

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K16562

研究課題名(和文) 生きている細胞におけるオルガネラ膜上分子アッセンプリーの解明

研究課題名(英文) Identification of intracellular molecular interactions under living conditions

研究代表者

山口 亜利沙(宮川亜利沙)(YAMAGUCHI, Arisa)

高知大学・医学部・日本学術振興会 特別研究員

研究者番号：90553157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来技術では、生きている細胞内でどのような分子が会合しているかを解析できなかった。本研究では、申請者が独自に開発した「HRP 発現型・高特異性 EMARS 法」を用いて、各種オルガネラ膜上分子アッセンプリー同定法を確立しようとした。小胞体・ゴルジ・分泌小胞にHRPあるいはHRPと同様の酵素活性をもつAPEX融合タンパクを発現させ、EMARS反応を行ったところ、各器官の近傍分子が標識された。さらに、分泌小胞に関しては17個の会合分子が質量分析により同定された。以上のことから、細胞内においてEMARS法が適用可能であり、標識された分子は質量分析にて解析可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「HRP発現型・高特異性EMARS法」は、特異性・反応効率性・感度が確保されており、対象分子が微量でも検出可能である。よって、従来、細胞のホモジェネートやオルガネラの分画時に損失・離散していた微量な機能性分子を同定できる可能性が高い。また、従来ホモジェネート時に膜に張り付き、誤同定されていたであろう「コンタミ分子」が検出されない。本研究で確立された細胞内EMARS法を用いれば、多種多様な細胞の細胞内分子機構の解明に貢献するとともに、その解明を目指す生命科学分野の研究者に新しい展望を与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the issue of whether the EMARS system with fluorescein tyramide (FT) is applicable to analysis of co-clustered molecules in the intracellular organelles. To this end, we constructed HRP or APEX targeted to the ER, Golgi and secretory vesicle. The expressed HRP or APEX in the intracellular organelles were co-localized with fluorescein labeling resulting from the EMARS reaction. These observations indicate that the EMARS reaction with FT as the labeling reagent is applicable to the analysis of co-clustered molecules in the intracellular organelles.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：プロテオミクス 分子アッセンプリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の内部は、核、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、ミトコンドリア、小胞、ペルオキシソーム等の生体膜で囲まれたオルガネラで区画化されている。オルガネラ膜上では、各種受容体や輸送体などの機能分子が存在し、シグナル伝達や物質輸送を駆動している。これに関連することとして、細胞そのものを包む細胞膜上(オルガネラ膜)には、“脂質ラフト”と呼ばれる、特定の分子群が集合した‘分子アッセンブリー’が形成され、シグナル伝達などの様々な生命現象を引き起こすことが報告されている(Lingwood D, Simons K *Science* 2010; 327: 46-50)。このような脂質ラフトの研究は、これまで細胞膜を中心に展開されてきたが、最近オルガネラ膜においても脂質ラフトの存在が明らかとなってきた。一例をあげると、ゴルジ体の膜上では、ある脂質ラフトから機能性分子をのせた輸送小胞が形成され、細胞膜へのタンパク輸送に働いていることが示唆されている(Imjeti N. *et al. Mol. Biol. cell* 2011; 22: 4621-4634)。すなわち、生きて細胞では、脂質ラフトで分子アッセンブリーを形成する重要機能分子群が、オルガネラ膜間を行き来していると考えられる。そのため、生細胞のオルガネラ膜上分子アッセンブリーの実体を明らかにすることは重要な課題である。

従来、オルガネラ膜上分子アッセンブリーの研究には、細胞分画法でオルガネラを分離した後、膜を可溶化して目的分子と強固に結合する分子を解析する方法がとられてきた。しかし、ホモジェネートや可溶化などの操作時に、本来起こりえない分子の会合、あるいは機能分子の離散といったアーティファクトが生じる可能性が問題視されている。これに代わるものとしては、標的分子を蛍光標識することで、生きて細胞においてオルガネラ膜上の分子を可視化する方法がある。しかし、この方法は既知分子にしか利用できず、オルガネラ膜上の未知の会合分子の同定には適用できない。このように、従来技術では、生きて細胞のオルガネラ膜上分子アッセンブリーを解明することはできない。

本研究に先立ち、申請者は、「HRP 発現型 EMARS 法」という、生細胞の細胞膜上で分子アッセンブリーを網羅的に同定する方法を開発した。EMARSとは、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sourcesの略であり、アリールアジド基が、照射ではなく「西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)」によってナイトレンラジカルに活性化される反応に特徴がある(図1;吹き出し、旧バージョン)。本法では、1)HRP に関

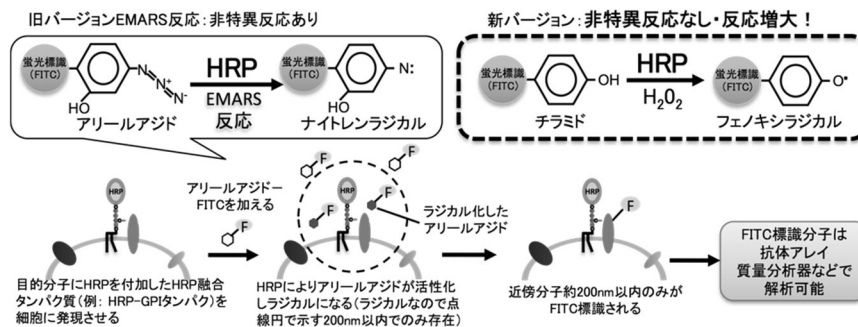


図1: EMARS法の概略

心のあるタンパク質の遺伝子を連結させ、その融合タンパク質を哺乳動物細胞に発現させる; 2)アリールアジドと蛍光色素(FITC)を結合させた「アリールアジド-FITC」の添加により、

アリールアジド基が HRP との反応でラジカル化される; 3)この結果、関心タンパク質の近傍にある(約 200 nm 以内)分子群のみが FITC 標識されて可視化できる。そして、これらの標識分子群は抗体アレイや質量分析器にて生化学的に同定することができる。申請者が開発した「HRP 発現型 EMARS 法」は、生命現象を司る細胞膜上分子間相互作用の理解を飛躍させる新技術として評価を受けている。これまで、本法を用いることで、申請者は、重要機能分子の一つ「GPI アンカー型タンパク質」が、細胞膜上で別個の分子アッセンブリーを形成し、それぞれが特徴的な糖鎖を持つことから、糖鎖が付加されるゴルジ体膜上でも分子アッセンブリーが形成されている可能性を示唆した(Miyagawa-Yamaguchi A. *et al. PLoS ONE* 2014; 9; e93054)。

そこで申請者は、HRP 融合タンパク質をゴルジ体等のオルガネラの膜上で発現させることにより、当該膜上で形成される分子アッセンブリーを高解像度に解析できるのではないかと考えた。しかしながら、標

標識試薬として用いていた「アリアルアジド-FITC」は、外から導入したHRPのみならず、細胞内の未知の内在水酵素によってもラジカル化される難点があった。この問題を克服すべく、最近、申請者は、「アリアルアジド-FITC」の代わりに、HRPの反応特異性が高い「チラミド-FITC」を標識試薬として採用し、H₂O₂添加に伴う過酸化反応によってフェノキシラジカルを生成する改良版EMARS法を構築した(図1;新バージョン)。この改良法により、問題とされていたラジカル反応の特異性を実用可能なレベルに高めることができ(図2と の比較)、さらにはその標識効率を劇的に増大させることに成功した(図2と の比較)。以上の経緯から、細胞内のオルガネラ膜上分子への「HRP 発現型 EMARS 法」の応用を実現可能にした。

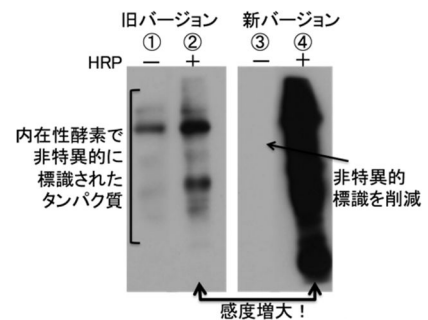


図2: EMARS反応の比較
FITC抗体を用いたウェスタンブロットにて検出したFITC標識分子

2. 研究の目的

真核細胞の内部は生体膜で囲まれたオルガネラで区画化されている。オルガネラ膜上では、受容体や輸送体などの機能分子がアッセンブリー(会合から生まれる集合体)を形成することで、シグナル伝達や物質輸送を駆動している。よって、生命現象を分子レベルで解明するには、オルガネラ膜上分子アッセンブリーの構造とその形成メカニズムを明らかにすることが求められている。しかし、従来技術では、生きている細胞内で、どのような分子が会合し集合体を形成しているかを解析することができない。本研究は、申請者が独自に開発した「HRP 発現型・高特異性 EMARS 法」を用いて、生細胞のオルガネラ膜上分子アッセンブリーを明らかにすることを目的とし、各種オルガネラ膜上分子アッセンブリー同定法を確立しようとした。本研究のオルガネラ膜上分子アッセンブリー同定法が確立されれば、生きている細胞内で繰り広げられるダイナミックな分子会合現象を高解像度に解明する画期的ツールが得られる。

3. 研究の方法

1. 各種オルガネラ膜において発現する HRP ベクターの作製 各種オルガネラ膜への移送分子としては、広く研究が行われている以下の分子を選定した。小胞体(Calnexin)、ゴルジ体(B4GALT1)、小胞(galectin3)をHRPあるいはAPEXに連結させたベクターを作製する。これをHeLa細胞に導入し、発現させた。抗HRP抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡によりHRPあるいはAPEXが各オルガネラに同在するかを確認した。

2. 各種オルガネラ膜における高特異性 EMARS 反応の至適化 各種オルガネラにHRPを発現させた細胞に、チラミド-FITCを添加し、高特異性EMARS反応を行った。この際、様々な反応時間、温度、濃度について条件検討を行った。この反応により各オルガネラが特異的に蛍光標識されるか共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また、細胞抽出液をSDS-PAGEにかけた後、蛍光イメージアナライザーにて標識分子を解析した。以上により、特異性と効率を解析し、最適条件を決定した。

3. EMARS 標識分子の同定 EMARS反応により標識された会合分子を、既に確立した方法で同定した。概略は、抗FITC抗体セファロースを用いて精製・濃縮した後、トリプシンにて消化したペプチド断片をLC-MS/MS質量分析を用いて同定した。

4. 研究成果

まず、細胞内にてEMARS法が適用可能か否かを解析するため、小胞体あるいはゴルジにHRP融合タンパクを発現させ、EMARS反応の条件を検討した。具体的には、小胞体保持シグナルであるKDELをHRPに付加したHRP-KDEL配列、およびゴルジに存在する酵素である1,4-galactosyltransferase1を付加した4GALT1-HRP配列を組み込んだベクターを作製した。これらを

HeLa 細胞に導入・発現させ、EMARS 反応を行った。その結果、発現した HRP-KDEL あるいは 4GALT1-HRP は、小胞体マーカー (calnexin) あるいはゴルジマーカー (GM130) と共局在し、さらには EMARS 反応による標識ラベルである Fluorescein と共局在していた。よって、細胞内オルガネラにおいても EMARS 法が適用可能であることが明らかとなった。また、さらに本法を改善するため、EMARS 反応を触媒する酵素について検討した。これまでの発現型 EMARS 法には、目的分子に HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) を付加した HRP 融合タンパクを使用していたが、本研究では、APEX (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) 融合タンパクを使用することとした。APEX は細胞内の様々な環境において、より高い活性が保持されることが報告されている (Science, 2013;339:1328-31)。ここでは、分泌タンパク質である galectin3 を付加した galectin3-APEX ベクターを作製した。これを HeLa 細胞に導入し、EMARS 反応を行ったところ、細胞内小胞にて EMARS 反応による標識ラベルである Fluorescein と galectin3 が共局在した。よって APEX が EMARS 法に使用可能であることが明らかとなった。

続いて、galectin3-APEX 配列を組み込んだベクターを用いて、小胞に galectin3 を発現させ、EMARS 反応を行い、標識分子を質量分析にて解析した。具体的には、galectin3-APEX 融合タンパク質を発現した HeLaWT およびガレクチン3の糖鎖認識部位に変異 (R186S) を導入した galectin3 糖鎖認識変異株 HeLaR186S を作製した。HeLaR186S 株は galectin3 の分泌が抑制されているため、HeLaWT 株の対照区として使用した。まず、HeLa WT および HeLa R186S 株において、発現した galectin3-APEX 融合タンパク質を用いて EMARS 反応を行った。EMARS 反応後、SDS-PAGE にかけて、抗 Fluorescein 抗体にてウェスタンブロットを行い、標識分子を解析した。その結果、どちらのサンプルにおいても標識分子のバンドが見られ、EMARS 反応が行われていることが明らかとなった。続いて、EMARS 反応後のサンプルを可溶性化後、抗 FITC 抗体セファロースにかけて標識タンパク質を精製、濃縮し、トリプシンにて消化したペプチドを LC-MS/MS 質量分析を用いて解析した。その結果、HeLa WT において 32 個、HeLa R186S において 52 個のタンパク質が同定された。このうち、HeLa R186S に同定されたタンパク質を除くと、16 個のタンパク質が HeLa WT において同定された。この中には、膜タンパク質として AP-1 complex subunit gamma-1 や Serine/threonine-protein kinase ULK2 などが同定されていた。以上のことから、細胞内にて EMARS 反応が適用可能であり、標識された分子は質量分析にて解析可能であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arisa Miyagawa-Yamaguchi, Norihiro Kotani, Koichi Honke	4. 巻 32
2. 論文標題 Each GPI-anchored protein species forms a specific lipid raft depending on its GPI attachment signal	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Glycoconj. J.	6. 最初と最後の頁 531-540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10719-015-9595-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kotani Norihiro, Nakano Takanari, Ida Yui, Ito Rina, Hashizume Miki, Yamaguchi Arisa, Seo Makoto, Araki Tomoyuki, Hojo Yasushi, Honke Koichi, Murakoshi Takayuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Analysis of lipid raft molecules in the living brain slices	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 140 ~ 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2017.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 本家 孝一、山口 亜利沙、小谷 典弘	4. 巻 69
2. 論文標題 特集 生体膜のバイオロジー . 新技術 EMARS法の開発と膜マイクロドメイン研究への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 258 ~ 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425200807	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Honke Koichi, Miyagawa-Yamaguchi Arisa, Kotani Norihiro	4. 巻 2008
2. 論文標題 The EMARS Reaction for Proximity Labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9537-0_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotani Norihiro, Yamaguchi Arisa, Ohnishi Tomoko, Kuwahara Ryusuke, Nakano Takanari, Nakano Yuka, Ida Yui, Murakoshi Takayuki, Honke Koichi	4. 巻 110
2. 論文標題 Proximity proteomics identifies cancer cell membrane cis molecular complex as a potential cancer target	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2607 ~ 2619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山口亜利沙、小谷典弘、本家孝一
2. 発表標題 各GPI-アンカータンパク質分子種はGPI付加シグナルに依存して固有の脂質ラフトを形成する
3. 学会等名 第56回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 山口亜利沙、小谷典弘、本家孝一
2. 発表標題 EMARS法は各GPI-アンカータンパク質分子種が固有の脂質ラフトドメインを形成することを明らかにした
3. 学会等名 第34回日本糖質学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N, Honke K
2. 発表標題 Distinction of lipid rafts including different GPI-anchored protein species by the EMARS method
3. 学会等名 The Fifth Symposium, RIKEN, Max Planck Joint Research Center (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高知大学医学部生化学講座
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_bichm/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----