

論文の内容の要旨

論文題目 Study of the Biogenesis of the Golgi Apparatus in Plant Cells
(植物細胞におけるゴルジ体形成機構の研究)

氏名 伊藤 容子

<序論>

真核生物は、生命の最小単位である細胞の中に、膜で区画化された様々な細胞内小器官（オルガネラ）を持っており、それらは生命反応の効率化・分業化に重要な役割を果たしている。中でもゴルジ体は、小胞体（ER）で新たに合成された脂質やタンパク質を最初に受け取り、後の経路へ送り出すとともに、輸送に伴ってこれらに複雑な糖鎖修飾を施す、必要不可欠なオルガネラである。ゴルジ体は、扁平な袋状の膜（槽）が複数重なった非常に特徴的な層板構造をとることが知られている。しかし、この構造がどのようにして形成・維持されるかについては、ほとんど明らかになっていない。植物細胞では、明瞭な層板構造をとった個々のゴルジ体が細胞質中に散在しているため、異なる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することにより、光学顕微鏡レベルで比較的容易に層板構造を観察することができる。そこで本研究では、生きた植物細胞においてそれぞれの槽の挙動を詳細に観察することで、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た。

ゴルジ体から ER への輸送を担う COPI 小胞の形成は、低分子量 GTPase である ARF1 によって制御されている。菌類が産生する物質である Brefeldin A (BFA) は、ARF1 の活性化因子(Guanine Nucleotide Exchange Factor: GEF)の阻害剤として知られている。タバコの細胞では、ER-ゴルジ体間の輸送を BFA 感受性の GEF が行っているため、BFA 処理によって輸送が阻害される。このとき、ゴルジ体は ER へと吸収されて消失し、ゴルジ体膜に局在する酵素タンパク質は ER 膜へと拡散することが報告されている。さらに、この反応は可逆的で、BFA を取り除くと正常なゴルジ体が再形成される。そこで、この BFA 除去後のゴルジ体の再形成過程について、時間的・空間的に詳細な観察を行った。

<結果と考察>

○シス槽のタンパク質が BFA 処理によって ERES 近傍の構造に局在し、BFA 除去後のゴルジ体再形成の足場となる

タバコ BY-2 細胞で、SYP31 (シス槽に局在) と ST (トランス槽に局在) を同時に可視化し、BFA 処理を行ったところ、ST は ER に拡散したのに対し、SYP31 は元のゴルジ体より小さく数も多い未知のドット状の構造体に局在した (図 1). シス槽の別のタンパク質である RER1B も、BFA 処理によって SYP31 と同じドット状の構造体に局在することが明らかになった. しかし、シス槽マーカーとしてよく用いられる ERD2 は、ST と同様に BFA 処理によって ER に拡散した. そこで、SYP31、ERD2、ST を 3 色で同時に可視化し、ゴルジ体内における局在を詳細に比較したところ、ERD2 は SYP31 と ST の間に局在のピークを持つことが明らかになった. ゴルジ体マトリックスタンパク質である AtCASP も、3 色での観察によって SYP31 と ST の間の槽に局在することが明らかになり、BFA 処理を行うと ER に拡散した. これらの結果から、シス槽の中でもよりシス極側の槽に局在するタンパク質が、BFA 処理によってドット状の構造に局在するのではないかと考えられる.

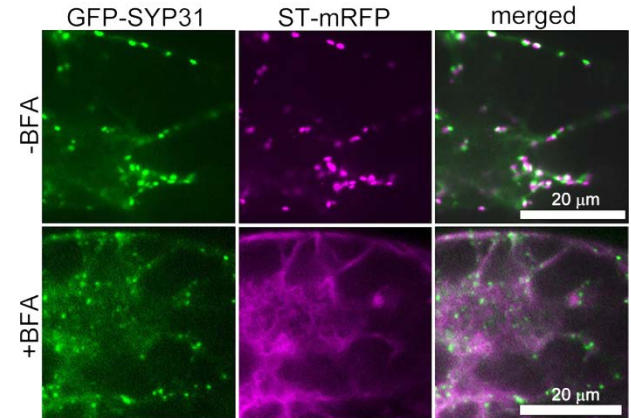


図 1. BY-2 細胞における SYP31, ST の BFA 処理

シロイヌナズナの根の細胞では、ER-ゴルジ体間の輸送を BFA 非感受性の ARF GEF である GNOM-LIKE 1 (GNL1) が制御していることが知られており、ゴルジ体層板構造は BFA 処理によってほとんど影響を受けない. しかし、GNL1 は 1 アミノ酸変異によって GEF 活性に関係なく BFA 感受性に改変することが可能である. そこで、*gnl1* 変異体を BFA 感受性 *GNL1* で相補したシロイヌナズナ個体においてゴルジ体マーカーを発現させ、BFA 処理に対する挙動の観察を行った. その結果、BY-2 細胞で観察されたのと同様に、SYP31 と RER1B はドット状の構造体に局在し、ERD2 は ER に拡散した. この結果から、シロイヌナズナ個体においても、GNL1 が BFA 感受性であれば、タバコの細胞と同様の現象が起こることが示された.

次に、BY-2 細胞において、BFA 処理後 BFA を除去し、ゴルジ体再形成のタイムラプス観察を行った. その結果、まず SYP31 のドット状構造が集まることで再形成が開始され、そこへ遅れて ST が運ばれてくることが明らかになった (図 2). また、AtCASP は、BFA 除去後 ST よりも早く SYP31 のドット状構造に集まることわかった. これらのことから、ドット状構造が足場となって最初のシス槽を形成し、その後シスからトランスへ向かって再形成が進行すると考えられる.

ER からゴルジ体への輸送を担う COPII 小胞は、ER Exit Site (ERES) と呼ばれる ER 膜上のドメインから出芽する. SYP31 や RER1B が BFA 処理によって局在するドット状の構造はこの ERES なのではないかと考え、COPII コートタンパク質の一つであ

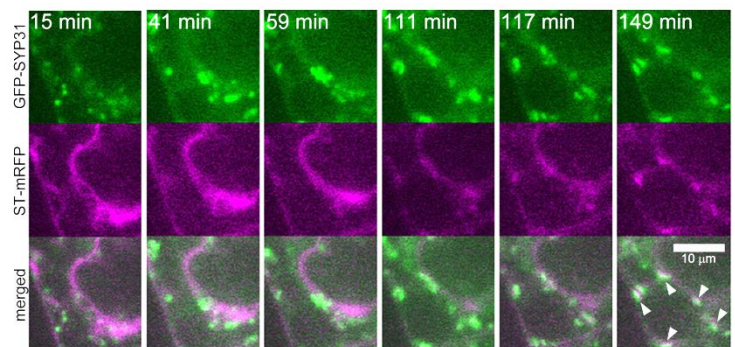


図 2. BFA 除去後のゴルジ体層板構造の再形成

る SEC13 に YFP を融合させたものをマーカーとして用い、BY-2 細胞でゴルジ体と共に ERES を可視化した。BFA 処理を行い、当研究室で開発された高感度・高分解能の共焦点レーザー顕微鏡 SCLIM で 3D 観察を行った結果、SYP31 のドット状構造と ERES のシグナルは、非常に近接していたが完全には重ならなかった (図 3)。このことから、SYP31 のドット状の構造は、ERES のごく近傍に存在するが ERES そのものではない、独立したコンパートメントであると考えられる。

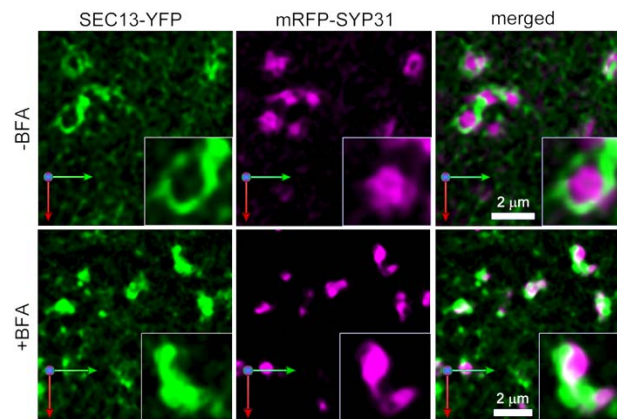


図 3. ドット状の構造と ERES の関係

以上の結果から、シス槽のタンパク質の一部は BFA 処理によって ERES 近傍の構造体に局在し、BFA を除去した際にゴルジ体再形成の足場としてはたらくことが示唆された。さらに、このような挙動を示すタンパク質は、シス槽の中でもよりシス側の槽に局在していることから、ゴルジ体の中でも最もシス側の槽は、他の槽とは異なった性質・機能を持っているのではないかと考えられる。

OTGN はゴルジ体から独立して再形成を開始し、後にゴルジ体と会合する

トランスゴルジ網(*trans*-Golgi Network; TGN)は、ゴルジ体の最もトランス側の槽として定義され、ゴルジ体から積み荷を受け取り、後の経路へ仕分けする場であると考えられている。しかし近年、植物細胞では、TGN がエンドサイトーシス経路において初期エンドソームとしても機能することが提唱されている。さらに、TGN は必ずしもゴルジ体と会合しておらず、両者がダイナミックに離れる様子も報告されている。BFA によるゴルジ体の消失・再形成時において、ゴルジ体と TGN がどのように関係しているか調べるため、BY-2 細胞においてゴルジ体と共に TGN を可視化した。TGN は BFA 処理によってエンドソームと共に凝集体を形成することが知られており、25-50 μM で BFA 処理を行うと、TGN マーカーである SYP41 が凝集体に局在する様子が観察された。しかし、同じ BY-2 ラインに 5-10 μM の BFA 処理を行ったところ、SYP41 はサイトゾルに拡散したように観察された (図 4)。ST はどの BFA 濃度でも同様に ER に拡散した。SYP41 は膜タンパク質であるため、サイトゾルに可溶化することは考えにくく、通常の高感度共焦点顕微鏡では観察できないような微小な膜構造に局在していると予想された。そこで、この状態を全反射顕微鏡を用いて観察したところ、BFA 処理を行っていない細胞に比べて、非常に多数の小さなドット状構造が激しく運動する様子が見られた。このことから、SYP41 は無数の小胞のような微細な構造に局在していることが示唆された。

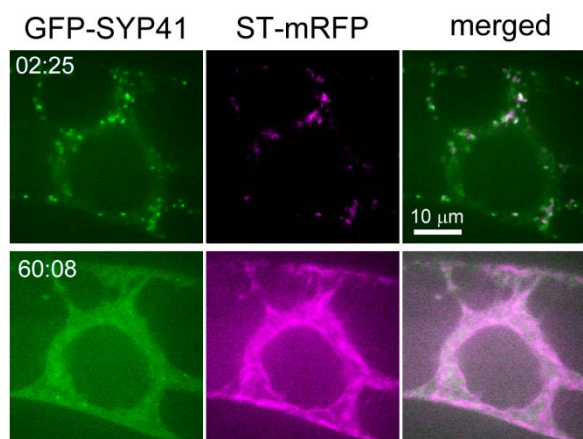


図 4. 低濃度 BFA 処理による SYP41 の局在変化

次に、BFA 除去後の TGN の再形成過程の観察を行った。低濃度 BFA 処理の後 BFA を除去すると、拡散していた SYP41 は迅速に集まり、共焦点顕微鏡でも観察可能な大きさのドット状に再形成した。この再形成は ST が ER からドット状のパターンへと変化するより前に開始された (図 5)。第 1 章におい

て、ゴルジ体の再形成はシスからトランスへと進行することが明らかになったため、この結果は、TGNがゴルジ体の再形成が完了するよりも前に始まっていることを示している。さらに、SYP31との同時可視化によって、再形成初期にはTGNとSYP31のドット状構造に位置的な相関は見られないが、後にSYP31のドット状構造が集まるときに同じ場所へ集まり、ゴルジ体とTGNが会合した状態で再形成が進行することがわかった。通常状態ではゴルジ体とTGN

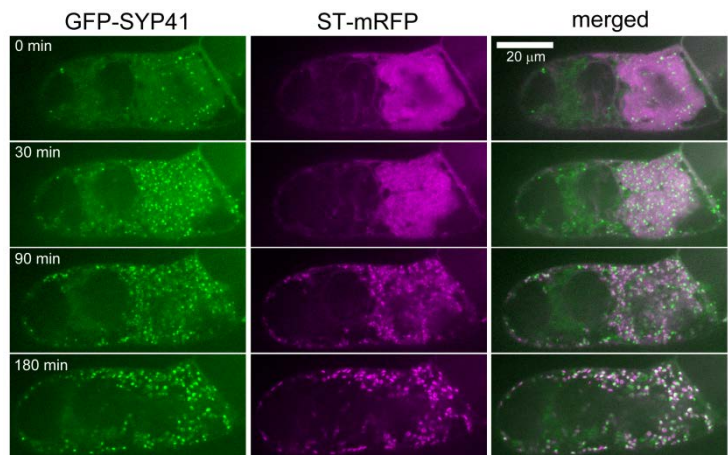


図 5. BFA 除去後の TGN の再形成

が離れて存在している様子がよく観察されるにも関わらず、再形成後には両者がほぼ完全に会合していたことから、TGNの機能にはゴルジ体との会合が不可欠であることが示唆された。以上の結果から、ゴルジ体・TGNは、低濃度BFA処理とその除去によって、図6のように消失・再形成すると考えられる。

<まとめ>

本研究により、BFA処理を行った植物細胞において、シス槽のタンパク質が局在するドット状の構造体の存在が明らかになった。さらに、この構造が足場となってゴルジ体が再形成されることが示された。再形成がシスからトランスへと進行するという結果は、ゴルジ体の槽成熟モデルと矛盾しない。また、シス槽のタンパク質同士の挙動の違いから、最もシス側の槽がその他の槽とは異なる性質を持っていることが示唆された。動物細胞における知見との比較から、このドット状構造には、ゴルジ体の構造の形成・維持に関わる因子が局在しているのではないかと考えられる。タバコの細胞では遺伝学的解析が困難であるが、シロイヌナズナでも同様のドット状構造が確認されたため、この構造に関わる因子の同定が、植物におけるゴルジ体の形成・維持の分子機構の解明につながると期待される。さらに、TGNがゴルジ体とは全く異なった挙動を示し、ある程度まではゴルジ体から独立して再形成することから、TGNがゴルジ体からの単純な槽成熟では説明できない性質を持っていることが明らかになった。この再形成時においてはたらく因子や積み荷の輸送をあわせて解析することが、TGNにおける2つの輸送経路の制御機構の解明に寄与するのではないかと考えている。

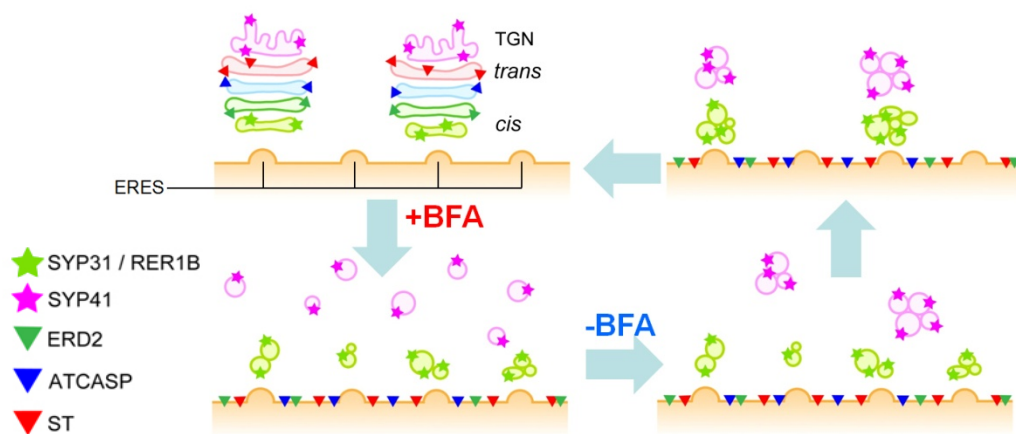


図 6. ゴルジ体・TGN の消失・再形成モデル