

平成16年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		なかの あきひこ		所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院理学系研究科・教授	
研究代表者氏名		中野 明彦					
研究課題名	和文	膜タンパク質の細胞内選別輸送の分子機構					
	英文	Molecular Mechanisms of Intracellular Sorting and Transport of Membrane Proteins					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		18,300	17,200	17,200	17,200	17,200	87,100
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
中野 明彦	東京大学・大学院理学系研究科・教授	分子細胞生物学	研究の総括およびリアルタイム可視化手法の開発				
東山 哲也	東京大学・大学院理学系研究科・助手	発生生物学	リアルタイム可視化手法の開発				
平田 龍吾	理化学研究所・中央研究所 中野生体膜研究室・前任研究員	遺伝生化学	選別輸送におけるユビキチンの役割				
佐藤 健	理化学研究所・中央研究所 中野生体膜研究室・研究員	生化学	選別レセプターの研究				
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究は、メンブントラフィック・小胞輸送で結ばれるダイナミックな膜の流れの中で、ある特定の場所で機能すべき膜タンパク質がいかにしてそこに局在するかを、徹底的に分子の言葉で解明することを目的とする。脂質を含んだ膜の環境の中で、いかにしてこれらの膜タンパク質同士が相互作用し、いかにしてその機能を発揮すべきかを、細胞内の膜系の連続性と機能分化の中で「局在」という観点から解明することは、細胞生物学の重要なテーマであるのみならず、タンパク質の細胞内の挙動を理解する上でもきわめて重要であり、ポストゲノム時代の新しい生物学に膜の視点から大きく寄与するものである。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1) Rer1p を中心とした選別レセプターに関する研究

ゴルジ体膜タンパク質 Rer1p は、ゴルジ体に誤って輸送されてきた一群の小胞体膜タンパク質の膜貫通領域(TMD)を認識し、COPI 小胞を介して小胞体へと送り返す分子選別装置である。荷として Sec71p に注目し、その TMD が小胞体膜へのターゲティングおよび局在化に必要十分であり、Rer1p に直接認識されることを明らかにした。また、この認識には TMD における極性残基の空間的な位置が重要であることを示した。一方、Rer1p の 4 つの TMD における極性残基についても網羅的に変異解析を行った結果、ある特定のチロシン残が Sec12p の小胞体局在化には必須であるが、Sec71p の局在化には関与しないことを明らかにした。

酵母鉄イオン輸送体は Fet3p/Ftr1p というヘテロ 2 量体からなり、そのいずれが欠失しても細胞膜に正しく発現しない。この現象は小胞体における品質管理機構によるものであるが、Fet3p が小胞体に留まるのは、静的残留ではなくゴルジ体に存在する逆送レセプター Rer1p に依存したリサイクリングによるものであることを明らかにした。また Rer1p による認識には、Fet3p の膜貫通領域にある極性アミノ酸残基が必須であることがわかった。

2) レクチン型選別レセプターに関する研究

小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送における積み荷レセプターの候補として、レクチン様膜タンパク質 Emp46/47p に注目した。C 末端領域に COPI、COPII 結合モチーフがあり、これらに依存して小胞体-ゴルジ体間をリサイクルしていること、順行輸送が機能に重要であることを明らかにした。また、Emp46/47p の欠損株では一群の糖タンパク質の分泌損傷がみられ、これらが糖タンパク質レセプターとして機能している可能性を示唆した。

次に、Emp46/47p が小胞体においてオリゴマーを形成すること、またこのオリゴマー形成が小胞体からの COPII 小胞の出芽に必須であることを示した。Emp47p は単独でオリゴマーを形成し、小胞体を出ることができるが、Emp46p は Emp47p とヘテロオリゴマーを作ることによって初めてゴルジ体に進むことができる。またこのヘテロオリゴマーは、小胞体内および COPII 小胞内では維持されるが、ゴルジ体に到達すると解離することがわかった。

このオリゴマー形成に依存した COPII 小胞形成を、精製 Emp46/47p とリン脂質からなるプロテオリポソームを用いて試験管内で完全に再構成することに成功した。この系を用い、Sar1 GTPase による GTP の加水分解は積み荷の良し悪しにかかわらず起こること、つまり GTP の加水分解がタイマーとして働いて、正しい積み荷のチェックに利用されている可能性を示唆した。

3) 膜タンパク質選別における脂質およびユビキチンの役割に関する研究

エルゴステロール合成に欠損を示す酵母 *erg6* 変異株では、トリプトファン輸送体 Tat2p の誤輸送が 2 つのオルガネラで起こっていた。Tat2p はゴルジ体から細胞膜ではなくてエンドソームへ運ばれ、さらにそこで内腔側へ取り込まれて限界膜から消失した。これら 2 つの誤輸送は、ユビキチンリガーゼの機能の低下によって矯正された。この結果から、ユビキチンによる翻訳後修飾が Tat2p の輸送シグナルとして機能しており、その選別にステロール脂質が密接に関与していることが明らかになった。

4) 膜タンパク質の選別過程のリアルタイム可視化の研究

超高感度高速カラー共焦点レーザー顕微鏡システムを用い、酵母細胞内の膜タンパク質の動態を観察した。小胞体、ゴルジ体 *cis* 領域、ゴルジ体 *trans* 領域など、さまざまな局在を示す蛍光タンパク質マーカーを作成した。これらを複数種発現し、同時観察することにより、選別の過程をリアルタイムで追うことが可能になった。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 輸送小胞形成時における膜タンパク質積み荷の選別の完全再構成系の構築に成功

Emp46/47p をオリゴマー形成が必須な積み荷タンパク質のモデルとし、これらを精製後リボソームに再構成して、COPII および Sar1p-GTP または Sar1p-GMPPNP の存在下に 50 nm 小胞が形成する無細胞系の構築に成功した。膜タンパク質の選別過程を試験管内で再構成したのは世界でも初めてのことであり、この系の成功により、選別過程における Sar1p による GTP の加水分解の意義という、発見以来 10 数年続いてきた論争に決着をつける実験が可能になった。

2) 酵母生細胞でゴルジ体のダイナミクスを観察し、ゴルジ体の槽成熟モデルを証明

槽 (cisterna) が積み重なった構造をとるゴルジ体の層板構造がどのように形成され、どのように維持されるかという問題については、槽が固定した区画として存在し、その間で小胞が荷を運ぶという小胞輸送モデルと、*cis* 側の槽が新しく形成し、古い槽は次第に成熟して *trans* 槽となつてついには消滅するという槽成熟モデルの 2 説の間で激しい論争が続いてきた。異なる色の蛍光タンパク質とゴルジ体膜タンパク質の融合タンパク質で *cis* と *trans* の槽を標識し、そのダイナミクスをきたままリアルタイムで観察した結果、*cis* の槽が次第に *trans* に変わることが観察された。つまり、古典的な小胞輸送モデルでは説明できないことが明確に証明された。

1) と 2) の研究成果は、2003 年のゴードン会議 (Molecular Membrane Biology) で招待講演に取り上げられ、いずれも絶賛を浴びた。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

原著論文

Ken Sato and Akihiko Nakano (2002). Emp47p and its close homologue Emp46p have a tyrosine-containing ER exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**:2518-2532.

Miyuki Sato, Ken Sato and Akihiko Nakano (2002). Evidence for the intimate relationship between vesicle budding from the ER and the unfolded protein response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**:560-567.

Kenjiro Misu, Konomi Fujimura-Kamada, Takashi Ueda, Akihiko Nakano, Hiroyuki Katoh, and Kazuma Tanaka (2003). Cdc51p, a conserved endosomal membrane protein, controls polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**:730-747.

Kyohei Umebayashi and Akihiko Nakano (2003). Ergosterol synthesis is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**: 1117-1131.

Ken Sato and Akihiko Nakano (2003). Oligomerization of a cargo transport receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* **14**: 3055-3063.

Ken Sato, Miyuki Sato, and Akihiko Nakano (2003). Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* **14**:3605-3616.

Ken Sato and Akihiko Nakano (2004). Reconstitution of coat protein complex II (COPII) vesicle formation from cargo-reconstituted proteoliposomes reveals the potential role of GTP hydrolysis by Sar1p in protein sorting. *J. Biol. Chem.* **279**:1330-1335.

Miyuki Sato, Ken Sato, and Akihiko Nakano (2004). ER quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the Golgi. *Mol. Biol. Cell* **15**:1417-1424.

英文総説

Akihiko Nakano (2002). Spinning-disk confocal microscopy -- a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell Struct. Funct.* **27**:349-355.

Akihiko Nakano (2004). Yeast Golgi apparatus – dynamics and sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:186-192.

国際会議における主な発表

Akihiko Nakano (invited speaker), Ken Sato, Miyuki Sato and Kyohei Umebayashi (2002). Mechanisms of membrane protein sorting along the secretory and vacuolar pathways. IIIrd International Symposium on Autophagy: Molecular Biology and Pathophysiology of Lysosomal/Vacuolar System. Osaka, Japan.

Akihiko Nakano (organizer and speaker) (2002). Bioarchitect – a new concept in bioscience for the new century. What construct cells and what cells construct Minisymposium on Bioarchitect. 4th Congress of the Asian-Pacific Organization of Cell Biology. Taipei, Taiwan.

Akihiko Nakano (invited speaker) (2002). Molecular mechanisms of membrane protein sorting in the yeast secretory pathway. Second International Göttingen Meeting on Protein and Membrane Transport in the Secretory Pathway. Göttingen, Germany.

Akihiko Nakano (invited speaker) (2003). Dynamic membrane protein sorting in yeast Golgi. Gordon Conference on Molecular Membrane Biology. Andover, NH, USA.

Akihiko Nakano (invited speaker) (2003). Dynamic organization of the Golgi apparatus and endocytic organelles as visualized by real-time multicolor imaging. 10th FAOBMB Congress. Bangalore, India.