

Transport within the Golgi: for the Study of Glycoprotein Movement

ゴルジ体内の輸送：糖タンパク質の移動に関する研究

Key Words: Golgi, glycosylation, intracellular trafficking

About 30% of the proteins synthesized in cells are first transported to the endoplasmic reticulum (ER), then to the Golgi, where they are sorted to their final destination. In the ER, newly synthesized proteins are folded and undergo several types of post-translational modifications such as the attachment of precursor oligosaccharides. In the Golgi, all glycoproteins transported from the ER receive complex post-translational modifications including glycosylation, sulfation, and phosphorylation. Transport of these proteins from the ER, *via* the Golgi, to their final destination is called anterograde transport, whereas the reverse is called retrograde transport. The transport of proteins within cells normally requires transport vesicles of approximately 50–90 nm in diameter. At least three types of transport vesicles are known. COPII vesicles are responsible for anterograde transport from the ER to the entry side of the Golgi. COPI vesicles are responsible for transport within the Golgi and back to the ER. Clathrin-coated vesicles (and vesicles coated with other, still-to-be-defined proteins) carry cargo from the exit side of the Golgi to the cell surface, as well as to other organelles such as endosomes and lysosomes. Clathrin vesicles are also involved in endocytosis.

The Golgi is composed of flat membrane cisternae that are arranged in parallel into a multilayer stack. In 1970, based on observations of the intra-Golgi movement of algal cell wall components (termed scales), the concept of Golgi cisternal maturation was proposed; and this idea eventually developed into the current “cisternal maturation model” for protein transport in the Golgi [Brown *et al.* (1970) *J. Cell Biol.* **45**, 246–271]. The cisternal maturation model, in contrast to the conventional view that regards the Golgi as a stable structure, views the structure of the Golgi as dynamic. In this model, newly formed cisternae at the *cis*-Golgi (*cis*-cisternae) migrate through the Golgi stack, changing to *medial*-cisternae and further to *trans*-cisternae as they mature. This maturation process is thought to occur through the retrograde transport of resident Golgi enzymes by COPI vesicles. This model could explain how some large cargoes, such as procollagen, which are too large to be packaged into transport vesicles still are able to move forward within the Golgi stack and be transported to the cell surface. Although there have been intensive debates on protein transport within the Golgi, in 2006, two groups—one led by Akihiko Nakano from RIKEN in Japan and the other by Benjamin Glick from the University of Chicago in the US—demonstrated by

細胞が作り出すタンパク質のうち、約30%は、小胞体、ゴルジ体を経てそれぞれの目的地へと輸送され機能すると考えられている。小胞体では、ポリペプチド鎖の伸長、折りたたみ、また一部の翻訳後修飾（オリゴ糖鎖前駆体の付加など）が起こる。ゴルジ体では、小胞体から輸送されたタンパク質に、糖鎖修飾、硫酸化、リン酸化を含めた複雑な翻訳後修飾が施される。小胞体→ゴルジ体→目的地の向きの輸送は順行輸送と、またこの反対は逆行輸送と呼ばれる。細胞内の物質の移動には、通常、50～90 nm程度の大きさの輸送小胞が必要であると考えられている。これまでに、少なくとも3種類の小胞が知られている。COPII小胞は、小胞体からゴルジ体の入り口面への順行輸送に、COPI小胞は、ゴルジ体内の輸送および、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に、クラスリン小胞（そして他の輸送構造体）は、ゴルジ体の出口から細胞膜表面、もしくはその他の細胞内小器官、例えばエンドソームやリソソームへの輸送にそれぞれ機能すると考えられている。クラスリン小胞はエンドサイトーシスにも関与する。

ゴルジ体は、扁平なゴルジ槽板が何層かに積み重なった膜構造体である。1970年に、藻類の壁の成分であるスケールのゴルジ体内の動きの観察結果に基づいて、槽板成熟という概念が提案され、これが現在の槽板成熟モデルに発展した [Brown *et al.* (1970) *J. Cell Biol.* **45**, 246–271]。槽板成熟モデルでは、ゴルジ槽板 (cisterna) は、安定した普遍的な構造として存在するのではなく、ダイナミックに変化する構造体であると考えられる。つまり、*cis*槽板の性質を持つてきたての槽板が、時間とともに成熟し、*medial*の性質を獲得、さらに *trans*の性質を獲得し、これに伴ってゴルジ体を連続的に移動すると考えるのである。成熟には、糖転移酵素などゴルジ体にとどまるべきタンパク質を、成熟に逆らって本来の場所に戻す逆行輸送が伴うと考えられている。また、槽板成熟モデルは、コラーゲン前駆体のように、輸送小胞よりもずっと大きいために通常の小胞には詰め込まれないであろうタンパク質もまた細胞表面へと輸送されるという事実をよく説明できる。ゴルジ体内の輸送に関して、論争は多々あったものの、2006年に、理研の中野明彦らのグループやシカゴ大の Benjamin Glickらのグループがライブイメージングによって、酵母において槽板成熟が起こることを実証した [Losev *et al.* (2006) *Nature* **441**, 1002–1006, Matsuura-Tokita *et al.* (2006)

live imaging that cisternal maturation can occur in yeast [Losev *et al.* (2006) *Nature* **441**, 1002–1006; Matsuura-Tokita *et al.* (2006) *Nature* **441**, 1007–1010]. Subsequently, experts in the field reported their shared view supporting cisternal maturation in 2009 [Emr *et al.* (2009) *J. Cell Biol.* **187**, 449–453].

However, on June 4th and 17th of this year (2013), two groups (one in the US and the other in Italy), both using a technique involving the expression of protein aggregates, reported conflicting conclusions about the mechanism underlying intra-Golgi transport. The US group, led by James Rothman at Yale University, proposed a new model termed “the rim progression model”; whereas the Italian group, led by Alberto Luni at the National Research Council of Italy, provided further evidence to support the cisternal maturation model [Lavieau *et al.* (2013) *Elife* **2**, e00558; Rizzo *et al.* (2013) *J. Cell Biol.* **201**, 1027–1036]. In this report, we review both of these studies on trafficking within the Golgi.

Both groups used the following technique based on expression of the FKBP12 protein [Rivera *et al.* (2000) *Science* **287**, 826–830; Rollins *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7096–7101]. FKBP12 (FK506-binding protein 12) is normally monomeric. However, when a point mutation is introduced [phenylalanine 36 to methionine (F36M)], the mutant FKBP12 protein forms dimers, which can then be dissociated with the pharmacological agent AP21998. When three or four FKBP12 mutant (FM) proteins are expressed in tandem, the FM fusion protein forms aggregates within cells. However, these aggregates can also be dissociated by AP21998. The tandem FM vector and AP21998 are commercially available from Clontech Laboratories, Inc.

In their study, Rothman’s group expressed a chimeric protein comprising the signal peptide of the cell surface glycoprotein CD8 at its N-terminus, a fluorescent protein, 4 tandem FM proteins, and the rest of CD8, including its transmembrane region and C-terminus. As soon as this chimeric CD8 (CD8-FM4) is synthesized in the ER, it forms aggregates. Since these aggregates are electron-dense, they can be detected by electron microscopy as dark spots. Furthermore, since the aggregates are too large to be packaged into transport vesicles, they remain in the ER. However, when treated with AP21998, the aggregated CD8-FM4 dissociates and can be transported to the Golgi and then from there to the cell surface. Rothman and colleagues used this system to determine how cargo proteins are transported within the Golgi.

It has been known for some time that intra-Golgi transport does not occur at 16°C. Thus, when cells are kept at 16°C, cargo remains at the *cis*-Golgi. Rothman *et al.* incubated cells expressing CD8-FM4 at 16°C in the presence of AP21998; under these conditions, as expected, the CD8-FM4 did not form aggregates and so could be transported to the *cis*-Golgi; however, because of the

Nature **441**, 1007–1010]. これに続いて、分野の専門家たちは2009年に、槽板成熟モデルを支持する共通見解を連名で発表した [Emr *et al.* (2009) *J. Cell Biol.* **187**, 449–453].

前置きが長くなったが、今年2013年、6月4日と6月17日にアメリカとイタリアのグループが、同じ技術を使ってゴルジ体内の輸送に関して、二つの異なる結論を導きだした。エール大学のJames Rothman率いるアメリカのグループは、槽板成熟モデルとは異なる新しいモデル (rim progression model) を提唱し、イタリア学術研究会議のAlbert Luni率いるグループは、槽板成熟モデルを支持する結果を発表した [Lavieau *et al.* (2013) *Elife* **2**, e00558 ; Rizzo *et al.* (2013) *J. Cell Biol.* **201**, 1027–1036]。本稿では、これら二つの論文を紹介する。

まず、二つのグループが利用した技術 [Rivera *et al.* (2000) *Science* **287**, 826–830 ; Rollins *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7096–7101] を簡単に説明する。通常単量体であるFKBP12 (FK506-binding protein 12) は、F36Mにおける点変異により、二量体化する。この二量体は、薬剤AP21998によって単量体に戻る。この変異型FKBP12 (以下FM) をタンデムに3～4つないで発現すると凝集体を形成するが、この凝集体も同じ薬剤、AP21998で壊すことができるという技術である。このタンデムFM発現ベクターとAP21998は現在、Clontech社から入手可能である。

Rothmanらのグループは、細胞表面膜糖タンパク質であるCD8の、N-末端を含むシグナルペプチドと、膜貫通部位とC-末端を含む残りの部分の間に、蛍光タンパク質 (fluorescent protein) とFMを4つないだキメラタンパク質を細胞に発現させた。このキメラCD8 (以下CD8-FM4) は、小胞体の中で作られると同時に、FMを介して凝集体を作る。この凝集体は、電子密度が高いため (electron-dense)、電子顕微鏡写真では黒い影のように写る。また、この凝集体は大きすぎるため、輸送小胞へ詰め込まれない、つまりゴルジ体へは輸送されずERにとどまる。しかし薬剤を添加して凝集体を壊すと、CD8-FM4は、小胞体からゴルジ体、細胞表面へと輸送される。彼らはこのシステムを構築し、積み荷タンパク質がどのようにしてゴルジ体内を輸送されるか検証した。

細胞の温度を16度に保つことによってゴルジ体内の輸送を止めることができる。CD8-FM4を発現する細胞を16度に保った後、薬剤を添加する。するとCD8-FM4は、小胞体からゴルジ体の入り口である*cis*ゴルジまで輸送され、そこにとどまる。薬剤を除去した後、細胞を37度に温めると、凝集体は、もし槽板成熟が起こるのであれば細胞表面へと輸送されるし、起こらないのであれば輸送小胞には詰め込

temperature, it did not proceed further through the Golgi. Rothman *et al.* next removed AP21998, which caused the CD8-FM4 in the *cis*-Golgi to form aggregates, and then warmed the cells to 37°C to allow intra-Golgi transport to proceed. If intra-Golgi transport occurs *via* cisternal maturation, they would have expected to find CD8-FM4 on the cell surface. If, however, the cisternae are stable and protein movement is dependent on transport vesicles, then the aggregated CD8-FM4 should not have been able to move from the *cis*-Golgi because of the size of the aggregates (which would be too big to package into vesicles); and, indeed, they found that CD8-FM4 remained at the *cis*-Golgi.

Finally, Rothman *et al.* expressed a soluble protein fused to FM (FM4-hGH) and compared its transport to that of CD8-FM4. Cells co-expressing CD8-FM4 and FM4-hGH were incubated at 16°C in the presence of AP21998 to allow both proteins to reach the *cis*-Golgi. AP21998 was then removed, and the cells were warmed to 37°C, as described above. Subsequently, FM4-hGH was found outside of the cells, whereas CD8-FM4 remained inside. Furthermore, electron microscopy of these cells showed that FM4-hGH was gathered in the cisternal rims whereas CD8-FM4 was in the cisternal cores. These results suggest that the rims of the Golgi cisternae mature and move as explained by the cisternal maturation model, but that the cores of the Golgi cisternae might not mature because they are more stable than the rims. They termed this new model the “rim progression model.” Suzanne Pfeffer at Stanford University in the US, who served as a reviewing editor of this paper, wrote a note on this model with an excellent illustration [Pfeffer (2013) *Elife* 2, e00903].

In marked contrast, Luini’s group used the *cis/medial*-Golgi enzyme, mannosidase I, and swapped its catalytic domain with 3 FM proteins (MANI-FM). Then, they first expressed MANI-FM in the presence of AP21998 so that it could reach the Golgi. Next, after removal of AP21998, the intra-Golgi localization of MANI-FM was examined in relation to the location of *cis*- and *trans*-Golgi markers. Immediately after AP21998 was removed, MANI-FM was mostly found in the *cis/medial*-Golgi. After 12 and 20 min, however, it moved to the *medial*- and *trans*-Golgi, respectively, which is consistent with cisternal maturation. To follow the movement of MANI-FM from the *trans*-Golgi, they next expressed MANI-FM in the presence of AP21998, removed AP21998, and waited for 20 min to let MANI-FM move to the *trans*-Golgi as described above. Then, they added AP21998 again to disaggregate MANI-FM. After 1.5 min, MANI-FM was found in vesicular/tubular structures, and after 3 min, it was back in the *medial*-Golgi. This indicates that MANI-FM at the *trans*-Golgi was transported to *medial*-Golgi by vesicular/tubular containers. Thus, their results support the cisternal maturation model, which argues that resident

されないで、その場にとどまるはずである。実験の結果、CD8-FM4は *cis*ゴルジにとどまることが示され、よって槽板成熟は起こらないことが示唆された。

次に彼らは、可溶性タンパク質の輸送を調べるため、同様のFMキメラ (FM4-hGH) を作製し、CD8-FMの輸送と比較した。CD8-FM4とFM4-hGHを共発現し、細胞を16度に保った後に薬剤を添加する。すると両タンパク質とも、*cis*ゴルジにとどまる。薬剤を除いた後、細胞を37度に温めると、上述のようにCD8-FM4は *cis*ゴルジにとどまったが、FM4-hGHは細胞外に分泌された。また、電子顕微鏡法により、FM4-hGH凝集体は、ゴルジ槽板の淵の部分に集まるのに対して、CD8-FM4凝集体は、ゴルジ槽板の中心部に集まることが示された。これらの事実から、淵の部分は、槽板成熟モデルのように成熟するが、中心部は比較的安定で、淵よりも輸送が起こらない、つまり槽板成熟モデルのような成熟が起こっていない可能性が示唆された。彼らは、これを新しいモデル、rim progression modelと名づけた。この論文のレビューイングエディターを務めたアメリカのStanford大学のSuzanne Pfefferが、わかりやすい図を用いて解説している [Pfeffer (2013) *Elife* 2, e00903]。

これに対し、Luiniらのグループは、*cis/medial*ゴルジ体酵素であるマンノシダーゼIBの触媒ドメインの代わりにFMを3つつないだキメラタンパク質 (MANI-FM) を使用した。MANI-FMをAP21998存在下で発現させた後、薬剤を除去し、*cis*ゴルジマーカーや *trans*ゴルジマーカーとMANI-FMとの位置関係を調べた。薬剤除去後0分では、MANI-FMは主に *cis*と *medial*ゴルジに見いだされたが、12分で、*medial*ゴルジへ、20分で *trans*ゴルジまで輸送されていることが示された。これは、MANI-FMが槽板成熟に伴って移動していることと矛盾しない。次に、MANI-FMの *trans*ゴルジ以降の動きを調べるため、上述のように、MANI-FMをAP21998存在下で発現させた後、薬剤を除去して20分置き、MANI-FMを *trans*ゴルジまで移動させた。ここで再び薬剤を添加しMANI-FM凝集体を壊すと、1.5分後には、MANI-FMは小胞や管状構造中に見いだされた。また3分後には、*medial*ゴルジへと移動した。このことは、*trans*ゴルジにあったMANI-FMが、小胞や管状の構造によって、*medial*ゴルジまで逆行輸送されたことを示唆する。つまりこの結果は、MANIのようにゴルジ体にとどまるべきタンパク質は、小胞や管状構造輸送体による逆行輸送によって、本来の位置に戻されるという槽板成熟モデルを支持する。

Rothmanらのグループの実験結果において、なぜ、どのようにして、CD8-FM4のような膜タンパク質がゴルジ槽板

proteins, such as MANI, are transported in the retrograde direction by vesicles and tubules.

In the study by Rothman's group, it is still unclear why/how membrane proteins like CD8-FM4 gather in the cisternal cores whereas soluble proteins like FM4-hGH gather in the cisternal rims. Investigations on the mechanisms regulating this specificity may help to confirm and refine the rim progression model. The study by Rothman's group may reignite debate on the transport model within the Golgi apparatus.

As a final note, super resolution microscopy (for review, see [Toomre *et al.* (2010) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 285–314]) would be a powerful tool to observe the subtle changes that can occur within a few min in a tiny organelle such as the Golgi. It is interesting that both groups used a conventional technique rather than this powerful new technique. Why did they prefer the conventional one? Was photobleaching or the requirement for the use of restricted fluorophores for super resolution microscopy problematic for them? Nonetheless, using the FM-based strategy employed by both groups, it is highly likely that the mechanisms underlying sugar modification of proteins, which occurs through their movement within the Golgi apparatus, will soon be elucidated.

Reported by Ayano Satoh and Yasuko Iwakiri

The Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University, Okayama, Japan

E-mail: ayano113@cc.okayama-u.ac.jp

FAX: +81-86-251-8021

Section of Digestive Diseases, Department of Internal Medicine,
Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut,
USA.

E-mail: yasuko.iwakiri@yale.edu

FAX: +1-203-785-7273

Grant Information: NIH/NIDDK DK082600

の中心に、FM4-hGHのような可溶性タンパク質がゴルジ槽板の淵に集まるのか？という疑問が残る。種類に従った、特異的な積み荷の集まりの仕組みを解明することにより、彼らの提案する rim progression model を確固たるものにできるかもしれない。Rothman らによる発表は、落ち着きかけたと思われたゴルジ体内の輸送モデルに関して、また新たな論議を呼ぶこととなるであろう。

最後になるが、筆者らは、ゴルジ体という、小さいけれども、厳密に制御されたシステムの中で、また数分という非常に短い時間で起こる変化を捉えるために、超解像度顕微鏡法（解説は、以下を参照されたい。[Toomre *et al.* (2010) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 285–314] による研究が主流になるであろうと考えていた。ところが、ここで紹介した両グループとも、従来の共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を組み合わせた手法によって、それぞれの結論を導きだした。彼らが、超解像度顕微鏡法に頼らなかったのは、蛍光色素の褪色の問題や選択に制約があるからであろうか。今後、両グループのゴルジ体内の厳密な輸送をコントロールするシステムを用いて、ゴルジ体内の移動に伴う糖タンパク質の糖鎖構造の変化が解明されることを期待している。

佐藤あやの

岡山大学大学院自然科学研究科

岩切泰子

エール大学医学部内科消化器科