

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。当研究室では、メンブレントラフィックの中でもとくに分泌経路における小胞輸送の役割に焦点を当て、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主に出芽酵母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、とくに高等植物の組織・器官形成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. 分泌経路における小胞形成・融合の分子機構の研究(佐藤(健)(12), 斉藤(由)^{*1}, 村上^{*1}, 矢原^{*2}, 上田, 佐藤(健)(10), 山本^{*3}, 中野)

小胞輸送における、可溶性積み荷タンパク質の輸送小胞への積み込み機構を解明するため、酵母由来の試験管内再構成系を用いて解析を行った。小胞体-ゴルジ体間における輸送小胞の形成途上段階において、被覆タンパク質と可溶性積み荷タンパク質が複合体を形成するための最適な条件を見いだした。このことから、可溶性積み荷タンパク質は、被覆タンパク質と直接、あるいは何らかの因子を介して輸送小胞に選択的に濃縮されていると考えられる。

小胞体からの COPII 小胞形成に必須な GTPase, Sar1p の調節因子の候補として Sed4p の機能の遺伝生化学的解析を行った。その結果、Sed4p は小胞の形成が完了するまで Sar1p の GAP, Sec23p を阻害し、その結果として GTP の加水分解を阻害するというモデルを支持するデータを得た。

一方、小胞体からの輸送小胞形成における *SEC12* の調節機構を探る目的で遺伝学的に獲得した Sec12p の調節因子の候補の1つ、カゼインキナーゼ IHrr25p を用いて two-hybrid 法を行い、新奇遺伝子を含む5つの候補因子を得た。そのうちの1つ Ady1p を過剰発現させたところ *sec12* 温度感受性株(制限温度 30°C)の細胞増殖が 33°C まで回復した。Ady1p は Hrr25p の活性化状態にかかわらず強固に結合していることが two-hybrid 法、共免疫沈降法、GST 融合タンパク質を用いた pull-down assay 法により分かった。また新奇遺伝子のうちの1つは過剰発現よりむしろ欠損によって *sec12* 変異株の成長を 35°C まで回復でき、*ADY1* とは反対の性質を示した。

Sar1p と類縁の small GTPase, Arf についても遺伝生化学的な研究を行った。出芽酵母 *ARF1* の温度感受性変異株を単離し、その変異株について遺伝学および生化学的な解析を行った。得られた複数の変異株は、アレルによって損傷の生じている輸送過程や制限温度下での微細構造が明らかに異なり、また遺伝子内相補が成り立つグループに分類することができた。これらの結果から Arf が実際に生体内で複数の輸送機構を制御していることが示された。現在 *ARF1* による輸送系の制御メカニズムを調べるために、*arf1* 温度

感受性変異株をツールとして用い、*ARF1* と遺伝的相関関係のある因子のスクリーニングなどを進めている。

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(佐藤(健)(10), 佐藤(美)^{*4}, 梅林^{*4}, 山本^{*3}, 中野)

出芽酵母の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 Sec12p や Sec71p などの一群の小胞体膜タンパク質の膜貫通領域(TMD)を認識し、ゴルジ体から形成される COPI 小胞を介して小胞体へと送り返す新たな分子選別装置である。この Sec12p の TMD におけるアミノ酸配列について変異解析を行い、クロスリンク法によって Rer1p による認識に重要なモチーフの検索を行った。その結果、Rer1p との相互作用には特定のアミノ酸配列というよりはむしろ、Sec12p の TMD における極性残基の存在とその空間的な位置が重要であることを突き止めた。また、Sec12p とは正反対のトポロジーを持つ Sec71p の TMD についても同様の結果を得た。また一方で、緑色蛍光タンパク質(GFP)と Rer1p の融合タンパク質(GFP-Rer1p)を構築し、Rer1p 自身のゴルジ体局在化に重要な領域について詳細な解析を行った。その結果、Rer1p のカルボキシル(C)末端側細胞質領域における dilysine 様配列と2つのチロシン残基が Rer1p の機能と動態に重要であり、この配列に変異が入ると液胞へと輸送されてしまうことを見いだした。さらに、この C 末端領域が COPI 複合体と相互作用すること、また COPI 複合体に欠損を持つ変異株では GFP-Rer1p が液胞へと輸送されてしまうことなどから、Rer1p はゴルジ体-小胞体間、ゴルジ体槽板間をダイナミックにリサイクリングしながらゴルジ体に局在化しており、その動態には Rer1p の C 末端領域を介した COPI 複合体の働きが重要であると結論した。

Sec12p の局在異常を引き起こすもう1つの原因遺伝子として同定した *RER2* は、これまで未同定であったドリコール合成系の鍵酵素、*cis*-プレニルトランスフェラーゼをコードしている。さらに、酵母のもう1つのアイソザイムの遺伝子を *rer2* 変異株の多コピーサプレッサー、*SRT1* として同定した。しかし、*Rer2p* が増殖期に合成され小胞体に局

在するのに対し, Srt1p は定常期で合成が誘導され, 定常期において発達してくる lipid particle に局在した。また, 2つの酵素では合成する産物の鎖長も異なっていたことから, 何らかの機能分担をしていることが考えられた。本研究は, 藤崎真吾博士, 西村行進教授(東邦大・理)との共同研究として行ったものである。

生体膜の構成成分である脂質が分泌タンパク質の選別輸送に果たす役割について解析を行った。エルゴステロール合成に欠損を示す *erg6* 変異株では, トリプトファンパーミアーズである Tat2p が細胞膜まで正しく輸送されないことをこれまでに明らかにした。この変異株では Tat2p がオルガネラの膜から内腔側に転移しており, multivesicular body (MVB) と呼ばれる経路に誤って選別されることを強く示唆する結果を得た。MVB 経路は成長因子の受容体などをエンドソームの膜から内腔側に取り込んで細胞質から完全に隔離し, シグナル伝達の脱感作を保証する役割があることが知られている。本研究によって MVB 経路へのタンパク質の選別が膜のステロール含量や組成によって影響を受けることが初めて示された。

3. 高等植物の形態形成におけるメンブレントラフィックの役割の研究

(1) 高等植物の小胞輸送に関する因子の研究(竹内^{*4}, 上田, 松田^{*4}, 佐藤(健)(10), 庄田^{*3}, 中野)

シロイヌナズナの出芽タイプの small GTPase である AtSar1 と AtArf1 の GFP との融合遺伝子を作製し, シロイヌナズナの培養細胞において一過的に発現させて観察した。GFP-AtSar1 は小胞体膜上に, AtArf1-GFP は細胞質とゴルジ体と考えられる点状の構造にそれぞれ局在していた。優性阻害型変異 AtArf1 の効果を検討するために, 培養細胞において GFP と融合させたゴルジ体膜タンパク質と優性阻害型 AtArf1 を共発現させた。その結果, このマーカーが, 優性阻害型 AtSar1 を発現させた場合と同様に, 小胞体に局在化されることを明らかにした。現在, 優性阻害型 AtArf1 の発現が, このような小胞体-ゴルジ体間の順方向輸送に対する損傷のみならず, 逆方向輸送にも損傷を持つかどうかに関して詳細に検討している。

高等植物に特異的に存在する Rab/Ypt GTPase, Ara6 について, その細胞内局在化機構と機能の解析を行った。その結果, Ara6 は植物細胞内においてエンドソームの融合を制御しており, アミノ末端の脂質修飾, ヌクレオチドの結合, カルボキシル末端の数アミノ酸の協調的な働きにより, エンドソームに局在していることが明らかとなった。また, 植物細胞内には, Ara6 が局在するエンドソームと局在しないエンドソームの少なくとも二種の異なるエンドソームが存在することも示唆された。本研究は, 内宮博文教授, 山口雅利氏(東大・分生研)との共同研究として行ったものである。

酵母 *sec15* 変異を抑圧するシロイヌナズナ遺伝子として単離した *RMA1* 産物の機能を解析した。*RMA1* 産物はリングフィンガーモチーフを有しており, ユビキチンリガーゼ(E3)であることが示唆されていたが, 実際に Rma1 が Ubc4/5 と協調して働く E3 であることを生化学的に明らかにした。また, リングフィンガーモチーフがその E3 活性に必要であることも示した。本研究は田中啓二博士, 鈴木俊

顕博士(都臨床研)との共同研究として行ったものである。

(2) 高等植物の分泌経路の可視化と小胞輸送損傷突然変異体の単離(安部, 齊藤(知)^{*4}, 上田, 庄田^{*3}, 中野)

スポラミンは N 末端のプロペプチド依存的に液胞へ運ばれる。スポラミン-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換植物を作製し, 液胞へのメンブレントラフィックを可視化した。スポラミン-GFP 発現個体における GFP の蛍光局在は光条件依存的な細胞内パターンを示した。黄化芽生えや明所から暗所に移した植物個体では, スポラミン-GFP の蛍光は主に液胞内腔に局在したが, 暗所から明所に移した植物個体では, 液胞内腔の蛍光が消失した。この現象は, 液胞へ輸送されたスポラミン-GFP がその接続部付近で速やかに切断され, スポラミン部分は比較的安定に液胞に蓄積するのに対して, GFP 部分は光条件依存的に分解されるために起こることが示唆された。GFP 部分の液胞内腔での分解は青色光が促進することが分かった。

液胞の水チャネル γ -TIP と GFP との融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて, リアルタイムで液胞の動態を観察した。発達途中の子葉や胚軸で, しばしば液胞内に大きな陥入が生じて, 球状やチューブ状の構造を取っているのが観察された。そのうち球状の構造(“bulb”)は, 直径が 1~5 μm で, GFP マーカーの蛍光強度は外側の液胞膜の約 3 倍だった。野生型の子葉を金属圧着型の急速凍結により固定し電子顕微鏡観察したところ, 表皮細胞において良好な像が得られ, bulb と考えられる液胞内の構造が観察された。連続切片像からの立体構築により, bulb は時に 2 枚の液胞膜に挟まれた細胞質が液胞内に陥入するような複雑な構造を取り, 狭い領域で外側の液胞膜と連続していることが明らかになった。本研究は, 古谷雅樹博士, 久田明子氏(日立基礎研), 黒岩常祥教授(東大・理・生物科学), 和田 洋助教授(阪大・産研)との共同研究によるものである。

^{*1} 共同研究員, ^{*2} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*3} 協力研究員, ^{*4} 基礎科学特別研究員

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Sato K., Sato M., and Nakano A.: “Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatamer”, *J. Cell Biol.* **152**, 935-944 (2001). *

Hopkins B. D., Sato K., Nakano A., and Graham T. R.: “Introduction of Kex2 cleavage sites in fusion proteins for monitoring localization and transport in yeast secretory pathway”, *Methods Enzymol.* **327**, 107-118 (2000). *

Yahara N., Ueda T., Sato K., and Nakano A.: “Multiple roles of Arf1 GTPase in the yeast exocytic and endocytic pathways”, *Mol. Biol. Cell* **12**, 221-238 (2001). *

Takeuchi M., Ueda T., Sato K., Abe H., Nagata T., and Nakano A.: “A dominant negative mutant of Sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells”, *Plant J.* **23**, 517-525

(2000). *

Nagata N., Saito C., Sakai A., Kuroiwa H., and Kuroiwa T.: "Unique positioning of mitochondria in developing microspores and pollen grains in *Pharbitis nil*: Mitochondria cover the nuclear surface at specific developmental stages", *Protoplasma* **213**, 74–82 (2000). *

(総説)

中野明彦, 村上明子: "小胞輸送を制御するカゼインキナーゼ", *医学のあゆみ* **190**, 760–761 (1999).

中野明彦: "第8章 メンブレントラフィックのダイナミクス: 膜の流れに乗って右へ左へ...", *タンパク質の一生: タンパク質の誕生, 成熟から死まで*, 中野明彦, 遠藤斗志也(編), 共立出版, 東京, pp. 106–121 (2000).

中野明彦: "メンブレントラフィックのダイナミズム", *バイオサイエンスとインダストリー* **59**, 81–82 (2001).

中野明彦: "研究室・研究所めぐり (24): 理化学研究所・生体膜研究室", *遺伝* **54**, 95–98 (2000).

松田憲之, 中野明彦: "植物細胞の極性形成と小胞輸送", *細胞工学*, 秀潤社, **19**, 1017–1022 (2000).

松田憲之, 中野明彦: "植物ユビキチンシステム研究の新展開", *実験医学* **19**, 205–209 (2001).

佐藤健, 中野明彦: "3章 GFPの生物種別の適用例1: 酵母", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座* **3**, pp. 60–64 (2000).

竹内雅宜, 上田貴志, 中野明彦: "3章 GFPの生物種別の適用例2: 植物培養細胞", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座* **3**, pp. 65–68 (2000).

齊藤知恵子, 中野明彦: "4章 GFPの検出およびイメージング3: GFPイメージのリアルタイム観察システムの一例", *実験医学別冊: ポストゲノム時代の実験講座* **3**, pp. 177–180 (2000).

(その他)

中野明彦: "小胞輸送による膜のトラフィック", *細胞内の物質輸送メカニズム*, 藤原研司, 石井裕正, 佐藤信紘, 荒川奉行, 井廻道夫(編), 自然科学社, 東京, pp. 13–27 (2000).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Sato K., Sato M., and Nakano A.: "Physical interaction of Rer1p with a transmembrane domain of Sec12p and its COP I-dependent Golgi localization", 19th Gordon Conf. on Lysosomes, (Proctor Academy), Andover, USA, June (2000).

Takeuchi M., Sato K., Ueda T., Abe H., and Nakano A.: "Manipulation of vesicular trafficking in plant cells: Dominant negative mutants of plant Sar1 block the ER-to-Golgi protein transport", Ann. Meet. of the American Soc. of Plant Physiologists (Plant Biology 2000), San Diego, USA, July (2000).

Saito C., Abe H., and Nakano A.: "Real-time observation of vacuolar dynamics in *planta*", Ann. Meet. of the American Soc. of Plant Physiologists (Plant Biology 2000), San Diego, USA, July (2000).

Abe H., Saito C., and Nakano A.: "Screening of mutants

with altered localization of vacuolar targeting GFP-fusion proteins in *Arabidopsis thaliana*", Ann. Meet. of the American Soc. of Plant Physiologists (Plant Biology 2000), San Diego, USA, July (2000).

Ueda T., Nakano A., Yamaguchi M., and Uchimiya H.: "Unique features of Ara6, a plant-specific Rab/Ypt GTPase implicated in endosomal functions", Ann. Meet. of the American Soc. of Plant Physiologists (Plant Biology 2000), San Diego, USA, July (2000).

Nakano A., Sato K., and Sato M.: "Golgi membrane protein localization by dynamic vesicle recycling", Int. Congr. on Differentiation & Cell Biology, Gold Coast, Australia, Sept. (2000).

Umabayashi K. and Nakano A.: "Ergosterol synthesis is required for regulated transport of tryptophan permease to the yeast cell surface", American Soc. for Cell Biology 40th Ann. Meet., San Francisco, USA, Dec. (2000).

Nakano A., Sato K., Sato M., and Umabayashi K.: "Dynamic membrane protein sorting in the yeast secretory pathway", Joint Swiss-Japanese Scientific Seminar on Synthesis and Trafficking of Glycolipids and Glycolipid Anchored Proteins, Les Diablerets, Switzerland, Mar. (2001).

(国内会議)

久城真代, 中野雄司, 佐藤健, 山岸和敏, 藤岡昭三, 中野明彦, 海老塚豊, 吉田茂男: "シロイヌナズナ *Obtusifolius* 14 a-demethylase (*cyp51*) の cDNA クローニングと機能解析", 日本植物生理学会 2000 年度年会, 名古屋, 3月 (2000).

竹内雅宜, 佐藤健, 上田貴志, 安部弘, 中野明彦: "植物細胞における小胞輸送の制御: 植物 Sar1 の優性阻害型変異を用いたアプローチ", 日本植物生理学会 2000 年度年会, 名古屋, 3月 (2000).

中野明彦: "生細胞内の膜系のダイナミクスを観る技術", 日本農芸化学会 2000 年度大会, 東京, 3–4月 (2000).

中野明彦: "小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送過程の可視化と解析", 日本電子顕微鏡学会第 56 回学術講演会, 東京, 5月 (2000).

中野明彦: "生きた酵母細胞で小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送を観る", 第 14 回酵母合同シンポジウム「酵母を観る: 細胞機能をビジュアルに」, 奈良, 6月 (2000).

佐藤美由紀, 藤崎真吾, 西村行進, 中野明彦: "酵母の二つの cis-prenyltransferase (Rer2p, Str1p) に関する解析", 第 10 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会, 仙台, 7月 (2000).

矢原夏子, 上田貴志, 佐藤健, 中野明彦: "小胞輸送における酵母 *ARF1* の多面的機能の解析", 第 33 回酵母遺伝学フォーラム研究会, 東京, 8月 (2000).

梅林恭平, 中野明彦: "分泌タンパク質の選別輸送におけるステロールの役割についての解析", 第 33 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 東京, 8月 (2000).

松田憲之, 中野明彦: "Rma1 は RING フィンガーを持つ新奇膜結合型ユビキチンリガーゼである", 学術振興会・科研費企画公開ワークショップ「ユビキチンワールド: 新しい生体反応制御システム」, 札幌, 9月 (2000).

村上明子: “カゼインキナーゼ I, Hrr25p, の小胞輸送開始シグナルにおける役割”, 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2000).

松田憲之, 鈴木俊顕, 田中啓二, 中野明彦: “Rma1 はリングフィンガーを持つ新奇膜結合型ユビキチンリガーゼである”, 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

佐藤美由紀, 藤崎真吾, 西村行進, 中野明彦: “酵母のドリコール合成系酵素 cis-prenyltransferase (Rer2p, Str1p) に関する解析”, 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

佐藤健, 佐藤美由紀, 中野明彦: “小胞体膜タンパク質局在化にはたらく分子選別装置 Rer1p の解析”, 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

中野明彦, 安部弘, 佐藤健, 上田貴志, 齊藤知恵子, 竹内雅宜: “植物の細胞内メンブレントラフィックと組織形成”, 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

梅林恭平, 中野明彦: “分泌タンパク質の選別輸送におけるステロールの役割についての解析”, 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

佐藤美由紀, 藤崎真吾, 西村行進, 中野明彦: “異なる性質を持つ二つの酵母ドリコール合成系酵素 cis-prenyltransferase”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 10-11 月 (2000).

佐藤健, 佐藤美由紀, 中野明彦: “小胞体膜タンパク質局在化にはたらくゴルジ体膜タンパク質 Rer1p の細胞内動態の解析”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 10-11 月 (2000).

矢原夏子, 上田貴志, 佐藤健, 中野明彦: “小胞輸送における酵母 *ARF1* の多面的機能の解析”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 10-11 月 (2000).

竹内雅宜, 上田貴志, 佐藤健, 安部弘, 中野明彦: “植物細胞における小胞輸送の制御: 植物 Sar1 の優性阻害型変異を用いたアプローチ”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 10-11 月 (2000).

齊藤知恵子, 安部弘, 中野明彦: “子葉の液胞のダイナミズムとその微細構造”, シロイヌナズナワークショップ, 岡崎, 11 月 (2000).

上田貴志, 山口雅利, 内宮博文, 中野明彦: “植物に特異的なエンドサイトーシス機構の解析”, シロイヌナズナワークショップ, 岡崎, 11 月 (2000).

中野明彦: “理研 ILs における植物科学研究: バイオアーキテクト研究による取り組み”, 第 1 回植物科学研究センターシンポジウム「植物科学の将来と展望」, 和光, 11 月 (2000).

齊藤知恵子, 安部弘, 中野明彦: “シロイヌナズナ子葉の液胞のダイナミズムとその微細構造”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 11 月 (2000).

上田貴志, 山口雅利, 内宮博文, 中野明彦: “植物特異的 Rab/Ypt GTPase である Ara6 の解析”, 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 11 月 (2000).

中野明彦: “植物における小胞輸送の意義と GTPase による調節”, ワークショップ「高等植物研究の最前線」, (京都

大学化学研究所), 京都, 12 月 (2000).

森田(寺尾)美代, 新濱充, 上原路子, 齊藤知恵子, 中野明彦, 田坂昌生: “シロイヌナズナの重力屈折反応に関わる ZIG (SGR4) は v-SNARE をコードする”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

中野明彦, 佐藤健, 梅林恭平: “小胞輸送のダイナミズムとタンパク質の選別”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

中野明彦: “タンパク質の翻訳後動態-細胞内メンブレントラフィックの研究”, 文部省科研費基盤研究 C 公開シンポジウム「プロテオーム研究の動向と展望」, 和光, 1 月 (2001).

中野明彦: “高等植物の生存戦略とメンブレントラフィック: オルガネラから細胞, そして組織へ”, 文部省科研費特定領域研究 (B) 核-細胞質間輸送・小胞輸送共催公開シンポジウム「細胞内機能分子トラフィック」, 東京, 1 月 (2001).

中野明彦: “Cell biologist が欲しい structural biology: Traffic sorting machinery の atomic structure”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1 月 (2001).

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 the Morphogenesis of Higher Plants

Head

Dr. Akihiko NAKANO

Members

Dr. Hiroshi ABE
 Dr. Ken SATO (10)
 Dr. Ken SATO (12)
 Dr. Takashi UEDA
 Mr. Noriyuki MATSUDA
 Dr. Chieko SAITO
 Dr. Miyuki SATO
 Dr. Masaki TAKEUCHI
 Dr. Kyohei UMEBAYASHI
 Ms. Keiko SHODA
 Ms. Hiroyo YAMAMOTO

Visiting Members

Dr. Akiko MURAKAMI (Fac. Nursing, Miyagi Univ.)
 Dr. Yumiko SAITO (Nat'l. Inst. Infectious Diseases)
 Ms. Natsuko YAHARA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)