

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成20年度採択分

平成23年5月23日現在

研究課題名（和文）膜交通における選別輸送の分子機構の解明と
植物の高次システムへの展開

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Protein Sorting in
Membrane Traffic and Roles in Higher Plants

研究代表者

中野 明彦 (NAKANO AKIHIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要: 膜交通のメカニズムを目で見えて理解し、高等植物の生存戦略を細胞の中から探る。酵母と植物を材料に、遺伝学、生化学、ライブイメージングの方法論を駆使し、タンパク質選別の分子機構を解明し、植物の高次機能における役割に迫る。

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: 膜交通、選別輸送、ライブイメージング、出芽酵母、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜交通の選別過程については、分子装置に関する研究が精力的に進められてきたが、まだまだ多くの謎が残されている。従来の分子細胞生物学の方法論だけでなく、先進のライブイメージングを駆使して、これまで見えなかったものを見る必要がある。(2) 膜交通はまた、高等動植物のさまざまな高次機能に重要な役割を果たしている。セレンディピティに頼ることなく、膜交通の本質を理解するには、精密な解析系を確立することが不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 出芽酵母とモデル植物シロイヌナズナを主な材料とし、膜交通における選別輸送の分子機構を徹底的に理解する。(2) 高等植物が示す、さまざまな形態形成や環境応答反応などの高次機能において、膜交通が果たす役割を理解する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的に変異株を単離することによって分子装置の役者を見つけ、生化学的な試験管内再構成によってその機能を解析するという、オーソドックスな分子細胞生物学の研究に加え、生きた細胞の中で起こっている現象をそのままに「見る」方法論を推進する。これまでに開発した超高感度高速共焦点レーザー顕微鏡をさらに改良、高性能化し、これを駆使する。また、輸送反応の試験管内完全再構成や人工膜1分子観察などの *in vitro* のアプローチと、さまざまな変

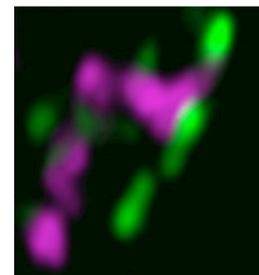
異株の利用などの *in vivo* アプローチを縦横に進めていく。

(2) 高等植物において、細胞内の膜交通が組織レベル、さらには個体レベルでの高次機能で果たす役割を理解するために、シロイヌナズナを材料にした多面的なアプローチを行う。

4. これまでの成果

(1) 膜交通の可視化による選別分子機構の解明

a) 小胞体からの小胞形成とゴルジ体形成
小胞形成部位（小胞体出口）を可視化し、高分解能ライブ観察して、その動態が小胞体膜の湾曲性に影響されることを明らかにした。また、この部位に対して、ゴルジ体のシス槽が接近し、しばし接触しては再び離れていく「キス&ラン」の挙動をとることを明らかにした。これが積荷を受け取る過程ではないかと考え、検証を進めている。



小胞体出口
(Sec13-GFP) と
ゴルジ体シス槽
(mRFP-Sed5) の
キス&ラン

b) ポストゴルジ交通

FRET イメージングによって、Sec4 GTPaseの活性を可視化した。細胞質分裂の際に、活性の高い部位が分裂面からセプチンリングの方に移動していくことを見出した。

〔4. これまでの成果 (続き)〕

(2) 生化学的再構成と1分子観察による選別分子機構の解明

顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上でCOPII小胞形成反応を再現する実験系を用いて、Sar1pによるGTPの加水分解が積荷の濃縮と非積荷の排除に必須であることを証明した。

小胞体からのCOPII小胞の形成を調節しているSed4pが、積荷と結合していないSar1pと特異的に複合体を形成し、Sar1pのGTPase活性を促進することによって積荷の濃縮を促進していることを見出した。

(3) 高等植物における膜交通の役割

a) Rab5 GTPaseをツールとした植物エンドサイトーシスの研究

植物のRab5 GTPaseには、酵母や動物までよく保存されたタイプと、陸上植物のみに見られる固有型の2種類がある。シロイヌナズナの固有型Rab5、ARA6は、欠損しても成育に目立った異常を示さず、その存在意義は長らく謎に包まれていた。陸上植物に固有のR-SNARE、VAMP727と併せての解析から、ARA6は、多胞化した後期エンドソームから細胞膜へという、植物が進化の過程で獲得した新たな輸送経路を制御していることが明らかになった。また、ARA6のエフェクターとして同定したPUF2は、2種のRab5共通の活性化因子であるVPS9aを結合し、両者の活性制御に関与する重要な役割を果たしていることが明らかになった。

b) 植物のポストゴルジ膜交通の解明

ダイナミンおよびクラスリンを用いて、エンドサイトーシスを可視化・追跡することに成功した。トランスゴルジ網(TGN)には、ゴルジ体と挙動を共にするものとしがないものがあり、またTGNのSNAREの変異体は、病原体応答に異常を示すことを明らかにした。

c) 細胞内膜交通の細胞骨格による制御

シロイヌナズナミオシンVIII, XI全メンバーの全長クローンを得、細胞内局在や運動性を調べた。生物界最速のモーターとして知られるシャジクモのミオシンモータードメインとシロイヌナズナミオシンXIのキメラを作製し、その発現が植物個体の大型化をもたらすことを明らかにした。

5. 今後の計画

(1) 理研で開発した超高感度高速高分解能共焦点レーザー顕微鏡をさらに改良し、5色同時分光を可能にする。

(2) 進行中の研究をさらに発展させると共に、先端イメージングを駆使して1つでも多くの謎を解いていく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) K. Ebine, M. Fujimoto, Y. Okatani, T. Nishiyama, T. Goh, E. Ito, T. Dainobu, A. Nishitani, T. Uemura, M. H. Sato, H.

Thordal-Christensen, N. Tsutsumi, A. Nakano, and T. Ueda (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* in press.

(2) T. Uemura, M. T. Morita, K. Ebine, Y. Okatani, D. Yano, C. Saito, T. Ueda, and A. Nakano (2010). Vacuolar/pre-vacuolar compartment Qa-SNAREs VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**:864-873.

(3) T. Uejima, K. Ihara, T. Goh, E. Ito, M. Sunada, T. Ueda, A. Nakano, and S. Wakatsuki (2010). GDP-bound and nucleotide-free intermediates of the guanine nucleotide exchange in the Rab5/Vps9 system. *J. Biol. Chem.* **285**:36689-36697.

(4) M. Fujimoto, S. Arimura, T. Ueda, H. Takanashi, Y. Hayashi, A. Nakano, and N. Tsutsumi (2010). *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:6094-6099.

(5) K. V. Tabata, K. Sato, T. Ide, T. Nishizaka, A. Nakano, and H. Noji (2009). Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J.* **28**:3279-3289.

(6) *A. Nakano and A. Luini (2010). Passage through the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**:471-478.

(7) *B. S. Glick and A. Nakano (2009). Membrane traffic within the Golgi complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**:113-132.

(8) 上田貴志 (2010) 日本植物生理学会奨励賞「植物の膜交通～分子機構と高次機能発現における役割の研究～」。

(9) 佐藤 健 (2009) 日本生化学会奨励賞「小胞体における輸送小胞形成の分子メカニズムの解析」。

(10) 中野明彦 (2008) 産学官連携功労者表彰・日本学術会議会長賞「リアルタイム3次元顕微撮像システムの開発及び細胞内分子動態リアルタイム可視化研究」。横河電機株式会社技術企画本部 御厨健太氏、日本放送協会放送技術研究所 谷岡健吉氏との共同受賞。

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hasseipl/HP/index.html>