

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14462

研究課題名(和文)狭い空間での反応に関わる内膜微小揺動に関する研究

研究課題名(英文)Studies on small motion of endomembranes affecting reactions in the narrow space

研究代表者

和田 郁夫 (WADA, IIKUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内内膜内の反応はごく狭い容積において行われるので、その容積の変化が反応自体に影響すると予想される。細胞内の内膜を高い時空間分解能で観察した場合に小胞体で不規則な細かな揺らぎが発生している事に注目し、この現象の定量的解析とその細胞機能への影響の可能性について調べた。内腔にトラップされた凝集体の速度解析等により、この動きは小胞体に特有で他の内膜では観察されず、多くの細胞では一定量の変化率からなることがわかった。これは小胞体膜の活性により発生し微小管結合により抑制され温度依存性は見られない。解析ではこの構造揺動は少なくとも内腔での蛋白の熱運動による変位を増大させる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As reactions confined in the endomembrane system of eukaryotes occur in a small volume, the volume change may affect the kinetics. When endomembrane motion was observed at high frame rates, we noted small nonhomogeneous fluctuation of the endoplasmic reticulum (ER). Quantitative analyses using the trapped aggregates in the ER lumen revealed that this motion was unique to the ER and that the rate was nearly consistent in all cells examined. This motion was solely caused by the activity of the ER membranes and demonstrated no temperature dependence. By forcefully repressing by microtubules, we found that cargo motion was facilitated by the structure fluctuation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 揺らぎ

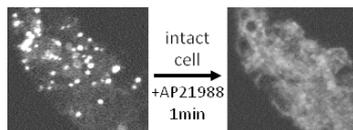
1. 研究開始当初の背景

細胞外環境で機能する新生蛋白は、小胞体の狭い空間内で様々な構造形成因子の作用により、安定な構造が形成される。この過程に失敗した分子の多くは細胞質に戻されて、proteasome による分解を受けるとされる。しかしこの逆輸送による異常分子の分解は細胞・基質依存的で、細胞質のような効率の高さはない。処理できない場合は凝集体となり、それが小胞体機能を阻害する場合には細胞の死に至ることもあり、アミロイドーシスなど多くの疾患の直接の原因となる。

小胞体の凝集を回避する強い活性は conditional 凝集体(CAD)の実験で見ることができる。

CAD-EGFP

を小胞体内で発現すると右図のように凝集体をすみや

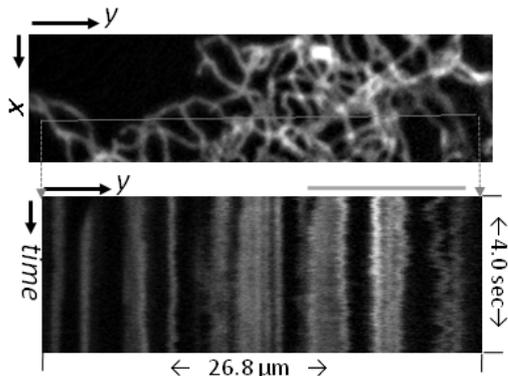


かに形成する。これは GFP 同士のジスルフィド結合を含むが、CAD 間結合を解消させる AP21988 を添加すると凝集体は直ちに解消する(右図)。しかしこの凝集体は CAD 間結合の解消だけでは消失しない。

これは、i)小胞体 microsome を調製し酸化的 folding が進行する条件においても AP21988 は CAD-GFP 凝集体を解消しない、ii)細胞膜をジグトニン処理して細胞質成分を除き i)の条件で AP21988 を加えても凝集は解消しない、iii) i)や ii)の場合に DTT の添加は効果がない等から、構造形成因子の存在だけでは小胞体の強い凝集解消活性は説明できない。

生きている細胞の構造は必ず動きを持つ。中でも小胞体の特徴的な動きは注目を集め、分子機構が解明されてきた。これは微小管との関連において起きる、膜融合も関わる小胞体膜の複雑な形態変化がよく知られている(1)。しかしこれらは頻度の低い構造変化であり、分泌系カーゴ分子の輸送と共役した成熟化に影響を与えとは考えにくい。

そこで、高い時空間分解能で小胞体を観測したところ、細胞膜や核に隣接していない広い領域で顕著な微小振動が恒常的に観察された(下図)。



上のパネルが全体像で下がキモグラフになり、細かな揺れが発生していることがわかる。

2. 研究の目的

このような微小振動は、これまで知られていた構造の緩やかな動きとは異なり、agitation として反応促進を行うかもしれない。これは、反応において、分子間衝突頻度を増加させ、反応産物の速やかな拡散を促すことで、結果的に効率の良い反応を促進し、また、解離速度が遅いタンパク質フォールディング中間体やミスフォールドした分子などの処理においても、困難な反応を破綻無く進めるための作用として機能する可能性も考えられる。

特に数十 nm しかない狭い小胞体内空間では反応に関わる分子が有意な大きさを占め、さらに不安定でバルキーな新生蛋白が恒常的に膜より産生されるので、すべての反応が単純拡散に依存するとは考えにくい。

本研究で対象とするような、生体構造の微小な揺らぎと細胞内反応での役割に関する研究は極めて少ない。たとえば chromosomal jigging として記述される染色体の振動が ATP 依存的で subdiffusive な性質を持つという報告がなされ(2)、また細胞骨格のアウトミオシン系のモーター依存的な振動は細胞内での enhanced diffusion として細胞質反応促進の可能性が示唆されている(3)。しかし生理機能との関連はほとんど知られていない。

明らかに、本現象は上述の微小管により促進される運動とは異なるものだが、極めて不規則であるために、定量化が従来の方法では難しい。この基盤となる分子機構の解明につなげるに、本研究ではまず、その定量的な方法論を確立し、それに基づいて発生機作について解析を進め、関連する生理現象についても研究の対象とする。

3. 研究の方法

小胞体膜の観察は、小胞体膜蛋白である Sec61b などに蛍光蛋白である SGFP2 を付加したプラスミドをミドリザル腎細胞由来 COS-7 細胞や、その他の培養細胞などにポリエチレンイミンを用いて導入して、16-24 時間後に NIKON A1-SIM 顕微鏡により蛍光を観察して行った。顕微鏡でのイメージングは蛍光性の成分を除きまた Hanks 塩からなる D-MEM に牛胎児血清 1% を培地に用いて、培地温度が設定温度になるように制御した。

プラスミド構築は、従来からの一般的な分子生物学的手法に加えて、Gibson Assembly・NEBuilder(NEB)を用いて行い、得られたプラスミドの配列はすべて DNA sequencer により確認した。

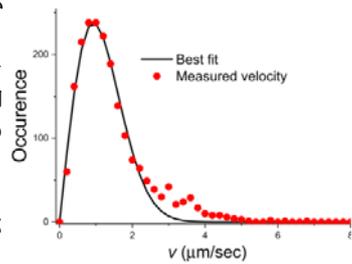
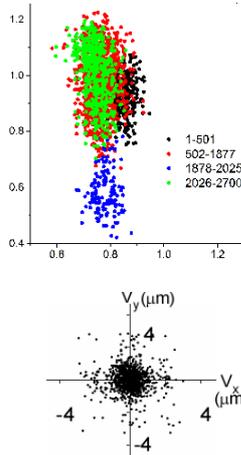
マウス卵の小胞体観察のために下記のように行った。まず、ゴナドロピン投与後 46 時間のマウスよりヒアルロニダーゼ存在下で未成熟卵を調製した。その核に T7 RNA polymerase を用いて作成した Sec61b-SGFP2 の RNA をマイクロマニピュレータを用いて ~5pL を投与した。発現産物は 37 度で 21 時

間培養後に上記のようにして観測した。

4. 研究成果

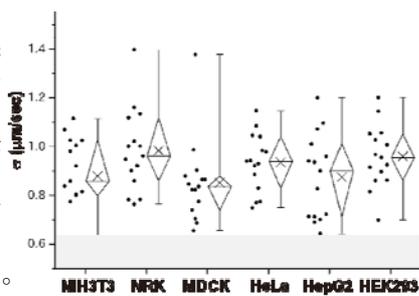
A 小胞体膜微小揺動の定量法

定量を容易にするために、膜全体でなく小胞体の内の管腔にトラップされた凝集体の変位を調べることで、膜構造の動きを定量した。モニター分子として上記の ssCAD-EGFP を用いた。この一分子トラッキングを 100Hz で記録した輝点の位置は右図のようになった。この場合には、4 箇所に一時的にトラップされて各点で内腔を揺らいでいることがわかる。トラップされた各点での動く速さについてプロットすると下図のようにほぼ等方的である事がわかり、さらにこのことは詳細な解析で確認された。その速度分布は Maxwell の 2 次元速度分布 $P(v) = v \cdot \exp(-v^2/2\sigma^2)$ (v は速度、 σ は標準偏差) にほぼ従うので (右図)、偏差 σ として動きが記述されることもわかった。



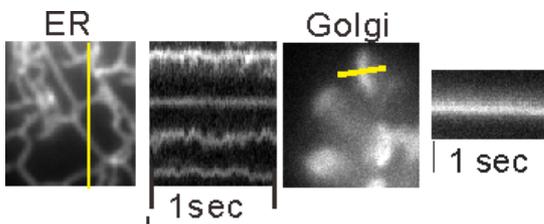
この一般性を知るために、卵子を含む多くの細胞で調べたところ、計測バックグラウンドが

0.660 ± 0.004 μm/s において ~ 0.9 μm/s の揺らぎを示し、様々な細胞種において一定の値を示した。マウス卵に



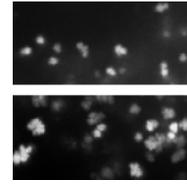
おいても小胞体はネットワーク構造を作るが ssCAD-EGFP を発現した場合にも同程度の揺らぎが観測された。

また、このような動きは小胞体以外の膜構造では観測されない。下図には蛍光標識した小胞体とゴルジ体のキモグラフを示す。左に示した画像がそれぞれの 1 枚目の画像で右が線の位置でのキモグラフ。



B. 微小管と揺動の関係性

このような構造の動きはよく知られている微小管によってひきおこされる動きとは異なって、微小管を Nocodazole で破壊した場合には $\sigma \sim 1.3 \mu\text{m/s}$ に増加し、



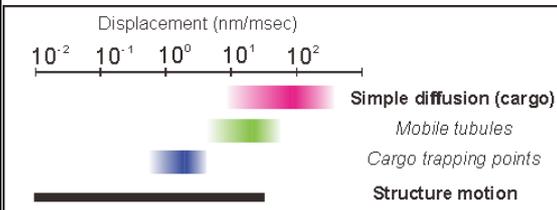
1000 枚の画像の max intensity projection (右図) ではその存在する範囲が広がった (上: DMSO, 下: Nocodazole)。小胞体膜には多くの微小管結合蛋白が存在する。そこで、その存在量が構造揺動に影響するかについて、単一細胞で解析するために赤外蛍光蛋白タグをつけた shRNA ベクター、及びより高効率で dox 依存的に誘導性発現をするベクターを作成して上記のモニター分子で解析した。その結果、CLIMP-63 を shRNA により抑制した場合には動きの幅 σ が Nocodazole とほぼ同様の値にまで増大し、また過剰に発現した場合にはフロアーノイズのレベルにまで揺動が抑制される事がわかった。これは、N 末側の微小管結合領域を欠いた分子では影響がなかった。又、ほぼ同様の揺動に対する作用が、微小管に結合することが報告されている膜蛋白 VIMP1 においても観察された。

これらの結果から、小胞体膜が微小管結合タンパク質を介して膜の揺動を抑制していることが示された。

C. 小胞体構造揺動の内腔カーゴへの影響

上記のような特性を持つ小胞体の微小な動きが小胞体内腔でのタンパク質のダイナミクスにどのような影響を与えるのかを知るために、細胞機能に作用する様々な薬剤を用いたスクリーニングを行ったが、現時点で揺動を止める分子特異的な阻害剤は見つっていない。少なくとも、細胞質での viscoelastic な特性に影響を与えるアクトミオシン系の阻害剤や、蛋白合成の阻害もまったく影響を与えなかった。

この動きはエネルギー依存的で、動きの特性からもカーゴに与える積極的な生理作用を持つ可能性が考えられる。そこで内腔でのカーゴ EYFP を 1000Hz の時間分解能で調べてその一分子画像を用いて飛距離分布を調べたところ、カーゴ一分子の動きは下記のような分布を持った。これは上述の ssCAD-EGFP と比較すると一桁遅いが、新たに行った小胞体管状構造自体の変位速度と比較すると、カーゴの動きはオーバーラップすることがわかった。このような解析から、構造揺動は内腔カーゴのブラウン運動に影響しうる時間領域を含むことが明らかになった。



そこで内腔に含まれるタンパク質の動き自体に構造の上述の揺動がどのような影響を持つかを調べるために、内腔での単純拡散についてさらに検討を行った。このためには上記のような一分子トラッキング (SPT) や蛍光相関分光法 (FCS)、あるいは蛍光消光回復法 (FRAP) が用いられてきた。SPT と FCS は一分子レベルでの変位計測で精度が高く我々も用いてきたが、小胞体構造揺動の影響を考慮するとその取り扱いが困難になる。FRAP は、より広い領域で観測するので構造揺動の特性からすると影響を受けにくいものの、フォトブリーチされた状態から自発的に回復する可逆性があり、補正法も報告されているものの (4)、高い精度が求められる場合には適さない。

このため、光活性化からの回復を測定するために、小胞体内で自由に拡散することのできる光活性化蛍光タンパク質 cfPAS を SGFP2 からの変異により作成した。405nm 光を照射とこの分子は蛍光を持つようになり、これはフォトブリーチと異なって可逆性を持たず、精度良く知る事ができるメリットがある。

そこでこれを用いて狭い空間でのタンパク質分子の動きについて基本的な特性を調べた。単純拡散は温度依存的な熱運動であり、Stokes-Einstein の式の予測に沿った温度依存性が小胞体内腔で見られるという FRAP 計測の結果が報告されている (5)。しかし cfPAS を用いて内腔拡散を測定したところ、報告された温度依存性は検出されなかった。

これが検出精度の問題でないとするれば、構造揺動がカーゴの拡散に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、上記の ssCAD-EGFP を用いて生理的温度におけるその揺らぎの幅 (σ) の変化を測定した。その結果、構造揺動は生理的温度の範囲内では、有意な差が見られなかった。同様のことは、小胞体ネットワーク構造自体を観察した揺らぎの定量においても確認されている。

このような知見は構造揺動がカーゴ拡散に影響を与え、低温での管腔内の反応を確保するという可能性を示唆的である。ただし、反応における温度の関与は、水の粘性への影響を含めても生理的な範囲では大きな変化ではないので、測定精度をさらに上げる必要がある。

もっとも明確な証明は、小胞体の構造が同一なときに構造揺動が停止した場合のカーゴの動きを測ることである。このために、微小管結合タンパク質である CLIMP-63 の内腔ドメインを含まない分子の過剰発現により小胞体膜を全面において微小管に結合させて、構造揺動を停止できるかを調べた。また、内腔での分子の拡散は小胞体形態の影響も受けるので、揺動がある場合とない場合とを正確に比較するためには単一細胞において測定を行う必要がある。

そこで、低分子 (TMP) を添加した場合のみ発現される eDHFR (6) を CLIMP-63 に結合さ

せて一時的に過剰な発現を行う系で実験を行った。一般に CLIMP-63 の過剰な発現は小胞体形態の大きな変形をもたらすが、TMP を加えて eDGFR 融合蛋白として誘導性発現を行い 1 時間後に観察した場合には、揺動を停止したものの明らかな形態に変化は見られない。そこでこの系で、(CLIMP-63 は内腔ドメインがスパーサーとして内腔の幅を規定しているという報告もあるので) 内腔ドメインを欠損した CLIMP-63 ΔC を融合させた細胞の小胞体内腔に cfPAS を発現して、その拡散を TMP の有無で比較した。TMP を添加すると蛍光分子の動きに遅れが観察され、揺動が内腔での単純拡散を促進することが示唆された。

次に凝集性カーゴに対する影響について調べた。モデル分子として、慢性閉塞性肺疾患の主たる先天的要因であるアンチトリプシンの Z 変異体に注目した。この変異体は巨大な細胞内封入体を作る。この場合には単一細胞での解析はできないので、CLIMP ΔC を過剰に発現した細胞集団において凝集体形成が影響を受けるかどうかを計測した。しかし、解析の結果では、明らかな小胞体の形態変化が起きない程度に微小管が結合して揺動が停止する条件においては、Z 変異体による封入体の形成率が変化するような傾向は認められなかった。さらに、ミスフォールド産物の処理のためのモデル分子としてよく用いられるアンチトリプシンの nullHongKong 変異体についても影響を調べたが、微小管結合による構造揺動を停止させても凝集性に明らかな変化は検出されなかった。

D. 今後に向けて

本研究により、小胞体に特異的な等方的な細かな揺れが固有の機構により発生するものであることは証明された。しかしそれが小胞体内での反応にどのような影響をもたらすかは、容積と形態の変化の影響を排除することが難しく、さらに異なる実験系において検討する必要がある。このためには揺動を起こす分子の同定が必要で、本研究でも上述の shRNA ベクターを用いて小胞体膜蛋白の網羅的抑制を行ったが、単独で形態変化を与えずに揺動だけを止める分子は同定できていない。本研究遂行過程において、小胞体が揺らぎを持つこと自体は、新たな超解像顕微鏡を用いて NIH の研究者らにより Science 誌に報告され (7)、本現象は注目を浴びている。この報告では本研究結果とは一致しない部分も多く、より精度の高い研究が必要とされる。

<引用文献>

1. Friedman, J. R., et al., The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. Trends Cell Biol, 2011. 21, 709-717.
2. Weber, S. C., et al., Nonthermal ATP-dependent fluctuations contribute to the in vivo motion of chromosomal loci. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109,

7338-7343.

3. Brangwynne, C. P., et al., Cytoplasmic diffusion: molecular motors mix it up. *J Cell Biol*, 2008. 183, 583-587.

4. Mueller, F., et al., Minimizing the impact of photoswitching of fluorescent proteins on FRAP analysis. *Biophys J*, 2012. 102, 1656-1665.

5. Dayel, M. J., et al., Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophys J*, 1999. 76, 2843-2851.

6. Cho, U., et al., Rapid and tunable control of protein stability in *Caenorhabditis elegans* using a small molecule. *PLoS One*, 2013. 8, e72393.

7. Nixon-Abell, J., et al., Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science*, 2016. 354, aaf3928.

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 6 件)

1. Fujimori T, Suno R, Iemura SI, Natsume T, Wada I, Hosokawa N. Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation. *Genes to Cells*. 査読有, 2017, 8:684-698, DOI:10.1111/gtc.12506, 2017

2. Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Matsumoto N, Tanikawa T, Oka S, Tanaka Y, Arai S, Wada I, Sugiura T, Yamashita A. Carboxyl-terminal Tail-mediated Homodimerizations of Sphingomyelin Synthases Are Responsible for Efficient Export from the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*. 査読有, 292:1122-1141, 2017

3. Hosokawa N, Wada I, Association of the SEL1L Protein Transmembrane Domain with HRD1 Ubiquitin Ligase regulates ERAD-L. *FEBS Journal*, 査読有, 283:157-172 DOI:10.1111/febs.13564, 2016

4. Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nature commun*, 査読有, 6:8858 DOI:10.1038/ncomms9858, 2015

5. Kimura K, Kawaguchi K, Ueda Y, Arai S, Morita M, Imanaka T, Wada I. Characterization of Russell bodies accumulating the mutant antithrombin that derived from endoplasmic reticulum. *Biol. Pharm. Bull*. 査読有, 38:852-861 DOI:10.1248/bpb.b14-00773, 2015

6. Kimura K, Inoue K, Okubo J, Ueda Y,

Kawaguchi K, Sakurai H, Wada I, Morita M, Imanaka T. Endoplasmic Reticulum Stress Response and Mutant Protein Degradation in CHO Cells Accumulating Antithrombin (C95R) in Russell Bodies. *Biol Pharm Bull* 査読有, 38:1980-1984, 2015

[学会発表] (計 8 件)

1. Hosokawa N, Yu S, Yagi H, Ito S, Kato K, Wada I, ERp46 triggers mannose trimming activity of EDEM3. Intentional Symposium on ER stress, glycosylation, hotneostasis and diseases, RIKEN, 2018

2. 西村 浩二, 久我 一弘, 岩瀬 駿志, 和田 郁夫, 清水 英寿, 地阪 光生, 横田 一成, 中川 強, Improvement of fluorescence proteins suitable for live-cell imaging in the oxidative environment in plant cells, 第 59 回日本植物生理学会, 20182.

3. 荒井 齊祐, 橋本 仁志, 和田 郁夫, 小胞体膜の微小揺動に関する研究, 第 69 回日本細胞生物学会, 2017

4. 和田 郁夫, 高精度イメージングが教えること, 第 22 回日本臨床エンブリオロジスト学会, 2017

5. 細川 暢子, 和田 郁夫, SEL1L タンパク質による小胞体関連分解の調節機構, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017

6. 荒井 齊祐, 橋本 仁志, 井上 直和, 和田 郁夫, 小胞体の微小な揺らぎは細胞質反応を促進する, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

7. 鈴木 貴久, 和田 郁夫, 分泌系タンパク質イメージングのための蛍光タグの検討 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015

8. 細川 暢子, 和田 郁夫, 小胞体膜に存在する HRD1-SEL1L コピキチンリガーゼ複合体の機能解析, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015

[図書] (計 1 件)

1. Tuan Pham, Ikuo Wada, Chaos Analysis of ER-Network Dynamics in Microscopy Imaging, Taylor & Francis, A Handbook on Applications of Chaos Theory, 253-270, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 郁夫 (WADA, Ikuo)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40182969

(2) 研究協力者

吉田 宏 (Yoshida, Hiroshi)
荒井 齊祐 (Arai, Seisuke)
井上 直和 (Inoue, Naokazu)
橋本 仁志 (Hashimoto, Hitoshi)
竹内 真由美 (Takeuchi, Mayumi)