

ゴルジ体を中心とした選別輸送機構の超解像ライブ イメージングによる完全解明

Full elucidation of sorting mechanisms in and around
the Golgi apparatus by super-resolution live imaging

課題番号：18H05275

中野 明彦（NAKANO, AKIHIKO）

国立研究開発法人理化学研究所・量子子工学研究センター・副センター長



研究の概要

自ら開発したきわめて時空間分解能の高いライブイメージング技術（SCLIM）を駆使し、小胞体→ゴルジ体→トランスゴルジ網という輸送過程を詳細に解析する。従来のモデルを徹底的に検証し、真のメカニズムの完全解明を目指す。酵母細胞、植物細胞、動物細胞という細胞内体制が異なる三者から共通原理と特徴を理解し、選別輸送のメカニズムを包括的に理解する。

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜交通、ゴルジ体、選別輸送

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の膜オルガネラ間を結ぶ輸送過程である膜交通は、分泌経路、リソソーム／液胞経路、エンドサイトーシスなど、いずれも生命機能を支える重要な過程である。積荷の選別の分子機構等についてこれまでに多数の研究が行われ、2013年のノーベル生理学医学賞の対象にもなった。しかし、生化学と遺伝学を中心にしたこれまでの研究で、本当に膜交通の真の姿が理解できているのだろうか。

2. 研究の目的

いま、ライブイメージングの威力がこの分野を席卷しつつある。動態理解のためには、生細胞を観察できる光学顕微鏡技術の革新が求められる。我々はきわめて高い時空間分解能が不可欠であることを早くから認識し、スピニングディスク共焦点法と高感度高速検出系を組み合わせ、数学的処理によって超解像観察を可能にする方法論を開発してSCLIMと名づけた。最近になって、検出系の感度を劇的に向上させることに成功し、生細胞内の小胞の挙動を高速3Dで追うことを可能にした。この世界に冠絶する技術で、明確な問いを発したい。

ゴルジ体とその周辺は、細胞内で最も重要な選別輸送センターである。その輸送の一連の流れをシームレスに4Dで可視化し、細胞内輸送における「選別と輸送」の仕組みを徹底的に理解することを目指す。

3. 研究の方法

主たる方法論はSCLIMを用いた超解像高速ライブイメージングであるが、その裏付けとなる生化学実験を確実にし、変異体の作製、利用など、遺伝学も駆使していく。酵母、植物、動物という異なる生物種の細胞におけるメカニズムを比較検討し、共通点と独自の特徴を理解する。以下の研究を進める。

酵母細胞を用いた研究

1) ゴルジ体 *cis* 槽による小胞体からの積荷の受け取り 2) ゴルジ槽間での積荷の受け渡し 3) TGN での複数経路の仕分けの時空間的制御

植物を用いた研究

1) ゴルジ体初期区画 GECCO による小胞体からの積荷の受け取り 2) ゴルジ体層板内での積荷の輸送 3) TGN での複数経路の仕分けの時空間的制御

動物を用いた研究

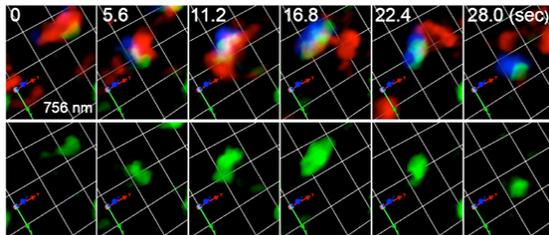
1) 小胞体-ゴルジ体中間区画 ERGIC による小胞体からの積荷の受け取り 2) ゴルジ体層板内での積荷の輸送 3) TGN での複数経路の仕分けの時空間的制御 4) 神経軸索におけるゴルジ体の存在と機能の証明 5) 神経軸索ガイダンスにおけるポストゴルジ機能の役割

4. これまでの成果

3で述べた研究計画に沿って順調に研究が進んでいる。その中で特筆すべきものについて述べる。

酵母細胞を用いた研究

ゴルジ体の槽成熟の証明において、唯一未解決で残っていた積荷の挙動を可視化した重要な研究結果を発表した。槽成熟の過程で、TGN まで到達した積荷の一部が、一時的に前の区画に送り返されるような現象も見出した。(*J. Cell Biol.* 2019)

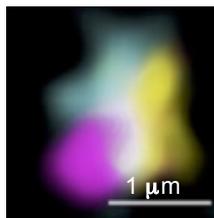


積荷を保持したゴルジ槽が成熟する様子

また、TGN でのタンパク質選別の時間的制御について、多色 SCLIM 観察によって詳細な解析を行った結果、TGN を通過する積荷タンパク質の入口と出口が時空間的に明瞭に区画化されていることを示した。(*J. Cell Sci.* 2019)

植物を用いた研究

シロイヌナズナの TGN の中に複数のゾーンが存在し、分泌方向では AP-1 とクラスリンが、液胞方向では AP-4 がはたらき、明瞭に異なるダイナミクスを見せることを SCLIM 観察で示した。(論文投稿中)



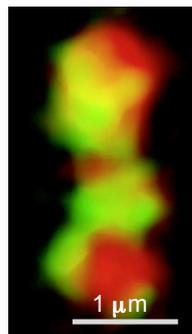
植物 TGN におけるゾーンの分離

動物を用いた研究

小胞体出口 ERES における COPII タンパク質およびコラーゲン分泌に重要な分子群の局在を SCLIM 観察によって詳細に解析し、ERES 内のサブドメインの存在を明らかにした。(*Sci. Rep.* 2019)

高等動物細胞において、ゴルジ体に近接した TGN と独立した TGN が存在するが、後者がリサイクリングエンドソームとほぼ同一のものであり、またショウジョウバエでも同様であることを示した。(*J. Cell Sci.* 2020)

ニワトリ胚の感覚神経軸索の SCLIM 観察を行い、軸索や成長円錐にゴルジ体構造が存在し、ダイナミックな活動を行っていることを明らかにした。(論文準備中)



神経軸索成長円錐に見出されたゴルジ体

5. 今後の計画

生きた細胞内の小胞輸送をありのままに目で見ることが実現できているので、今後も予定した研究計画通り、酵母、植物、動物という異なる生物種のゴルジ体とその周辺オルガネラについて、徹底的な観察を行い、従来の生化学や遺伝学の実験結果に基づいて想像されていたモデルを一つ一つ検証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

<主たる原著論文>

Syara Fujii, Kazuo Kurokawa, Ryota Inaba, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Tago, Yuri Nakamura, Akihiko Nakano, *Takunori Satoh, and *Akiko K. Satoh. Recycling endosomes attach to the trans-side of Golgi stacks in *Drosophila* and mammalian cells. *J. Cell Sci.* **133**:jcs236935 (2020).

*Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano. Spatiotemporal dissection of the trans-Golgi network in budding yeast. *J. Cell Sci.* **132**:jcs231159 (2019). (selected as a First Person and featured as a Research Highlight of the issue)

Miharu Maeda, *Kazuo Kurokawa, Toshiaki Katada, Akihiko Nakano, and *Kota Saito. COPII proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions. *Sci. Rep.* **9**:7346 (2019).

*Kazuo Kurokawa, Hiroko Osakada, Tomoko Kojidani, Yasuyuki Suda, Haruhiko Asakawa, Tokuko Haraguchi, and *Akihiko Nakano. Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus in living yeast cells. *J. Cell Biol.* **218**:1602-1618 (2019). (selected as an outstanding article by JCB and appeared in July Highlights from JCB: Lipid and Membrane Biology Collection)

*Tomohiro Uemura, Ryohei Thomas Nakano, Junpei Takagi, Yiming Wang, Katharina Kramer, Iris Finkemeier, Hirofumi Nakagami, Kenichi Tsuda, Takashi Ueda, *Paul Schulze-Lefert, and Akihiko Nakano. A Golgi-released subpopulation of the trans-Golgi network mediates protein secretion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **179**:519-532 (2019).

7. ホームページ等

<http://sclim.riken.jp>