様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年　５月３１日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2012
課題番号：２２５７０１９４
研究課題名（和文）　小胞体膜ドメイン形成機構のライブイメージング解析

研究課題名（英文） Live imaging analysis for the relationship between morphology and function in the ER membrane

研究代表者
黒川　量雄（KUROKAWA KAZUO）
独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員
研究者番号：４０３３３５０４

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母S.cerevisiaeのCOPIIコートタンパク質は小胞体膜上に安定な輸送小胞の出芽領域（ERES）を形成することを明らかにした。このERESは、主に小胞体膜シート、及びチューブの辺縁の曲率の高い膜領域に局在した。小胞体膜の曲率維持に働くタンパク質群の欠損株では、ERESの分布が変化し、残存した小胞体シートの辺縁に集積することから膜の曲率がERES局在に重要なことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We examined ERES localization within the peripheral ER, finding that ERES localize on high-curvature ER domains where curvature-stabilizing protein Rtn1 is present. In mutant cells having fewer high-curvature ER domains, ERES accumulate at the remaining high-curvature ER domains on the edge of expanded ER sheets. We propose that membrane curvature is a key geometric feature for the regulation of ERES localization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学
キーワード：ERES, COPII, membrane curvature

１．研究開始当初の背景

小胞体は、分裂と融合を繰り返す動的

なオルガネラであり、連続した膜構造を持つにもかかわらず、独立した機能を有するいくつかのサブコンパートメントを含んでいる。種々のオルガネラや細胞膜を構成するタンパク質群および分泌タンパク質群が合成される場である粗面小胞体、脂質の供給や毒物の代謝の場である滑面小胞体に加えて、近年明らかになってきた輸送小胞の出芽領域と考えられる領域や、小胞体で合成された変異タンパク質を留めておく領域などがある。このような機能的なサブドメインの形成機構やそのダイナミクスの制御に関してはまだ多くが不明であり、種々の研究が進められている。

出芽酵母の小胞体は、核膜と細胞膜直下の周辺性の小胞体と大別される。その形態は、核膜はシート状であり、周辺性の小胞体はシート状およびチューブ状の形態をしている。チューブ状の小胞体の形成には、reticulon ファミリータンパク質と DP1 ファミリータンパク質が関与していることが報告された(Voeltz et al.Cell.2006)。また、出芽酵母の極性を持った増殖過程においては、元の細胞から出芽した新たな細胞に小胞体が連続したまま分配されるが、元の細胞と新たに出芽した細胞間で小胞体膜タンパク質の移動を妨げる障壁が形成されることが明らかになってきた (Luedeke et al. J.Cell Biol.2005)。以上のことから、小胞体自体の形態やその動的変化が、小胞体膜タンパク質のダイナミクスや活性、それらによって規定される小胞体の機能サブコンパートメント形成に関与している可能性が示唆されていたが、その詳細はあきらかではなかった。

２．研究の目的

オルガネラの形態がどのように形成され、維持されているのかという疑問は細胞生物学において非常に重要な疑問である。また、細胞内で特徴的な形態形成およびその変化がオルガネラ自身の機能へどのように関与しているのか、形態と機能の相関の記述は、大きな課題である。本研究では、出芽酵母小胞体のシート状の領域に局在している Sec63 などのタンパク質群と、小胞体チューブとシート辺縁に局在しチューブの形成とシートの形態維持に働く reticulon ファミリータンパク質群と、輸送小胞の出芽領域に集積する COPII コートタンパク質やその制御因子である Sar1 および Sec12 の位置情報とその時間的変化を明らかにし、種々の機能阻害株を組み合わせることで、形態の違い（シートとチューブ）が機能的領域（輸送小胞の出芽領域）の形成にどのように関与しているのかを明らかにし、小胞体形態とその機能ドメイン形成のモデルの構築することを目的に研究を進めた。

３．研究の方法

本研究では、高感度高解像度共焦点蛍光顕微鏡システムを用いた多色同時蛍光観察を中心に解析を進めた。始めに小胞体膜のシート状及びチューブ状の形状の領域に局在するタンパク質並びに輸送小胞の出芽領域に局在するタンパク質と GFP または mRFP との融合タンパク質を発現する出芽細胞株を作成した（Reticulon ファミリータンパク質、Sec63、Sec71transmembrane-domain、COPII コートタンパク質、Sar1p、Sec12 と GFP 及び mRFP 融合タンパク質発現株ならびに小胞体全体をマーキングできるシグナル配列 -GFP-HDEL など)。これらを組み合わせ、小胞体シートとチューブを同時解析できる株や小胞体シートと出芽領域、またはチューブと出芽領域を同時解析できる株等を作成した。

上記した株を用いて各タンパク質の小胞体膜上（2 次元）での空間分布の比較および輝度変化や拡散速度の測定等をおこなった。小胞体膜を２次元的に解析するために共焦点顕微鏡の焦点面を細胞膜直下の小胞体面に設定し、詳細な解析をおこなった。更に焦点面を高速で動かして立体的な局在情報を詳細に取得することで、小胞体の膜の曲率とタンパク質局在の 3 次元情報を取得した。

次に Reticulon ファミリータンパク質などの小胞体膜曲率の維持に働くタンパク質群の機能欠損株などの株を用いて各タンパク質の小胞体膜上での空間分布および輝度変化や拡散速度への影響の測定をおこなった。

４．研究成果

出芽酵母の COPII コートタンパク質である Sec24, Sec13/31, Sec16 は主に小胞体膜の縁に数 10 個のドットを形成し ERES を形成していることが明らかになった。このとき COPII 小胞の形成開始に必要な Sar1 は, 小胞体膜上全体に局在するが、一部が ERES に集積していた。一方、Sar1 のグアニンヌクレオチド

交換因子である小胞体膜局在タンパク質 Sec12 は、ERES 領域にはほとんど局在しなかった。次に一過的に発現誘導した活性化固定型 Sar1 は、小胞体膜全体への局在は示さずドット状の局在を示すことから、小胞体膜で活性化した Sar1 が ERES に集積することが示唆された。

次に COPII コートタンパク質と、膜の曲率の維持に働く Reticulon ファミリータンパク質との局在比較を小胞体膜平面で比較した結果、Rtn1 タンパク質が局在する小胞体膜の高い曲率を持った領域（チューブ及びシートの辺縁）に局在することが明らかになった。さらに詳細に COPII コートタンパク質が局在する小胞体膜の形態を 3 次元で観察した結果、COPII コートタンパク質は主に鞍形の膜領域に局在することが判明した。Reticulon ファミリータンパク質やその他の小胞体膜の高い曲率を維持するタンパク質群を欠損した細胞では、小胞体のチューブとシートの穴が無くなり肥大化したシートのみになる。この細胞では、COPII コートタンパク質がシートの縁のみに集積することが明らかとなった。このことから小胞体膜の曲率が COPII コートタンパク質の集積する小胞体膜機能ドメインである ERES の局在に重要であることが示唆された。

小胞体で新たに合成された積荷タンパク質は、ERES で COPII 小胞に積み込まれ、その後ゴルジ体に輸送される。COPII コートタンパク質と種々のゴルジ体マーカータンパク質の動態を観察したところ、Reticulon ファミリータンパク質やその他の小胞体膜の高い曲率を維持するタンパク質群を欠損した細胞では、一部のゴルジ体が ERES 近傍にずっと留まることが明らかとなった。そこで電顕顕微鏡によってこの変異株の細胞内構造を観察したところ、渦状のゴルジ体の構造が観察され, ERES がゴルジ体の形態形成においても重要な役割を果たすことが示唆された。

以上の研究成果は、Journal of Cell Science にて発表し、This Issue’ section (Next ER exit after bend J. Cell Sci. 125:e1401) に選ばれた。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　２件）

1. Okamoto M, Kurokawa K*, Matsuura-Tokita K, Saito C, Hirata R, Nakano A. High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae* J. Cell Sci. 125, 3402-3420. (2012) *corresponding author　査読有

2. Maeda Y, Yumoto M, Saito N, Ogawa T, Kurokawa K , Nakano A, Yamashita M, Wada S. Broadly Tunable UV-Blue Picosecond Pulsed Laser and Its Application for Biological Imaging Opt.Rev. Vol17 No3 305-308(2010) 査読有

〔学会発表〕（計　８件）

1. 黒川量雄、中野明彦：出芽酵母を用いた ER-Golgi 間タンパク質輸送システムのライブイメージング.　第 85 回日本生化学会大会　2012 年 12 月 16 日福岡国際会議場　博多
2. 黒川量雄、中野明彦：ER-Golgi 間タンパク質輸送のイメージング.　酵母遺伝学フォーラム第 45 回研究報告会　2012 年 9 月 4 日京都大学宇治キャンパス　おおばくプラザきはだホール　宇治
3. Kazuo Kurokawa, Michiyo Okamoto, Akihiko Nakano ：Live cell imaging of ER-to-Golgi protein transport system in *S.cerevisiae.* Joint meeting of The 45th annual meeting of Developmental biologist and The 64th Annual meeting of the Japan Society for cell biology. May 28, 2012. Kobe International Conference Center, Kobe
4. 黒川量雄、岡本美智代、中野明彦：酵母 ERES は、小胞体膜の高い曲率を持つ領域に局在する.第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 22 日　京都国際会館　京都
5. 黒川量雄、中野明彦：ゴルジ体ダイナミクスのイメージング解析.　酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究報告会　2011 年 9 月 7 日九州大學医学部 100 年講堂
6. 黒川量雄、中野明彦：COPII コートタンパク質とゴルジ体の局在とダイナミクス.第 63 回日本細胞生物学会大会　札幌北大　2011 年 6 月 27 日
7. Nobuko Sumiya, Kazuo Kurokawa, Akihiko Nakano：The spatio-temporal activities of Sec4p in living yeast cells. BMB2010, 12/8 2010 Kobe

8. 黒川量雄、中野明彦：COPII コートタンパク質の局在とダイナミクス．　酵母遺伝学フォーラム第 43 回研究報告会　奈良　2010 年 9/10

〔図書〕（計　１件）
黒川量雄、中野明彦：ゴルジ体の膜交通　生体の科学 63 号 400-403（2012）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
黒川　量雄（KUROKAWA KAZUO）
独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員
研究者番号：４０３３３５０４

(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
岡本美智代