

2023 年度年次報告書

細胞内現象の時空間ダイナミクス

2022 年度採択研究代表者

佐藤 明子

広島大学 大学院統合生命科学研究科
教授

トランスゴルジ網/エンドソーム境界領域のダイナミクスと選別輸送

主たる共同研究者:

黒川 量雄 (理化学研究所 光量子工学研究センター 専任研究員)

松田 厚志 (情報通信研究機構 未来 ICT 研究所 主任研究員)

研究成果の概要

我々は、トランスゴルジ網(TGN)とエンドソームが接着と解離を繰り返しており、この新規な膜間相互作用が積荷タンパク質(積荷)の TGN からの搬出に必要であることを発見した。本研究では、TGN/エンドソームの解離とポストゴルジ輸送の両者を可逆的に阻害できる新たな実験系を用いて、膜間相互作用の実態・積荷選別と TGN からの輸送の分子機構を解明することを目的としている。

佐藤グループでは、光による輸送開始実験法 RudLOV 法を開発し、さらにこの手法を用いて新たに発見した dynasore の効果を論文として BioRxiv にて公開した。RudLOV 法では光照射により輸送される積荷の量・領域・タイミングを精密にコントロールできるため、現在汎用されている RUSH 法と比較して、格段に精密な実験が可能である。本手法を用いて、生合成された積荷タンパク質のポストゴルジ輸送をライブセルイメージングにより観察を行った結果、GPI-AP がゴルジトラン槽を抜けた後に TGN に付着しているリサイクリングエンドソーム(RE)に直接輸送されること、VSVG と TNF はゴルジトラン槽を抜けた後、トランス槽と RE の間に特別な領域を形成し蓄積し、その領域から直接細胞膜へと輸送されることを見出した。また、dynasore がこれまで知られていたエンドサイトーシスの阻害に加えて、ゴルジ体のシス側において積荷タンパク質の輸送を阻害することを発見した。

黒川グループでは酵母 RUSH 法の開発のため、各種液胞行き積荷レポーター、およびレポーターを小胞体膜に繋ぎ止めるフックを構築し、異なる積荷輸送を同時に観察できる2色 RUSH を可能にした。さらにフックとレポーターの結合を維持可能な至適ビオチン濃度等、酵母培養条件の検討を行い、酵母 RUSH 法の実験条件を確立した。また 2023 年度は酵母 RUSH 法と超解像イメージング顕微鏡システム(SCLIM)観察を組み合わせ、液胞タンパク質輸送ライブセルイメージング解析を開始した。その結果、TGN-MVE 間が接触・解離する際に VPS 経路液胞タンパク質が輸送される様子を捉えることに成功した。また、AP-3 経路液胞タンパク質の輸送の際、小胞体-液胞間近接領域近傍で AP-3 経路積荷タンパク質が輸送される様子を捉えた。新たな膜間相互作用による積荷選別様式の存在が期待される。

松田グループでは、光軸方向の分解能を 4 倍にしながらか高速イメージングできる新しい顕微鏡開発を進めた。顕微鏡の光軸(Z)方向の分解能は XY 方向と比較すると3倍以上低いため、ライブイメージングでは Z 方向分解能を向上するだけで全体の解像力が飛躍的に向上する。従来の SIM 顕微鏡では XYZ 方向の分解能を向上するためにセクション毎に15枚の画像が必要であったが、分解能向上の方向を限定することにより必要枚数を減少させることに成功した。本手法は市販の顕微鏡でも簡単に実現できるため、学会等で報告した。

【代表的な原著論文情報】

1) RudLOV—a new optically synchronized cargo transport method reveals unexpected effect of dynasore. Tatsuya Tago, Takumi Ogawa, Yumi Goto, Kiminori Toyooka, Takuro Tojima, Akihiko Nakano, Takunori Satoh[#], and Akiko K. Satoh[#] BioRxiv, 2023