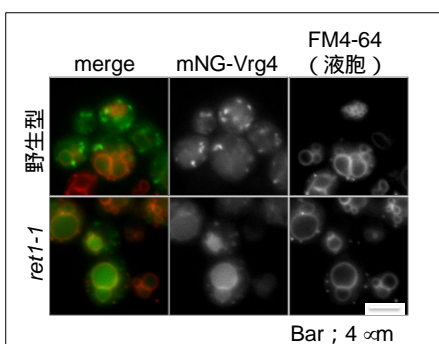


図1. 選択的ゴルジ体タンパク質輸送・分解

*ret1-1*株では *cis* ゴルジ体タンパク質 Vrg4 が液胞へ(白矢印)輸送される。FM4-64:液胞膜.Bar:4μm

3. 研究の方法

「ゴルジ体-液胞間輸送」における標的ゴルジ体タンパク質の網羅的な同定のため、様々なゴルジ体タンパク質に蛍光タンパク質を付加し、*ret1-1* 株に発現させ、その挙動を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、各種膜交通関連変異体を用いた解析を行い、「ゴルジ体-液胞間輸送」分子機構の探索を行った。また、同定した「ゴルジ体-液胞間輸送」標的ゴルジ体タンパク質の詳細な動態について観察するため、酵母 RUSH(Retention Using Selective Hook)法を独自に構築した。

4. 研究成果

ret1-1 株における各種ゴルジ体タンパク質の挙動を網羅的に顕微鏡観察した結果、糖鎖修飾酵素を含む様々なゴルジ体タンパク質が液胞へと輸送されることが明らかとなった。また、同定した標的ゴルジ体タンパク質の分類を行った結果、トランス層及び TGN ゴルジ体タンパク質は液胞へと輸送されないことから、選択的ゴルジ体-液胞間輸送決定が行われる境界はおそらくゴルジ体-トランス層に存在することが示唆された。

膜交通異常が誘導する「選択的ゴルジ体タンパク質輸送・分解経路」とは？この問いに答えるべく、標的ゴルジ体タンパク質がどのように液胞へ輸送されるのか、ライブセルイメージングによる追跡を行うため、酵母 RUSH 法を構築した（未発表、図 2）。RUSH 法では、Hook と Reporter が鍵となる。Hook は ER 局在タンパク質もしくは ER 局在シグナル配列とストレプトアビジン (Str) の融合タンパク質である。Reporter は可視化・追跡したい標的タンパク質にストレプトアビジン結合ペプチド (SBP) と蛍光タンパク質 (FP) を融合させる。両者を細胞に共発現させると、Str と SBP の結合により Reporter は ER に繫留される。充分量の Reporter が ER に繫留した時点でビオチンを加え、Hook と Reporter の結合を解離させ、ER からの標的タンパク質輸送を同調的に開始させる（図 2）。本研究期間内で、酵母 RUSH 法の開発を完了させ、標的ゴルジ体タンパク質の細胞内動態をつぶさに観察することが可能となった。

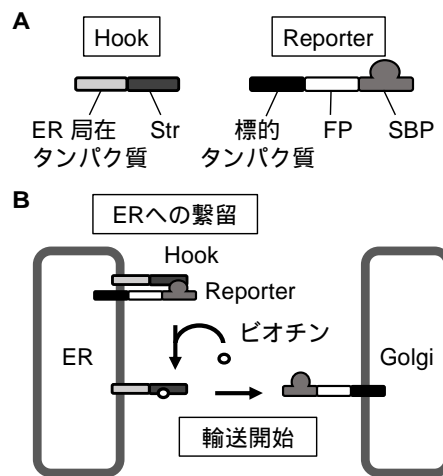


図 2. RUSH 法の概要

(A) Hook 及び Reporter の構造。
 (B) ビオチン添加により Reporter 輸送が同調的に開始される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jin Yui, Jin Natsuko, Oikawa Yu, Benyair Ron, Koizumi Michiko, Wilson Thomas E, Ohsumi Yoshinori, Weisman Lois S	4. 巻 23
2. 論文標題 Bur1 functions with TORC1 for vacuole mediated cell cycle progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202153477	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 Shima Takayuki, Ogura Monami, Matsuda Ruriko, Nakamura Shuhei, Jin Natsuko, Yoshimori Tamotsu, Kuma Akiko	4. 巻 222
2. 論文標題 The TMEM192-mKeima probe specifically assays lysophagy and reveals its initial steps	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202204048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202204048	査読の有無 無
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 Tojima Takuro, Suda Yasuyuki, Jin Natsuko, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Spatiotemporal dissection of the Golgi apparatus and the ER-Golgi intermediate compartment in budding yeast	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e97430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/elife.92900	査読の有無 無
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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神 唯、小泉美智子、神奈亜子、Lois Weisman、大隅良典
2. 発表標題 Bur1 functions with TORC1 for vacuole-mediated cell cycle progression
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神 奈亜子、黒川 量雄、戸島 拓郎、須田恭之、中野 明彦
2. 発表標題 膜交通のダイナミクスに迫る、酵母RUSH法の開発とライブセルイメージングへの応用
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神 奈亜子、黒川 量雄、中野 明彦
2. 発表標題 超解像ライブセルイメージングによるオルガネラ間膜接着を介した新規積荷輸送機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神 唯、小泉美智子、神奈亜子、Lois Weisman、中野明彦、大隅良典
2. 発表標題 Vacuoles/lysosomes are newly generated from endosomes
3. 学会等名 Gordon Research Conference Molecular Membrane Biology
4. 発表年 2023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
---------	---------