

令和 2 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018

受付番号 201860373

氏 名 伊藤 啓子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ボルドー (国名: フランス)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

植物細胞におけるゴルジ体層板構造の形成・維持の分子機構とその生理学的意義の解明

3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

フランス国立科学研究センター(CNRS) Membrane Biogenesis Laboratory

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

ゴルジ体は、真核生物の細胞内輸送経路において中心的な役割を果たすオルガネラである。小胞体(ER)で合成されたタンパク質や脂質を最初に受け取り、選別をする“配送センター”としての役割と同時に、積荷に糖鎖修飾を施したり、特に植物においてはセルロース以外の細胞壁多糖を合成したりするなど、“糖鎖工場”としても不可欠な役割を担っている。ゴルジ体は「槽」と呼ばれる扁平な袋状の膜がパンケーキのように複数重なった、非常に特徴的な層板構造を有することで知られている。この構造には極性があり、ERから積荷を受け取る側を *cis* 側、反対に積荷を後の経路へ送り出す側を *trans* 側と呼ぶ。層板構造内では、この *cis* から *trans* への極性に沿って異なるタンパク質が異なる槽にピークを持ってグラデーション状に局在しており、槽ごとに異なる生化学的反応を行っている。この層板構造は、複雑な糖鎖修飾反応を適切な順番で効率的に実現することに寄与しているのではないかと推測されているが、例外的にゴルジ体層板構造を持たない出芽酵母のような生物種でも、糖鎖修飾反応は適切に行われている。しかしながら、出芽酵母のような少数の例外を除いて、層板構造はほぼ全ての真核生物で保存されていることから、真核生物の共通祖先が既にこの構造を持っており、それが受け継がれ続けてきたと考えられている。このように、層板構造をとることの重要性がうかがわれる一方で、層板構造の形成・維持の分子機構やその生理学的意義は、ほぼ謎に包まれている。

本研究員は、派遣前までの研究で、ゴルジ体層板構造の形成・維持機構を明らかにすることを目指して、植物細胞を用いた研究を進めてきた。一般的にオルガネラや膜交通の研究が盛んな哺乳類の細胞では、細胞中のゴルジ体が中心体付近の1箇所に集まって巨大で複雑なリボン状構造をとるという特有の現象がある。これに比べて植物の細胞では、シンプルな層板構造をとったゴルジ体が散在しており、生きた細胞内での層板構造の詳細な観察に非常に適しているからである。別々の槽に局在するタンパク質を異なる色の蛍光タンパク質で標識したタバコ BY-2 細胞で、ER-ゴルジ体間輸送の阻害剤である Brefeldin A (BFA) 処理とその除去によって輸送をコントロールし、輸送阻害によるゴルジ体の消失と再形成でゴルジ体新規形成過程を再現した。様々なゴルジ体タンパク質をマーカーとして用いた結果、多くのゴルジ体マーカーが BFA 処理によるゴ

ルジ体の消失に伴って ER に吸収される一方、一部の *cis* 槽マーカーのみが、元のゴルジ体とは大きさや形状の異なる、未知のドット状の構造体に局在することを発見した。これらの *cis* 槽マーカーは、通常状態ではゴルジ体の中でも最も *cis* 側に局在していることもわかった。また、この状態から BFA を除去してゴルジ体層板構造の再形成を行うと、まずこのドット状の構造体が集まることでゴルジ体の再形成が開始され、ER に吸収されていた他のゴルジ体構成因子を受け取って足場となることで層板構造が再形成されていく様子が観察された。さらに、このドット状構造の形成は、ER からゴルジ体への輸送を担う COPII 小胞には非依存的に起こることが明らかになった。これらのことから、このドット状構造を Golgi Entry Core Compartment (GECCO) と名付け、これまで他の槽と区別されてこなかった植物のゴルジ体の最も *cis* 側の槽の一部が、GECCO としてゴルジ体の形成に重要な性質・役割を持っているのではないかと提唱した。

本派遣期間では、このような GECCO の性質から、ゴルジ体層板構造の形成・維持に機能するタンパク質がここに局在しているのではないかと期待し、GECCO の生化学的単離と、そこに局在するタンパク質の同定・機能解析を行うこととした。そのため、ゴルジ体と非常に近い関係にあるトランスゴルジ網 (TGN) の特定のサブドメインを膜を壊さないまま単離し、そのプロテオミクス解析を行った実績のある派遣先グループを研究の場を選んだ。

モデル植物として最も広く用いられているシロイヌナズナでは、ゴルジ体-ER 輸送を制御する GTPase である ARF1 の活性化因子 GNOM LIKE 1 (GNL1) が BFA 非感受性であり、BFA 処理を行ってもタバコの細胞のようなゴルジ体の消失は起こらない。そこで、GNL1 の 1 アミノ酸置換変異によってその機能を損なうことなく BFA 感受性に改変された株 (Richter *et al.*, *Nature*, 2007) をバックグラウンドとして、GECCO に局在することがわかっている *cis* 槽マーカー RER1 に GFP を融合させたものを発現させた株を作製した。これを大量に培養したものに BFA 処理を行って破碎し、破碎液をショ糖密度勾配遠心にかけて膜画分を抽出した。この膜画分から、GFP 抗体を共有結合させた磁気ビーズを用いて、GFP-RER1B の局在する構造を、膜を壊すことなく単離した (IP 画分、図 1)。この植物体からの膜構造の免疫沈降の手順をまとめたものは、当研究員を筆頭著者として *Methods in Molecular Biology* 誌に掲載予定である (Ito *et al.*, *Methods Mol Biol*, in press)。

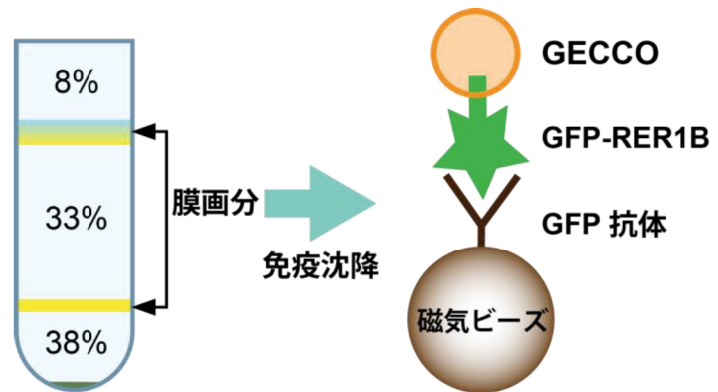


図 1. 膜構造の生化学的単離のイメージ。植物破碎サンプルからショ糖密度勾配遠心によって膜画分を分離し、GFP 抗体を用いた免疫沈降によって、GFP-RER1B の局在するゴルジ体 *cis* 槽や GECCO のみを取り出す。

こうして得られた IP 画分は、ウェスタンブロッティングによって、GFP-RER1B だけでなく他のゴルジ体 *cis* 槽マーカーも効率的に濃縮されていること、またそれに比べて ER のタンパク質は濃縮の程度が抑えられていることが確認され、目的とする膜構造が集められていることが示された。そこでこの IP 画分について、GFP 抗体を用いずビーズのみで免疫沈降を行ったサンプルをネガティブコントロールとして、ラベルフリー定量的プロテオミクス解析を行った。IP 画分で同定されたタンパク質には、ER-ゴルジ体間やゴルジ体内輸送を担う COPI 小胞のコート複合体の 7 種のサブユニット、COPII 小胞のコート複合体の 4 種のサブユニット、さらに小胞の係留を行う TRAPPI/II/III 複合体、Dsl1 複合体、COG 複合体、GARP 複合体のほぼ全てのサブユニットが含まれており、これも目的とするゴルジ体 *cis* 槽/GECCO が膜構造ごと抽出されていることを示していると考えられる。BFA 処理を行ったサンプルとそうでないサンプルを比較すると、ほとんどのタンパク質が共通しており、BFA 処理後の GECCO は、通常状態のゴルジ体の最も *cis* 側の槽と、構成タンパク質の種類という面ではほぼ変わらないことが明らかになった。この結果は、通常状態でも最も *cis* 側の槽がゴルジ体の入り口としての特殊な性質を持っているのではないかという考察を支持するものである。

ゴルジ体層板構造の形成・維持に関わる因子の探索のため、IP 画分から同定されたゴルジ体 *cis* 槽/GECCO タンパク質のうち、主に機能未知のものや、動物細胞でゴルジ体の形態維持に機能していると考えられているゴルジ体マトリックスタンパク質（ゴルジ体の膜や糖鎖修飾酵素等を取り除いた後に残るタンパク質群）と相同性のあるものを中心に、候補タンパク質を複数選んだ。これらをクローニングして、蛍光タンパク質を融合させたものをシロイヌナズナで発現させ、他のゴルジ体マーカーと比較することで細胞内局在を調べた。これまでに複数の候補タンパク質についてゴルジ体への局在を確認しており、中でも *cis* 槽マーカーとはほぼ完全に共局在するものは有力な候補と考えている（図 2）。また、これらの候補タンパク質をコードしている遺伝子の T-DNA 挿入変異体を取り寄せてスクリーニングを行い、1 種類の候補については変異体が致死であることを示す結果を得たため、RNAi 誘導によるノックダウン株の準備を進めている。今後、これら候補タンパク質の BFA 処理時の挙動や、変異体におけるゴルジ体マーカーの局在・ダイナミクスを詳細に観察していく予定である。

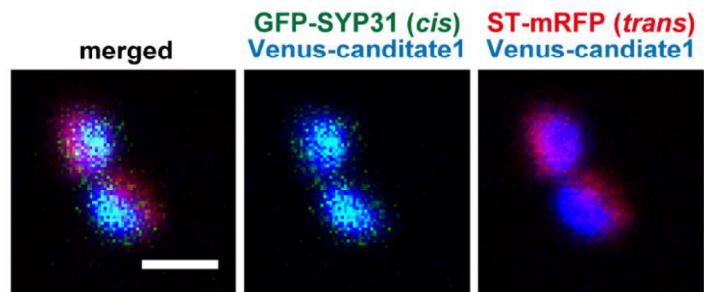


図 2. プロテオミクス解析によって得られた候補タンパク質 (candidate1、青) の、シロイヌナズナの細胞におけるゴルジ体 *cis* 槽 (緑)、*trans* 槽 (赤) マーカーとの局在比較。スケールバー = 1 μ m。

2018 年 10 月にイタリアで開催され、世界中のゴルジ体研究者が集まった The FEBS Golgi Meeting では、上記の GECCO に関する研究結果について Youth Travel Fund award に選出されてフラッシュトークを行い、動物や酵母のゴルジ体研究者と交流することができた。その際動物細胞のゴルジ体研究者とディスカッションした内容が、プロテオミクス後の候補タンパク質選定にあたって大いに役立った。

これと並行して、派遣先のグループで進められていた、TGN の膜脂質と選別輸送に関するプロジェクトにも参画した。TGN は、ゴルジ体の最も *trans* 側にある構造として定義されたコンパートメントであるが、植物ではゴルジ体から離れた TGN が観察されるなど、ゴルジ体からの独立性が明らかになりつつある。当研究員も、派遣前までの研究により、TGN の形成機構がある程度ゴルジ体から独立していることを明らかにしてきた。また、植物では TGN が初期エンドソームとして細胞膜からエンドサイトーシスされた積荷を受け取ることもわかっているが、ゴルジ体から運ばれてきた分泌経路の積荷とエンドサイトーシス経路の積荷を、同じ区画の中で仕分けしていくものの輸送経路へと送り出す分子機構は、これまでほとんど明らかになっていない。派遣先のグループでは、植物の TGN の膜にスフィンゴ脂質が多く含まれており、このスフィンゴ脂質に特異的な α -ヒドロキシ化された超長鎖脂肪酸の長さが、オーキシントランスポーターである PIN2 の TGN から細胞膜への輸送に重要であることを明らかにしていた (Wattelet-Boyer *et al.*, *Nature Communications*, 2016)。他のオーキシントランスポーターには影響を受けないものもあることから、TGN からの特定の輸送経路への仕分けのみがスフィンゴ脂質依存的にコントロールされているのではないかと考えられる。当研究員は、超長鎖脂肪酸の伸長を特異的に阻害する薬剤である Metazachlor (Mz) を用いて、スフィンゴ脂質の脂肪酸鎖を短くしたときの他の膜脂質の挙動を、脂質特異的な蛍光バイオセンサーによって観察した。その結果、フォスホイノシチドの一種であるフォスファチジルイノシ

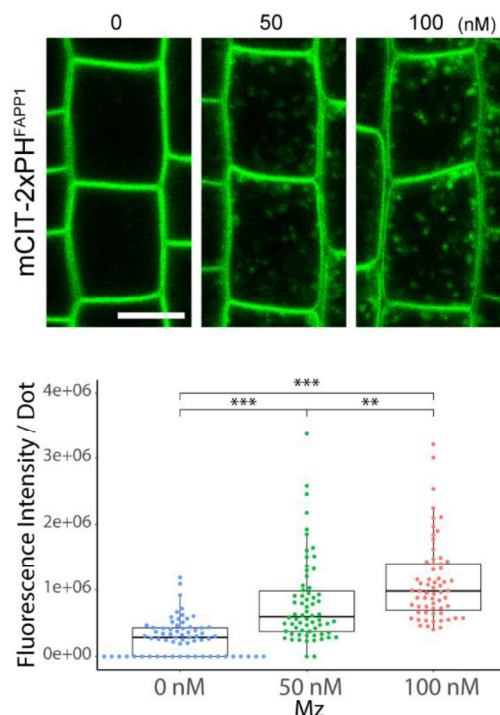


図 3. シロイヌナズナの根の表皮細胞における Mz 処理の PI4P への影響。PI4P 結合ドメイン (PH^{FAPP1}) に mCITRINE を融合させたバイオセンサーによって PI4P の局在を可視化している。Mz の濃度依存的に細胞内のドットへの PI4P の蓄積が見られる。スケールバー = 10 μ m。

トール 4-リン酸 (PI4P) が、Mz 処理によって TGN に蓄積することがわかった (図 3)。PI4P は、膜脂質の中では非常に少ない分子であるが、GTPase やアダプタータンパク質等の膜へのリクルートにより、ポストゴルジ経路の膜交通の制御に重要な役割を果たしていることがよく知られている。動物細胞では、TGN でのスフィンゴミエリンの生合成に伴って PI4 キナーゼ (PI4K) が活性化され、PI4P が局所的に合成される。この PI4P が脂質輸送タンパク質をリクルートし、ER-TGN コンタクトサイトにおいて、PI4P が TGN から ER へ、それと交換にステロールが ER から TGN へ運ばれることがわかっている。植物でも同様のメカニズムによってスフィンゴ脂質が TGN の PI4P 量の調節に関わっているのではないかと推測したが、PI4K の阻害剤処理を行っても、Mz 処理による PI4P の TGN への蓄積は変化しなかった。また、上記のゴルジ体 *cis* 槽 /GECCO と同様の手法で単離された TGN 膜の脂質組成を解析したところ、TGN のステロール量は Mz 処理によって影響されなかった。これらのことから、Mz 処理による PI4P の TGN への蓄積は、PI4K や、ER-TGN 膜コンタクトによる PI4P-ステロール交換輸送とは異なる、未知のメカニズムによって起こっていることが示唆された。

スフィンゴ脂質が PI4P の恒常性に関わる分子機構に迫るため、免疫沈降によって単離された TGN のプロテオミクスデータから、フォスフォイノシチドに関するタンパク質をピックアップし、Mz による影響を調べた。その結果、多くの TGN 局在タンパク質の量が Mz 処理下でも変化しない一方、PI4P をイノシトールリン酸とジアシルグリセロール (DAG) に加水分解するフォスホリパーゼ C (PI-PLC) が、Mz 処理によって TGN から大きく減少することが明らかになった。そこで、PI-PLC の阻害剤である U73122 でシロイヌナズナ個体を処理すると、Mz で見られるのと同様の PI4P の TGN への蓄積が起こることを発見した。これを Mz 処理と組み合わせると、U73122 が低濃度の場合はさらなる Mz 処理によって TGN の PI4P 量の増加が見られたが、高濃度の場合は Mz 処理で TGN の PI4P がさらに増加することはなかった。この結果から、スフィンゴ脂質の超長鎖脂肪酸の長さが、PI-PLC の TGN への局在変化を介して PI4P 量に影響していると考えられる。

さらに、Mz 処理によって TGN から細胞膜への PIN2 の輸送が阻害され、重力屈性に異常が現れることが既にわかっていたため、PI-PLC の阻害によっても同様の現象が見られるかを調べた。PIN2-GFP を発現させたシロイヌナズナに PI-PLC 阻害剤 U73122 処理を行うと、やはり Mz 処理と同じように PIN2 の TGN への蓄積が観察された (図 4)。これらの結果を総合して、植物の TGN では動物細胞で知られているものとは全く別のメカニズムでスフィンゴ脂質が PI4P の恒常性に関与し、それが特定の積荷タンパク質の TGN からの選別輸送に重要であることが示された。この研究結果については、2019 年 9 月にスペインで開催された ENPER (European Network for Plant Endomembrane Research) ミーティングで口頭発表を行い、さらに当研究員を筆頭著者として現在論文を投稿中である。

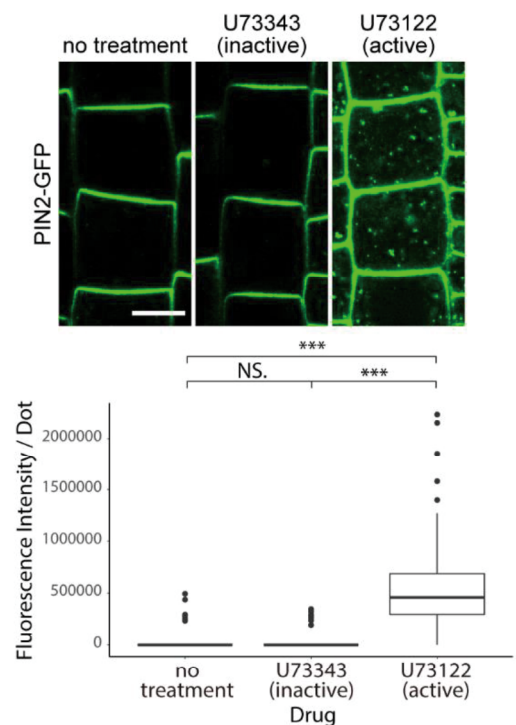


図 4. PIN2 の輸送に対する PI-PLC 阻害の影響。PI-PLC 阻害剤である U73122 処理によって PIN2-GFP が細胞内のドットに蓄積したのに対して、その非活性型アナログである U73343 処理では PIN2-GFP の局在に異常は見られなかった。スケールバー = 10 μ m。