

中野生体膜研究室 Molecular Membrane Biology Laboratory

主任研究員 中野明彦
NAKANO, Akihiko

真核生物の細胞内は緻密に分化した膜系（オルガネラ）で満たされ、その多くがダイナミックな膜の流れ（メンブレントラフィック）によって結ばれている。そのメンブレントラフィックを担うのが小胞輸送である。本研究室では、メンブレントラフィックの中でもとくに、輸送小胞の形成と融合のメカニズム、またその過程におけるタンパク質の分子認識と選別のメカニズムを遺伝子レベル、分子レベルで解明することを目標にして、おもに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究を行っている。さらに、小胞輸送の過程が細胞の極性や分裂方向を決定する上で重要な役割を果たしていることに注目し、多細胞生物の組織・器官形成、環境応答などの高次機能におけるメンブレントラフィックの意義を明らかにしていくことをめざす。

1. メンブレントラフィック経路における小胞形成・融合の分子機構の研究（黒川，松浦^{*1}，佐藤^{*2}，中野）

小胞体上の積荷タンパク質は、COPII 小胞に選択的に取り込まれて輸送されていく。このダイナミクスを解析するため、人工脂質平面膜上に COPII 小胞形成反応を再現して 1 分子観察用の顕微鏡を用いて解析を行った。COPII 小胞形成因子の添加により、蛍光標識した積荷タンパク質が COPII 小胞へ取り込まれる様子が 1 分子レベルで観察され、積荷の濃縮には Sar1p による GTP 加水分解が必要であることが明らかとなった。また、小胞体からの COPII 小胞形成過程とゴルジ体の形態形成に焦点を置き、COPII のコートタンパク質である Sec24p, Sec13/31p, および Sec16p の可視化を行った。さまざまな輸送の変異株や低分子量 GTPase Sar1p の mutant を用いた解析の結果、出芽酵母 *S. cerevisiae* にも ER exit site と同様の機能をもつ構造が存在することが示唆された。この構造はゴルジ体の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられる。

2. メンブレントラフィックにおけるタンパク質の選別機構の研究（平田，黒川，川崎（関谷）^{*1}，中野）

Rab ファミリーは小胞輸送のさまざまな段階を制御する分子スイッチであり、時間的空間的に高度に制御されている。ゴルジ体からの小胞形成と積み荷選別機構の理解をめざして、Ypt31p/32p とその標的分子 Sec2p の相互作用を FRET イメージングによって可視化した。Ypt31p は出芽時には芽の先端でのみ Sec2p と複合体を形成し、分裂時には分裂隔壁で複合体を形成することを明らかにした。ゴルジ体トランス領域およびトランスゴルジ網はタンパク質の行き先を決定する極めて重要な役割を担う。本年度はゴルジ体からの小胞形成、選別輸送に必須な分子装置の *in vivo* の動態を高速高感度共焦点顕微鏡により解明する試みを行った。とくに Ypt31p/Ypt32p, Sec7p, Sec4p, Rcy1p に着目し、イメージングを実現した。

液胞型 ATPase (V-ATPase) は、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームなどの内腔を酸性化するプロトンポンプである。10 数種類のサブユニットを含む複合体型膜タンパク質で、生合成過程における複合体形成は小胞体とゴルジ体でおきると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。出芽酵母では、V-ATPase の生合成に必要なタンパク質が複数同定されている。これらと配列相同性 (15 ~ 20%) を示すタンパク質が多細胞生物に存在することに注目し、それぞれを出芽酵母で発現して解析した。その結果、サブユニットの会合や輸送小胞への取り込みに必要である小胞体膜タンパク質 (Vma21p) のオルソログが動物や線虫などにも存在すること示唆する結果を得た。

3. 高等植物の形態形成・高次機能におけるメンブレントラフィックの役割の研究（安部，齊藤，富永，井藤^{*3}，庄田^{*4}，中野）

植物の発生・成長過程における細胞極性の形成・維持におけるメンブレントラフィックの役割を明らかにするため、動物において極性の形成に関与すると報告されている Rab11 GTPase のシロイヌナズナホモログの解析を行った。25 個のシロイヌナズナ Rab11 GTPase のうち、シスゴルジ体に局在している RabA1i のノックアウト変異体では、胚発生過程で細胞分裂に異常が生じ、その後の発生が抑制されることがわかった。

これまで、高等植物の液胞膜上に生じるサブ領域様の構造 bulb を発見しその性状を記述してきた。今年度は、bulb に関する遺伝学的なアプローチに着手した。AtVAM3 は液胞への輸送経路に関与する SNARE 分子で、シロイヌナズナの欠損変異体 (*vam3-1*) は特徴的な巨視的な表現型を示す。それ自身のプロモーターで GFP 融合タンパク質を発現することで表現型は相補され、またこの形質転換シロイヌナズナでは液胞膜も bulb も可視化される。これを親株に、EMS により変異を誘発し、M1 個体から独立に M2 種子を回収した。その過程で、*vam3-1* に酷似した表現型を示すものも含め、多数の (>240 個体) 巨視的な表現型を示すラインを単離した。その大多数は、*vam3-1* が示す花成遅延や葉の形態異常よりもややマイルドな表現型として認識された。

植物細胞では、モータータンパク質ミオシン XI による能動的輸送が、複雑なメンブレントラフィックの制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。シロイヌナズナには 13 種のミオシン XI メンバーが存在する。各メンバーの機能や相互関係の詳細な解析は、ミオシン XI による制御機構の解明に不可欠である。メンバーのうち 6 種において全長のクローニングに成功した。さらに細胞内での可視化を行うために、ミオシンの運動に影響がないとされるモータードメイン N 末端に蛍光タンパク質を融合させた。

その他、強力なライブイメージングのシステムを用いて、さまざまな共同研究を進めた。葉緑体定位運動に関わると予想される cp-actin の動態を、これまでの 10 倍以上の時間分解能 (1 frame / 300 msec) で追跡することに成功した。これは基礎生物学研究所の和田正三教授との共同研究によるものである。H3.3 遺伝子のゲノム断片と mRFP の融合タンパク質の発現で 2 個の精細胞が赤色に可視化されたシロイヌナズナを用い、片方の精細胞だけ褪色させることにより、二つの精細胞の挙動の違いを捉える試みを行った。また、2 個の精細胞を緑と赤で染め分けて認識するために、H3.3 遺伝子のゲノム断片に光刺激型の蛍光タンパク質 mkikgr を融合し、発現するような形質転換シロイヌナズナを作製した。花粉の中で精細胞だけが可視化され、光刺激により赤色に変換することができた。これは名古屋大学大学院理学研究科の東山哲也教授および東京大学大学院理学系研究科の

浜村有希氏との共同研究によるものである。ミトコンドリアの分裂に關与すると予想されるダイナミン分子の欠損変異体において、巨大な網目状のミトコンドリアが生じていることを3次元的に捉えた。これは東京大学大学院農学生命科学研究科の堤伸浩教授、有村慎一博士、藤本優氏との共同研究によるものである。

4. 高等動物の分化過程における小胞体の動態と小胞体ストレスシグナルが果たす役割の研究（森島，中野，中西*³（先端技術開発支援センター））

哺乳類の筋分化初期に筋芽細胞内で発生する小胞体ストレスによって、小胞体膜上にある ATF6 が COPII 依存的にゴルジ体へ運ばれて活性化し転写調節因子として機能するようになる。このシグナル伝達によってオートクリン性の生存因子（IGF-II）と細胞内抗アポトーシスタンパク質のレベルが低下することが示唆された。

5. 植物の環境応答に關与するABA応答の解析（平山，坪井*⁴）

環境応答に關与する植物ホルモン ABA の情報伝達経路を明らかにする目的で、シロイヌナズナの変異株を分離、解析を行っている。本年度は、ABA に高感受性を示す優性の変異株 *ahg12* の原因遺伝子を同定し、プロテアソームの 19S サブユニットの構成因子の一つをコードすることを見いだした。ABA 応答に關与する PP2C (AHG1, AHG3) の二重破壊株を用いて、2D-DIGE による標的タンパク質の同定を試み、タンパク質の抽出から泳動までの条件を確定した。ABA 応答遺伝子の発現に影響を及ぼす化合物のスクリーニングを行い、発現を阻害する化合物の候補を得た。また、polyA 特異的 RNA 分解酵素の変異株 *ahg2-1* の網羅的転写物解析を行い、標的遺伝子の候補を得た。さらに抑制変異株の詳細な解析を行った。また、NMR メタボローム解析により、シロイヌナズナエタノール感受性変異株の代謝解析を行った。

*¹基礎科学特別研究員，*²客員研究員，*³協力研究員，*⁴協力技術員

1. Molecular mechanisms of vesicle formation and fusion in the secretory pathway

Selective protein export from the ER is mediated by COPII vesicles. We developed a method for direct observation of fluorescently labeled cargo molecules reconstituted in a horizontal planar bilayer membrane by TIRF microscopy during COPII vesicle formation. Our data shows that Sar1p GTPase cycles play a role in cargo concentration into COPII vesicles. With laser confocal scanning microscope, we visualized the COPII budding site on the ER membrane. Through the observation of the *sec* and *SAR1* mutants defective in ER-to-Golgi transport, we suggested the existence of the structure that is equivalent to the ER exit sites (ERES) in *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover, we found that the localization pattern of the ERES was important for formation of the Golgi cisternae.

2. Mechanisms of protein sorting during membrane trafficking

Rab GTPases are crucial regulators in various stages of vesicular traffic. These activities are regulated temporally and spatially in living cells. To understand the traffic mechanisms from the Golgi apparatus, we visualized the interaction of Ypt31p, the yeast GTPases and its effector, Sec2p by FRET-based imaging technique. Ypt31p interacted with Sec2p at the tip of small bud early in the cell cycle and at the division septum late in the cycle. In order to understand the molecular mechanisms of TGN dynamics, we carried out the imaging of the GFP- and mRFP- fusion proteins. Especially we focused on TGN proteins and proteins located on secretory vesicles.

The vacuolar-type ATPase (V-ATPase) is a multi-subunit proton pump that acidifies various endomembrane compartments in eukaryotic cells, including the Golgi apparatus, endosomes, and lysosomes. The assembly of V-ATPase complex is thought to occur during its biosynthetic transport through the ER and the Golgi, and in yeast, several non-subunit proteins (assembly factors) have been identified to be required for that process. We cloned animal and plant cDNAs coding for proteins similar to the yeast assembly factors (15~20% identities), and found that Vma21, one of the ER-resident chaperone for the V-ATPase, is conserved among different species.

3. Roles of membrane traffic in physiology and development of higher plants

To understand the roles of vesicular traffic in the establishment and maintenance of polarity during development in plants, we analyzed *Arabidopsis thaliana* Rab11 GTPases, which are known to regulate the polarity of mammalian cells. Among 25 members of Rab11 GTPases in *A. thaliana*, RabA1i was localized at *cis*-Golgi and its knockout mutants showed abnormal cell division during embryogenesis leading to the arrest in development.

We have identified a putative subregion in vacuolar membrane, bulb, and characterized its complex three-dimensional configuration and intriguing features. For visible screening, we generated a mutant pool from bulb-visualized *Arabidopsis* GFP marker line by EMS mutagenesis. We harvested M2 seeds from each M1 plant independently, and in the course of harvesting, we isolated >240 M1 plants that showed macroscopic phenotype.

In plant cells, it has been indicated that the active transport driven by the motor protein “myosin” plays important roles in regulation of membrane trafficking. In *A. thaliana*, there are 13 members of myosin XI. Detailed examination of functions and relationships between these members are essential for revealing regulation mechanisms of membrane trafficking by myosin XIs. We cloned full length DNAs of 7 members of myosin XI. In order to visualize them in the cells, fluorescent proteins were fused at N-terminus of motor domain where the motile activity of myosin XI would not be affected.

4. Control of cell differentiation by the endoplasmic reticulum

Apoptosis of myoblasts during myoblast differentiation is regulated by an autocrine growth factor and an anti-apoptotic protein.

5. Analysis of abscisic acid response mechanisms

To understand the signaling pathway of phytohormone, ABA, we are studying several *Arabidopsis* mutants that show

abnormal ABA response. We identified the *AHG12* gene that encode a subunit of 19S proteasome complex. We established a proteome approach for AHG1, AHG3 PP2C target analysis. We started screening chemicals that affect ABA signaling pathway and obtained a candidate that inhibits it. We performed a microarray analysis of the *ahg2-1* mutant and obtained several putative candidates for PARN. We analyzed metabolic pathways of ethanol in an *Arabidopsis* ethanol hypersensitive mutant.

Research Subjects and Members of Molecular Membrane Biology Laboratory

1. Molecular mechanisms of vesicle formation and fusion in the secretory pathway
2. Mechanisms of protein sorting during membrane trafficking
3. Roles of membrane traffic in physiology and development of higher plants

Staff

Head

Dr. Akihiko NAKANO

Members

Dr. Nobuhiro MORISHIMA

Dr. Takashi HIRAYAMA

Dr. Hiroshi ABE

Dr. Ryogo HIRATA

Dr. Chieko SAITO

Dr. Kazuo KUROKAWA

Dr. Motoki TOMINAGA

Dr. Kumi MATSUURA*1

Dr. Mariko SEKIYA-KAWASAKI*1

Dr. Jun ITO*2

Ms. Keiko SHODA*3

Ms. Yuri TSUBOI*3

*1 Special Postdoctoral Researcher *2 Contract Researcher *3 Contract Technical Scientist

Collaboration with

Dr. Keiko NAKANISHI (Advanced Development and Supporting Center)

Visiting Members

Dr. Takashi UEDA (Graduate School of Science, University of Tokyo)

Dr. Tomohiro UEMURA (Graduate School of Science, University of Tokyo)

Dr. Satoshi NARAMOTO (Ghent University, Belgium)

Mr. Tatsuaki GO (Graduate School of Science, University of Tokyo)

Mr. Hirofumi YAMAGUCHI (Graduate School of Science, University of Tokyo)

Ms. Sato KIMURA (Graduate School of Science, University of Tokyo)

Dr. Takaaki ONO (Ibaraki University)

Dr. Ken SATO (University of Gunma)

Dr. Ken SATO (Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo)

Dr. Masaki TAKEUCHI (Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences)

Dr. Natsuko KAGEYAMA-YAHARA (Toyama University)

Dr. Hironori HIGASHIO (Tokushima University)

Dr. Satoko ARAKAWA (Tokyo Medical and Dental University)

Dr. Koh-ichi NIHEI (Graduate School of Medicine, University of Tokyo)

Mr. Akira ICHIHARA (Yokogawa Electric Corp.)