

## 論文の内容の要旨

Study on cargo sorting zones in the *trans*-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy

(超解像ライブイメージング顕微鏡 SCLIM を用いた  
積荷タンパク質の仕分けを司るトランスゴルジ網選別ゾーンの可視化研究)

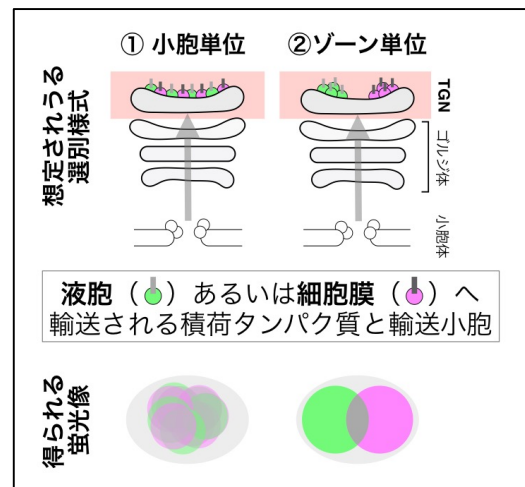
清水優太郎

### ■序論

真核生物の細胞内には膜で囲まれたさまざまな細胞小器官が存在しており、各細胞小器官が独自の役割を果たすことで正常な生命活動が維持されている。その一つである**トランスゴルジ網 (trans-Golgi network: TGN)** は、小胞体で合成され、ゴルジ体で翻訳後修飾を受けた積荷タンパク質を受け取り、それらを仕分け、最終目的地（細胞膜/外や液胞）に向けて送り出す役割を担うことが明らかにされている。すなわち、TGN は複数の輸送経路を制御する分岐点として重要な役割を担っている。しかしながら、TGN が異なる経路へ送り出される積荷タンパク質をどのように同時に選別しているのかは長らく謎に包まれていた。

例えば TGN において、①個別の小胞単位によって、あるいは②各目的地に対応して形成されるゾーン（亜細胞小器官領域）単位によって、積荷タンパク質の選別が制御されるといった仮説が想定されるが、その実体は明らかになっていなかった（図 1）。

本研究では、顕微鏡下で単一の TGN を容易に識別できるモデル植物シロイヌナズナ根の表皮細胞を対象に、高速超解像顕微鏡 SCLIM を用いて、TGN から輸送される積荷タンパク質や、TGN において積荷の選別を担うタンパク質の局在およびその動態を直接観察することで、TGN が複数の積荷タンパク質を同時に選別する機構を明らかにすることを目的にした。



## ■結果

### 1. TGN における積荷タンパク質の局在解析

TGN から細胞膜へ運ばれる積荷タンパク質 VAMP721 と液胞へ運ばれる積荷タンパク質 VAMP727 に、異なる色の蛍光タンパク質を融合し、可視化した (図 2)。そして、両積荷タンパク質と TGN マーカー (SYP61) を共発現するシロイヌナズナを対象に、3 色蛍光の超解像像ライブイメージングを行ったところ、両積荷タンパク質が単一の TGN 上で分離して局在することを明らかにした (図 2)。すなわち、単一の TGN 上に細胞膜への輸送 (分泌輸送) のためのゾーンと液胞輸送のためのゾーンが別々に形成されている可能性が示唆された。

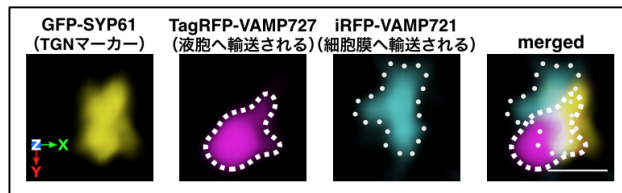


図 2. 異なる目的地へ輸送される積荷タンパク質は単一 TGN 上で分離して局在した。Bar = 1 $\mu$ m

### 2. TGN 上の積荷と選別実行因子の局在解析

上記積荷タンパク質の局在解析に加え、TGN 上で積荷の選別に関与することが報告されているタンパク質 AP-1 と AP-4 の局在も観察した。重要なことに、これらも単一 TGN 上で相互排他的に局在することを明らかにした (図 3)。

さらに、TGN 上の積荷 VAMP と選別因子 AP の共局在解析を行い、細胞膜へ輸送される VAMP721 と AP-1 が、液胞膜へ輸送される VAMP727 と AP-4 がそれぞれ TGN 上の同一のゾーンに局在することを明らかにした (図 4)。

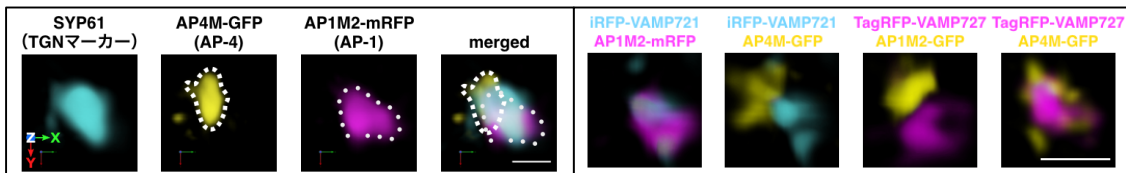


図 3. 異なる積荷の選別を担う AP-1 と AP-4 は単一 TGN 上の異なるゾーンに局在した。Bar = 1 $\mu$ m

図 4. 積荷 VAMP と積荷の選別を担う AP の局在関係。Bar = 1 $\mu$ m

この結果は各輸送方向に応じた積荷タンパク質の選別がゾーン単位で行われていることを強く支持するものである。また、TGN における代表的な輸送小胞であるクラスリン被覆小胞を形作るタンパク質 (クラスリン軽鎖: CLC) の局在を観察したところ、クラスリンが分泌輸送ゾーンに局在することを明らかにした (図 5)。

### 3. 4D ライブイメージングによる動態解析

さらに、積荷タンパク質の輸送がどのように行われているのかを詳しくするために、各輸送ゾーンに局在するタンパク質の動態を観察した。その結果、分泌輸送ゾーンを構成する積荷タンパク質 (VAMP721) と選別を担うタンパク質 (AP-1・クラスリン) は共局在するだけでなく挙動をともにすること、また、TGN から遊離することを明らかにした (図 6)。

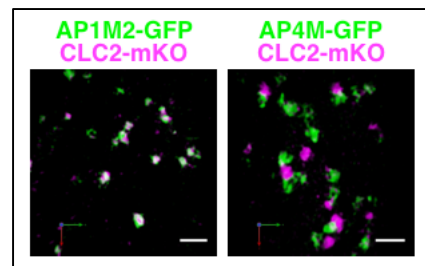


図 5. クラスリン (CLC2-mKO) は分泌輸送ゾーンを構成する AP-1 と共局在した。Bars = 2 $\mu$ m

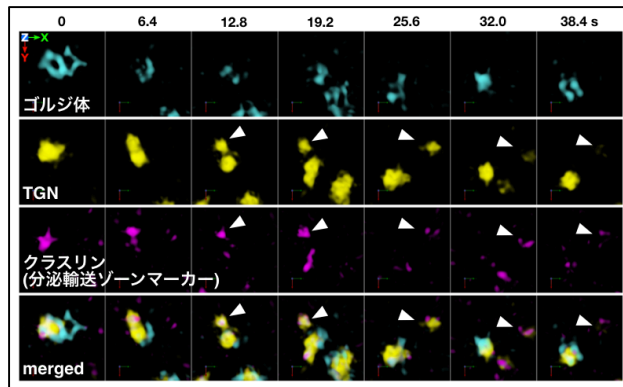


図 6. 分泌輸送ゾーンを構成するクラスリンがゴルジ体に隣接する TGN から遊離した。

この動態観察と電子顕微鏡を用いた微細構造観察から、分泌輸送を担う膜構造体は複数の小胞が集合した小胞塊\*であることも示唆された。以上の観察結果は、TGN 上の分泌輸送ゾーンから生じた小胞塊によって、細胞膜への輸送が行われていることを示唆した。一方、興味深いことに、液胞輸送ゾーンに局在し、TGN から積荷を運び出す役割が想定される AP-4 が TGN から遊離するような特徴的な現象は観察されなかった。

\*植物細胞の TGN には、ゴルジ体に隣接している一般的な状態（ゴルジ体隣接型）と、ゴルジ体に隣接していない特別な状態（遊離型）の 2 種類が存在することが報告されている (Uemura et al., 2014, *Plant and Cell Physiology*)。分泌輸送を担う小胞塊が遊離型 TGN に相当することも本研究において明らかにした。

## ■まとめ

本研究では、細胞膜と液胞という異なる目的地に輸送される積荷タンパク質の選別が、単一 TGN 上の独立したゾーンで行われていることを明らかにした (図 7)。さらに、その動態にまで着目し、小胞塊の遊離という形で分泌輸送が担われていることも明らかにした (図 7)。一方で、液胞輸送ゾーンから積荷タンパク質がどのように運び出されるのかについては未解明のままである。今後の研究において、TGN 液胞輸送ゾーンを介した積荷輸送機構や、これらゾーンの形成機構を明らかにしていくことが、TGN における複数輸送経路の制御機構のさらなる解明に寄与することが期待される。

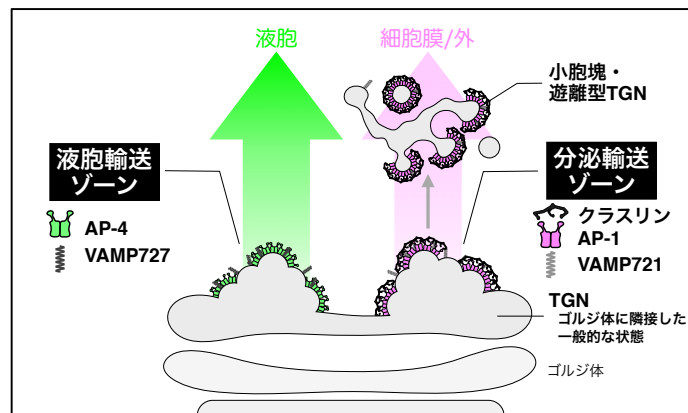


図 7. 本研究で明らかにした TGN における積荷タンパク質の選別様式