

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07063

研究課題名(和文) 基底膜の動態と局在を制御する遺伝子の同定と分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism that regulate extracellular localization of basement membranes .

研究代表者

伊原 伸治 (Ihara, shinji)

有明工業高等専門学校・創造工学科・准教授

研究者番号：70373272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：基底膜は細胞外マトリックスの一つであり、進化的に保存されたタンパク質群から構成されたシート状の構造である。モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて基底膜動態に異常を示す変異体の変異遺伝子を同定したところ、GPIアンカーの修飾に関わる *pigN* 遺伝子の変異である事を明らかにした。*pigN* は、GPIアンカーの基本骨格のマンノースにエタノールアミンを転移する働きが知られている。我々は、*pigN* には従来知られているGPIアンカーへの修飾機能とは異なる機能があること(Non-canonicalと定義)、またその機能が進化的に保存されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The basement membranes (BM) are dense sheets structure of protein complex composed by secreted proteins, providing structural support, barrier function, and maintenance of cell polarity. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a semi-transparent soil nematode that is useful for fluorescence tag to visualize proteins. To know different localization patterning of BM structural proteins in vivo, we visualized type IV Collagen that is major basement membrane protein. Using these transgenic lines, we have initiated ethyl methanesulfonate mutagenesis screening to isolate mutants showing aberrant accumulation or distribution of BM components. Cloning of the relevant gene revealed that it encodes *pigN* that is generally required for glycosylphosphatidylinositol (GPI) maturation. Interestingly, protein accumulations have not observed in the mutants of other *PIG* genes, indicating that *PIGN* have unique function for proteins secretion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：基底膜 小胞体 GPI フォールディング 線虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは、時間軸や状況に応じて構成分子の発現亢進や構造変化が観察される。時期・場所特異的な細胞外マトリックスの構成タンパク質の発現差異は、細胞に空間情報の提示や行動（増殖、分化、死滅）を積極的に制御する情報デバイスとして作用する。例えば、細胞外マトリックスの構成タンパク質の一つであるヘパリン硫酸プロテオグリカンは、様々な成長因子と結合することで、細胞外の成長因子の量と局在を制御する。

細胞外マトリックスの一つである基底膜は進化的に保存されたタンパク質群から構成されたシート状の構造をしており、細胞極性の維持や代謝を制御する。また基底膜の恒常性は厳密に制御されており、破綻は疾患を引き起こす。アルポート症候群は腎不全を引き起こす基底膜タンパク質の変異であり、基底膜への自己免疫疾患として、グッドパスチャー症候群が知られている。基底膜の理解に対する先駆的な業績は、生化学的手法による基底膜を構成するタンパク質の同定、そして免疫染色による時間を固定した観察が主体であり、基底膜の動態や局在を制御する分子機構は殆ど研究されていない。

線虫 *C.elegans* の円筒状をした体腔内は、体壁筋・神経・生殖巣といった器官が存在し、体腔内に規則正しく配置される。外側から外骨格(クチクラ)、表皮細胞、体壁筋、生殖巣と構成され、基底膜は表皮と体壁筋、体壁筋と生殖巣の間隙に存在する。表皮細胞と基底膜にはヘミデスモソーム状の接着斑が形成

され、また基底膜と体壁筋は Focal adhesion 様の接着が観察され、ヒトとの共通性が観察されることから、線虫 *C.elegans* は基底膜と隣接する細胞の相互関係を研究するのに適したモデルである。これまでに基底膜構成タンパク質の様々な変異体を用いた解析により、基底膜が細胞の構造支持体としての役割以外にも、初期胚の発生、咽頭の極性形成や生殖巣の成熟などに関わることが報告されているが、基底膜自身の動態や局在がどのように制御されているのか、不明である。その主たる理由は、基底膜が人工的に合成できない事、そして可視化が難しかったためである。申請者はこれまでに基底膜を経時的にライブ観察できる実験モデルの確立している。この基底膜の実験モデルは注目を集め (Ihara S, et al., Nature Cell Biology, 2011)、Current Biology 8 月号で研究成果が紹介され (Schramm M and Hardin-J Current Biology, 2011)、また F1000 でも、3 人の F1000 faculty に評価されており、申請課題の研究基盤となっている。

本研究では、分子イメージングと遺伝学的解析を組み合わせた解析を行い、殆ど解析されてこなかった個体における基底膜タンパク質の動態や局在を制御する分子機構を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の外部環境を構成する細胞外マトリックスの中で強固なシート状のタンパク質複合体である基底膜の動態を制御する分子機構を明らかにする。基底膜動態

を制御する分子機構を同定するために、線虫 *C. elegans* を用いて基底膜動態に異常を示す多数の変異体を樹立した。その原因遺伝子として糖脂質 GPI アンカーの修飾酵素 *pigN* を同定した。*pigN* の遺伝子変異は、Multiple Congenital Anomalies-Hypotonia-Seizures syndrome type 1 (MCAHS1) 症候群とよばれる多種に渡る重篤な症状を示し、患者は幼年期に死亡することが報告されているが、その原因は不明である。申請課題では、基底膜動態を制御する GPI アンカー修飾酵素 *pigN* の分子機構を明らかにして、MCAHS1 症候群において多種の疾患を引き起こす根本原因を明らかにする

3. 研究の方法

これまでに基底膜の主要構成タンパク質 (EMB-9:IV 型コラーゲン) が異常に蓄積する *mde* (More Dots of EMB-9) 変異体、殆ど蓄積しない *lde* (Less Dots of EMB-9) 変異体、分泌異常を示す *ase* (Abnormal Secretion of EMB-9) 変異体といった基底膜構成タンパク質の動態異常を示す変異体を樹立した。一つの変異体の変異遺伝子は、GPI アンカーの修飾に関わる *pigN* の 遺伝子変異である事を明らかにしている。基底膜の動態を制御する PIGN の分子機構を明らかにするために、次の実験を行う。

1. 基底膜タンパク質が蓄積している場所を特定するために、電子顕微鏡で観察を行う。共焦点顕微鏡による観察では、基

底膜タンパク質の蓄積は小胞体内にあるようにも見える。小胞体内腔の大きさはナノメートルサイズの微細構造であり、共焦点顕微鏡では小胞体内腔を識別できない。透過型電子顕微鏡を用いた観察を行い、細胞内で基底膜タンパク質の蓄積が起きている場所を特定する。

2. *pigN* 変異体の解析、*pigN* 遺伝子を組織特異的なプロモーターを用いてレスキュー実験等を行い、細胞自律的、あるいは非自律的に働くのか、明らかにする。
3. *pigN* 変異体で、GPI アンカータンパク質からエタノールアミンが欠損しているか、糖鎖構造解析を行う。またミスセンス変異をもつ PIGN 変異タンパク質のエタノールアミンの転移活性を測定する。
4. GPI の生合成経路と修飾経路のどちらが重要なのか？明らかにする。CRISPR-Cas9 システムで GPI の生合成と修飾に関わる一連の遺伝子変異体 (各ステップごとに 16 変異体を予定) を樹立して、基底膜動態を調べる。すでに、線虫での CRISPR-Cas9 システムは立ちあげており、効率的に目的遺伝子の欠損体を作成できる。
5. *pigN* 遺伝子の欠損した培養細胞を用いて、基底膜構成タンパク質の動態観察を行い、モデル生物からヒトまで共通の制御機構であることを証明する。具体的には、*pigN* 遺伝子の欠損した培養細胞に、蛍光タンパク質を融合させた基底膜タンパク質を発現させて、タイムラプス観察を行う。野生型と

pigN 欠損培養細胞を比較することにより、時間経過に従う基底膜タンパク質の蓄積を観察する。

6. 遺伝病で報告されているアミノ酸変異を CRISPR/CAS9 システムを用いてゲノムに導入して（ノックイン）基底膜動態に与える影響を明らかにする。すでに CRISPR/CAS9 システムによる欠損変異体の作成及びノックインを行う実験系を立ちあげているので、*pigN* 変異遺伝子をノックインした変異体を容易に樹立できる。

4. 研究成果

これまでに線虫 *C. elegans* を用いて構築した基底膜の可視化モデルを用いて、基底膜動態に異常を示す変異体の遺伝子を同定した。変異遺伝子の同定は、古典的な染色体マッピングと次世代シーケンシングを用いて行った。その変異遺伝子を同定したところ、GPI アンカーの修飾に関わる *pigN* 遺伝子の変異である事を明らかにした。*pigN* は、GPI アンカーの基本骨格のマンノースにエタノールアミンを転移する働きが知られている。

我々は、*pigN* 変異体で蓄積している凝集タンパク質の細胞内の場所を明らかにするために、共焦点蛍光顕微鏡と透過型電子顕微鏡による観察を行ない、タンパク質の蓄積が小胞体内腔であることを明らかにした。さらに、GPI アンカーの生合成に関わる他の変異体ではタンパク質の蓄積が観察されないこと、そして PIGN タンパク質が、これまで知られている GPI アンカーへのエタノールアミンへ修

飾する酵素活性とは、異なる機能を有する事 (non-canonical と定義) を同定した。また non-canonical な機能が線虫からヒトまで進化的に保存されていることを明らかにした。興味深いことに CRISPR/CAS9 システムを用いて、遺伝病で報告されているアミノ酸変異を導入したところ、non-canonical な機能が欠損した表現型、すなわち小胞体で基底膜タンパク質の蓄積が観察され、本研究課題で見出した *pigN* 変異体でのタンパク質の蓄積が、MCAHS1 症候群の患者病変でも引き起こされている可能性が示唆された。(Ihara, et al., Journal of Cell Science 2017)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

雑誌論文)(計2件)

1. Ihara, S*, Nakayama, S., Murakami, Y., Suzuki, E., Asakawa, M., Kinoshita, T. and Sawa, H. PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. **J. Cell Sci.** 130, 602-13 (2017). * Corresponding author
2. Morrissey, M. A., Jayadev, R., Miley, Ginger, R., Blebea, Catherine. A., Chi, Q., Ihara, S., and Sherwood, D. R*. SPARC promotes cell invasion in vivo by decreasing type IV collagen levels in the basement membrane. **PLOS Genetics** 12, e1005905 (2016).

3. 学会発表)(計1件)

4. Ihara, S*, Nakayama, S., Murakami, Y., Suzuki, E., Asakawa, M., Kinoshita, T. and Sawa, H. PIGN prevents protein

aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. *J. Cell Sci.* 130, 602-13 (2017). * Corresponding author

1PIGNは小胞体のATP量を維持する事で、タンパク質の分泌を制御している

伊原 伸治. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月4日
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

小胞体内でタンパク質凝集を抑えるPIGNの新しい機能の発見

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/03/research-highlights_ja/20170314-2.html

6. 研究組織

(1)研究代表者 伊原 伸治
(Ihara Shinji)
有明工業高等専門学校・創造工学科・准教授
研究者番号：70373272

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()