

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891028

研究課題名(和文)植物細胞を用いたゴルジ体層板構造の形成・維持機構とその生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Study of the biogenesis and maintenance of the stacked structure of the Golgi apparatus using plant cells

研究代表者

伊藤 容子 (Ito, Yoko)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・特別研究員

研究者番号：10733016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体は、真核生物の細胞内膜交通において重要な役割を果たすオルガネラである。小胞体-ゴルジ体間の輸送を阻害する薬剤BFAでタバコの細胞を処理すると、ゴルジ体は消失し、最もシス側に局在していたタンパク質が、未知のドット状構造に局在する。この局在は、COPII小胞に依存せず、BFAによって阻害されない輸送経路に依っており、このドット状構造が、BFA除去後のゴルジ体再形成の際、後から運ばれてくる積荷を受け取る場であることがわかった。さらに、これまで細胞周期依存的であると考えられてきたゴルジ体の数の増加が、細胞周期ではなく、細胞の成長と強く関係していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The Golgi apparatus, one of the single-membrane-bounded organelles, plays essential roles in eukaryotic cells. By inhibiting ER-Golgi transport by a chemical compound BFA, the Golgi apparatus disappears and specific proteins which localize to the cis-most cisternae accumulate in unknown punctate structures. We have found that this localization of the cis-Golgi proteins is achieved by the transport route which is not inhibited by BFA and independent of COPII machinery. We have also demonstrated by 3D time-lapse observations that the punctate structures receive cargoes from the ER during Golgi regeneration after BFA removal. In addition, our observation revealed that the number of the Golgi stacks per cell, which was long believed to be regulated by the cell cycle, is strongly related to the cell growth, not to the cell cycle itself.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 膜交通 ライブイメージング 植物

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、生命の最小単位である細胞の中に、膜で区画化された様々なオルガネラを有している。中でもゴルジ体は、細胞内輸送経路において、小胞体 (ER) で新たに合成された積荷を最初に受け取り選別を行うと同時に、積荷の機能に必要な糖鎖修飾を施すという、必要不可欠な役割を果たしている。ゴルジ体は、「槽」と呼ばれる扁平な袋状の膜が複数重なった、「層板構造」をとることで知られている。この層板構造がゴルジ体の形態上最大の特徴であり、ほとんどの真核生物で保存されているにもかかわらず、この構造がどのようにして形成・維持されているのかはほとんど明らかになっていない。

ER-ゴルジ体間輸送の阻害剤である Brefeldin A (BFA) で細胞を処理すると、ゴルジ体が ER に吸収されて消失するが、そこから BFA を除去すると、ゴルジ体は元のようになり再形成されることが知られている。この BFA 除去後のゴルジ体再形成は、ゴルジ体形成機構を明らかにするための観察系として、動物細胞・植物細胞問わず、複数の研究グループによって用いられてきた。しかし、動物細胞では、ゴルジ体層板構造が中心体付近に集められ、互いに繋がり合っただけで複雑なリボン状構造をとるという特徴から、光学顕微鏡によって生きた細胞内で層板構造の詳細な観察を行うことは困難であった。一方植物細胞では、明瞭な層板構造をとったゴルジ体が細胞質中に散在しているため、比較的容易にゴルジ体層板構造の観察を行うことができる。ただし、ライブイメージング技術が未だ発展途上であったこともあり、十分な時空間分解能をもって解析を行った例はなかった。

研究代表者は、本研究課題開始までの研究によって、タバコ培養細胞 BY-2 で様々なゴルジ体マーカーを用いてゴルジ体を可視化し、BFA 処理を行うと、一部の *cis* 槽マーカーが未知のドット状の構造体に局在することを明らかにした。また、このドット状構造に局在するタンパク質が、通常状態においてゴルジ体の最も *cis* 側の槽に局在していることを示唆する結果も得ていた。これらの結果を哺乳類細胞での知見と比較することで、植物のゴルジ体の最も *cis* 側の槽が、植物には存在しないとされてきた ER-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC、ER とゴルジ体の中間の区画) に相当する特別な性質を持っており、ここに局在するタンパク質が、BFA 処理によってドット状構造に局在すると考えられた。さらにここから BFA を除去すると、*cis* 槽マーカーのドット状構造が集まることでゴルジ体の再形成が開始され、そこから *trans* 槽が再形成される様子が観察されたことから、このドット状構造が、ゴルジ体層板構造の再形成における輸送の足場として働いているのではないかと考えた。本研究課題では、これらのことを踏まえ、このド

ット状構造に注目した解析をさらに進めることで、層板構造形成のダイナミクスと分子メカニズムに迫りたいと考えた。

また、植物細胞のゴルジ体は細胞周期に伴って数が増え、特に細胞質分裂が起こる前までに倍加すると長い間考えられてきたが、生きた細胞を用いた解析はほとんど行われておらず、細胞周期に対する詳細な数の変化についても、報告によって結果がまちまちであった。薬剤処理に依らないゴルジ体新生の様子を明らかにするために、細胞周期とゴルジ体形成・維持との関係に注目した解析を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) BFA 除去後のゴルジ体層板構造形成における詳細な輸送のダイナミクスを明らかにする。

(2) ゴルジ体再形成の分子メカニズムを明らかにする。

(3) 細胞周期とゴルジ体の形成・維持との関係を明らかにし、ゴルジ体新生の様子を捉える。

3. 研究の方法

(1) タバコ BY-2 細胞において、ゴルジ体の様々な槽に局在するタンパク質を蛍光タンパク質によって可視化し、BFA 除去後のゴルジ体再形成においてそれらのタンパク質がどのように輸送されているのか、特に最も *cis* 側の槽に注目して、所属研究室で開発された高速・高感度・高分解能の共焦点レーザー顕微鏡 SCLIM を用い、ライブイメージングで明らかにする。

(2) 分子遺伝学的解析のため、ゴルジ体を可視化したシロイヌナズナ株を作製し、BFA 処理とその除去時において、ゴルジ体マーカーがタバコの細胞と同様の挙動を示すか確認する。さらに、BFA 処理時に一部の *cis* 槽マーカーが局在するドット状の構造を生化学的に単離し、プロテオミクス解析によってそこに局在する因子を同定する。

(3) 細胞周期の同調が可能なタバコ BY-2 細胞の特長を活かし、ライブイメージングによって長時間 3D 観察を行う。データの画像処理によってゴルジ体の数の変化と細胞周期の関係を明らかにし、ゴルジ体新生がどのように起こるのか解析する。

4. 研究成果

(1) BFA 除去後のゴルジ体再形成の様子を SCLIM を用いて詳細に明らかにするため、これまで植物細胞では使用例の報告されていない iRFP を導入し、ゴルジ体の *cis* 槽、*trans* 槽と共に、ER を加えた 3 色同時の 3D タイムラプス観察を行った。得られたデータにデコ

ンボリューション処理を行うことでさらに空間分解能を向上させたものを元に、3Dでのマーカータンパク質の共局在解析を行ったところ、*trans* 槽マーカーと ER マーカーの相関係数はゴルジ体再形成の進行とともに下降し続けるのに対し、*trans* 槽マーカーとドット状に局在する *cis* 槽マーカーの間の相関係数は、再形成が始まると一旦上昇し、再形成が終わりに近づくと元の水準に戻るということがわかった (図1)。これは BFA 処理によって ER 膜に局在していた *trans* 槽マーカーが、BFA の除去によって ER から運びだされ、はじめに *cis* 槽マーカーのドット状構造に輸送された後、そこから独立した *trans* 槽に局在することを示していると考えられる。この結果によって、*cis* 槽マーカーのドット状構造が、BFA 除去後のゴルジ体再形成の際に、後から運ばれてくるゴルジ体構成因子を受け取る場として機能していることが確かめられた。このようにして *cis* 槽が積み荷タンパク質を受け取る様子は、ゴルジ体が層板構造をとらない出芽酵母でも観察されており (Kurokawa et al., 2014)、層板構造を持つ植物細胞でも同様に、COPII 小胞が集まることで新しい *cis* 槽が形成されるという単純な槽成熟モデルにはあてはまらない輸送形式が存在すると考えられる。

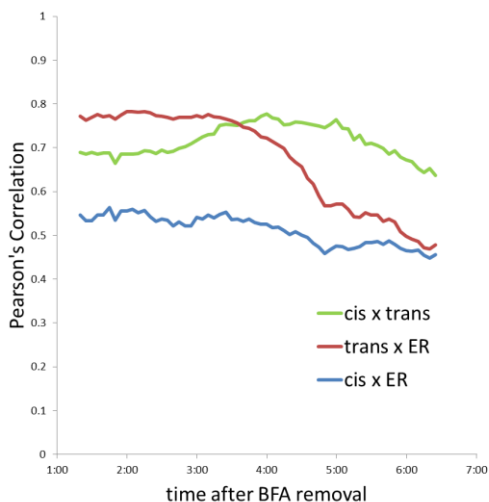
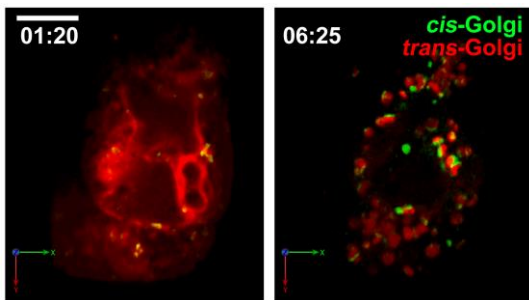


図1. ゴルジ体再形成過程における *cis* 槽・*trans* 槽・ER マーカーの共局在解析

さらに、BFA 処理によってドット状構造に局在する *cis* 槽マーカーが、BFA 処理を行った状態で発現誘導したり、COPII 小胞の形成

を SAR1 の優勢阻害型変異タンパク質で阻害したりした状態でも、ドット状の構造に局在することが明らかになった。これらの結果は、特定の *cis* 槽マーカーが、BFA によって阻害されず、COPII にも依存しない経路によって運ばれる可能性を示唆している。

(2) これまで観察に用いてきたタバコは遺伝学的解析が困難であるが、ゲノム情報等のリソースが整っているシロイヌナズナは、野生型ではもともと ER-ゴルジ体間輸送が BFA 非感受性であるという問題点があった。そこで、BFA のターゲット分子に 1 アミノ酸置換変異を入れることで BFA 感受性に改変されたシロイヌナズナ株をバックにして、ゴルジ体可視化マーカーを発現させた株の作製を行った。*cis* 槽マーカーと *trans* 槽マーカーを 2 色で発現する株を確立し、BFA 処理とその除去後のタイムラプス撮影を行ったところ、このシロイヌナズナ株の根においても、タバコの細胞と同様に、*cis* 槽マーカーのドット状構造がゴルジ体再形成の足場となる様子が確認された。プロテオミクス解析についてはフランスのグループとの共同研究によって行うことになり、現在これに向けて準備を行っている。

(3) ゴルジ体を可視化したタバコ BY-2 細胞の分裂を同期させ、アフィジコリンからのリリース後最初の細胞質分裂からその次の分裂まで、一細胞周期全体の 3D タイムラプス撮影を行った。こうして得られた 3 次元画像の中のゴルジ体の輝点の数を計測するため、共同研究によって ImageJ プラグインを開発し、細胞周期の進行に伴うゴルジ体の数の変化を調べた。その結果、多くの細胞で G1 期から S 期にかけてゴルジ体の数が増加する傾向が見られた (図2)。しかし、その増え方は細胞によってかなりのばらつきがあった。

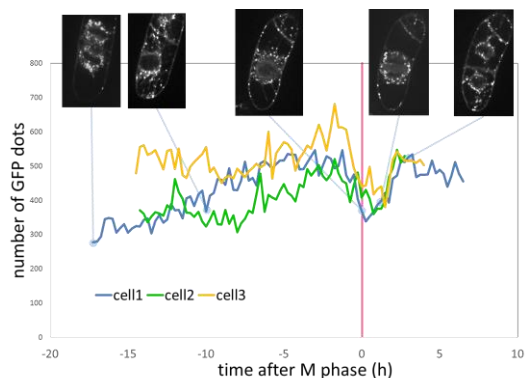


図2. 細胞周期とゴルジ体数の変化
3つの細胞について計測した結果を示している

ここで、それぞれの細胞でのゴルジ体数の増加と同時に、細胞の体積の変化を調べてみると、体積が増加している細胞では、ゴルジ体の数も増加することがわかった。そこで、アフィジコリンによって細胞周期の進行を

止めた状態で同様のタイムラプス観察・解析を行った。その結果、細胞分裂は起こらないものの細胞の体積は増加し続け、それに伴ってゴルジ体の数も増え続けた。この結果から、植物細胞のゴルジ体の数は、これまで長い間信じられていたように細胞周期そのものによってコントロールされているのではなく、細胞の成長と強く結びついていることが明らかになった。

<引用文献>

①Kurokawa K, Okamoto M, Nakano A (2014) Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature Communications* 5: 3653

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

①伊藤容子、植村知博、湖城恵、馳澤盛一郎、上田貴志、中野明彦、「植物細胞におけるゴルジ体形成・維持機構の研究」、第57回日本植物生理学会年会、2016年3月18日～2016年3月20日、岩手大学(盛岡市)

②Yoko Ito, Tomohiro Uemura, Kei H. Kojo, Seiichiro Hasezawa, Takashi Ueda, and Akihiko Nakano, Biogenesis and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells, Annual meeting of the European Network for Plant Endomembrane Research 2015, 2015年8月17日～2015年8月20日, Leeds (United Kingdom)

③伊藤容子、植村知博、湖城恵、馳澤盛一郎、上田貴志、中野明彦、「植物細胞におけるゴルジ体形成・維持機構の解析」、第67回日本細胞生物学会大会、2015年6月30日～2015年7月2日、タワーホール船堀(東京都)

④伊藤容子、植村知博、湖城恵、馳澤盛一郎、上田貴志、中野明彦、「植物細胞におけるゴルジ体形成・維持機構の解析」、第56回日本植物生理学会年会、2015年3月16日～2015年3月18日、東京農業大学(東京都)

⑤伊藤容子、植村知博、藤本優、上田貴志、中野明彦、「植物細胞におけるゴルジ体形成・維持機構の解析」、理研シンポジウム 第2回「光量子工学研究」、2014年11月25日～2014年11月26日、仙台市情報・産業プラザ(仙台市)

⑥ Yoko Ito, Tomohiro Uemura, Masaru Fujimoto, Takashi Ueda, and Akihiko Nakano,

Dynamics of the Golgi apparatus and the TGN during regeneration after brefeldin A treatment revealed by live-imaging, Annual meeting of the European Network for Plant Endomembrane Research 2014, 2014年9月8日～2014年9月11日, Lecce (Italy)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 容子 (ITO, Yoko)

理化学研究所・光量子工学研究領域・特別
研究員

研究者番号：10733016