

令和元年5月21日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14696

研究課題名(和文) ゴルジ装置から細胞膜へのGPIアンカー型タンパク質の輸送に働く因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Identification of factor proteins in the transport of GPI-anchored proteins to the cell surface from Golgi

研究代表者

田島 優子 (TASHIMA, YUKO)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10423104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質GPIアンカー型タンパク質(Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins; GPI-APs)のゴルジ装置から細胞表面への輸送を生細胞でモニターする方法を、近年に報告された可逆的タンパク質繫留法であるRetention using selective hooks法を応用して新たに確立した。この検出系を用いて、CRISPR/Cas9とsingle guide RNAライブラリーをHEK293細胞に導入し、作成した変異細胞集団から輸送の遅延する細胞を選別した。現在、ゴルジ装置から細胞膜へのGPI-APsの輸送に働く候補遺伝子の同定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで優れたシステムのなかったGPI-APsのゴルジ装置から細胞膜への輸送にフォーカスして、経時的・定量的に解析する系の樹立を試みたことに特色がある。更に、この領域の輸送に働く因子を網羅的に同定することは、GPI-APsの輸送のみならず、その輸送体と考えられているラフトの動態メカニズムの理解にもつながる可能性があり、ラフトの重要性を考慮すると、本研究成果の意義は大きい。また、GPI-APsは、細胞表面に発現した後も、細胞内のエンドソームや細胞外分泌性小胞エクソソームに移動する。これらの輸送のモニターや定量的方法を将来的に開発する土台として、本研究は波及効果が大きい。

研究成果の概要(英文)：Glycosylphosphatidylinositol (GPI) tether a hydrophilic protein on the plasma membrane. Synthesis of GPI-anchored proteins (GPI-APs) in the ER and its lipid remodeling in the Golgi have been studied very well, but the transport process to the cell surface from the Golgi have not been known well. We newly established a method to monitor the transport of GPI-APs to the cell surface from the Golgi using retention using selective hooks system [Boncompain G et al., Nature methods, 2012] and HEK293 cells. To identify factor proteins for transport of GPI-APs to the cell surface from the Golgi, we used this method by introducing reporter cells with CRISPR/Cas9 and single guide RNA library. We sorted mutant cells that delayed transport of a reporter GPI to the cell surface from the Golgi. The candidate factor proteins to be related with transport of GPI-APs are analyzing by next generation sequencing.

研究分野：分子細胞化学

キーワード：糖脂質GPI GPIアンカー型タンパク質 細胞内輸送 ゴルジ装置

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

### 1. 研究開始当初の背景

GPI(Glycosylphosphatidylinositol)は糖脂質であり、翻訳後修飾として150種ほどのタンパク質を細胞膜につなぎ止め、その輸送や機能に深く関与する。GPI-APsは、受容体・接着因子・補体など様々な分子があり、細胞表面でラフトと呼ばれるマイクロドメインに主に分布するとされている。

研究代表者が申請当時に所属していた研究室(木下タロウ教授研究室)では、細胞表面のGPI-APsの発現量が低下した異常細胞株を樹立して変異遺伝子を特定することで、GPI-APsの合成に働く大部分の遺伝子を同定し、GPI-APs研究に関して世界トップクラスの検出技術確立してきた。GPI-APsの輸送研究では、VSVGの温度感受性フォールディング異常を利用して薬剤によって転写が誘導できる温度感受性レポーターGPI-APsを作製し、小胞体からの同調した輸送開始を制御し、小胞体から細胞表面への輸送動態を鋭敏に定量する方法を樹立した<sup>1)</sup>。この方法で、小胞体でGPIの糖鎖リモデリングを行うPGAP5遺伝子<sup>2)</sup>、小胞体からゴルジ装置への輸送にp24タンパク質複合体が働くことなどを報告した。しかし、このシステムでは小胞体から細胞膜への輸送を一括りに検出し、小胞体から中継点のゴルジ装置への輸送やゴルジ装置から細胞膜への輸送など空間ごとの詳細な解析は出来なかった。20℃処理でゴルジ装置にタンパク質を蓄積させる方法があるが、低温による代謝の低下で小胞体からゴルジ装置への輸送も遅くなるために、GPI-APsをゴルジ装置へ短時間で移動させることが難しい。また、20℃という非生理的環境に細胞を長時間暴露させることは、ストレスに加え、輸送の再開時に生理的な状況(特にラフト構築など)を再現できるかという問題があると考えられる。これらの課題を克服するために、上述した温度感受性レポーターGPI-APsのシステムに近年に報告された優れた可逆的タンパク質繫留法RUSHを組み合わせることで生理的環境下でゴルジ装置から細胞膜へのGPI-APsの輸送を経時的・定量的に測定できるのではないかとこの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、GPI-APsの動態を生細胞で空間的・経時的・定量的にモニターするために、可逆的タンパク質繫留法RUSHを応用して新しい方法を確立し、ゴルジ装置から細胞膜へのGPI-APsの輸送に働く遺伝子を一度に網羅的に同定することである。

### 3. 研究の方法

可逆的タンパク質繫留法(RUSH: Retention using selective hooks法)<sup>3)</sup>は、ストレプトアビジン結合部位(Sb)とストレプトアビジン(Str)をそれぞれ融合した2つのタンパク質の結合のオン・オフをピオチン添加によって細胞内で素早く切り換えることのできる新しいシステムである。レポーターGPIにSbを融合し、ゴルジ装置局在フックタンパク質にストレプトアビジンを融合して、両方を共発現するレポーター細胞株を新たに樹立し、ゴルジ装置での繫留と輸送開始を制御する系を構築した。

#### (1) レポーターGPIとフックタンパク質の発現プラスミドの作製

当初は、研究代表者が申請当時に所属していた研究室で作成された温度感受性レポーターGPI-APsにRUSHシステムを導入して、温度感受性部位による小胞体での蓄積、さらにRUSHシステムによるゴルジ装置での繫留と2段階で蓄積可能なシステムに改変する計画であった。しかし、この温度感受性レポーターGPI-APsをゴルジ装置で繫留することを確立できなかった。そこで、温度感受性部位のないレポーターGFP-GPIを用いることにした。GFP-GPIのN末端にSb-Flagを融合して、Sb-Flag-GFP-GPIをレポーターGPIとして発現するプラスミドを作製した。フックタンパク質は、ゴルジ装置の内腔側に発現するMannosidaseIIにストレプトアビジン、HAタグ及びmCherry蛍光タンパク質を融合して作製した(ManII-Str-HA)。MannosidaseIIは、RUSH法ですでに使用され、ゴルジ装置での蓄積が細胞内輸送に悪影響しないことが確認されている<sup>3)</sup>。ManII-Str-HAの遺伝子配列の後にInternal ribosome entry site(IRES)配列を挿入し、続いてSb-Flag-GFP-GPIを発現するプラスミドを作製した。

#### (2) レポーターGPIとフックタンパク質を組み込んだレポーターGPI細胞株の樹立

(1)で作成したレポーターGPIとフックタンパク質の発現プラスミドをHuman Embryonic kidney (HEK)293細胞に安定に組み込んだ。本発現プラスミドは、プラストサイジンS耐性遺伝子を含むので、プラストサイジンS存在下で培養することで、本発現プラスミドを保持する細胞集団を選出した。この細胞をドキシサイクリン処理してレポーターとフックタンパク質の発現を誘導した後、レポーターGPIを高発現する細胞をGFPシグナルを指標にセルソーターで選別した。そして、限界希釈によりクローン細胞株を樹立した。以後、このレポーターGPI細胞を用いて実験を行った。

#### (3) ゴルジ装置から細胞膜への輸送をモニターする系の樹立

レポーターGPIとフックタンパク質の発現を誘導するのに最適なドキシサイクリン濃度と処理時間を検討した。レポーターGPI細胞を12-well plateに播種し、翌日にドキシサ

イクリンを添加後、数時間から2日間培養し、GFPの発現をフローサイトメトリーで検出した。

ドキシサイクリンで発現誘導したレポーターGPIがゴルジ装置に蓄積するかどうかを調べた。レポーターGPI細胞をドキシサイクリンで24時間処理後に、200  $\mu$ M ビオチンを加え、37 でインキュベートした。細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% TX-100で透過処理後、顕微鏡でGFPを観察した。フックタンパク質(ManII-Str-HA)は、抗HA抗体で染色し、その局在を観察した。

レポーターGPIとフックタンパク質(ManII-Str-HA)の結合を免疫沈降法で調べた。レポーターGPI細胞を6-well plateに播種し、ドキシサイクリンで24時間処理した後、細胞溶解液を調製した。抗HA抗体とProtein G beadsで免疫沈降した。共沈したタンパク質をポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により分離して、ウエスタンした。抗HA抗体でフックタンパク質を検出し、抗Flag抗体でレポーターGPIを検出した。

ビオチンを加えて、レポーターGPIがフックタンパク質から解放されて輸送を開始し、細胞表面に到達するかどうかを検討した。レポーターGPI細胞を12-well plateに播種し、ドキシサイクリンで24時間処理した後、トリプシン処理で集めた。ビオチンを添加して37 で1時間インキュベートした後、抗Flag抗体と抗マウスIgG二次抗体(PE conjugate)で染色し、フローサイトメトリーによって定量した。また、レポーターGPIをフックタンパク質から解放するのに必要なビオチン濃度と処理時間を検討した。

#### (4) ゴルジ装置から細胞膜へのレポーターGPI輸送に遅延を起こす遺伝子の網羅的な同定

レンチウイルスを利用して、Human GeCKOv2 CRISPR knockout pooled library (From Feng Zhang, Addgene)をレポーターGPI細胞に遺伝子導入した。ピューロマイシン存在下で7日間培養し、遺伝子導入されなかった細胞を除いた。さらに、約2.5週間培養を続けて、変異細胞ライブラリーを作製した。次に、(3)で確立した条件で、ゴルジ装置から細胞膜へのレポーターGPIの輸送が遅れる細胞を変異細胞ライブラリーからセルソーターで選別した。このセルソーティングを3回繰り返して行い、変異細胞を濃縮した。この変異細胞集団からゲノムを抽出した。コントロールとして、選別しない変異細胞ライブラリーからゲノムを抽出した。このゲノムをもとに、CRISPRによってKnockoutされた遺伝子を次世代シーケンサーで解析し、変異細胞群で濃縮されている候補遺伝子を同定することを試みている。

## 4. 研究成果

### (1)レポーターGPIとフックタンパク質の作製

当初、研究代表者が申請当時に所属していた研究室で作成された温度感受性レポーターGPI-APsにRUSHシステムを導入することを試みた。しかし、温度感受性レポーターGPI-APsがフックタンパク質であるManII-Str-HAに十分に結合できず、温度感受性レポーターGPI-APsをゴルジ装置で繫留することに成功しなかった。そこで、温度感受性部位を持たないレポーターGPI(Sb-Flag-GFP-GPI)を発現するプラスミドを作製した。フックタンパク質として、ManII-Str-HAを作製した。フックタンパク質の遺伝子配列とレポーターGPIの遺伝子配列をIRES配列で繋げ、フックタンパク質の発現量がレポーターGPIより多くなるようにした。またTet-onシステムによってドキシサイクリン処理で転写をオンにし、両タンパク質を同時に発現誘導できるようにした。

### (2)レポーターGPIとフックタンパク質を組み込んだレポーター細胞株の樹立

HEK293細胞で、レポーターGPIとフックタンパク質をドキシサイクリン誘導性に発現する細胞株を樹立した。ドキシサイクリンによって誘導されるレポーターGPIの発現が高く、フローサイトメトリー解析で検出されるGFPシグナルのピークがシャープな細胞を選出した。

### (3)ゴルジ装置から細胞膜への輸送をモニターする系の樹立

レポーターGPIとフックタンパク質の発現を誘導するために、ドキシサイクリン0.05  $\mu$ g/mLで24時間処理することで、十分量のGFPの発現をフローサイトメトリーで検出できた。

ドキシサイクリン0.05  $\mu$ g/mLで24時間処理後にレポーターGPIがゴルジ装置に蓄積していることを顕微鏡で確認した。また、フックタンパク質は、抗HA抗体で検出し、ゴルジ装置に局在していることが観察された。よって、ビオチン添加前は、レポーターGPIとフックタンパク質は共局在していることがわかった。ビオチン添加前のGFPのシグナルはゴルジ装置に強く検出されるが、200  $\mu$ M ビオチン添加後は、15、30、45分と経過するにつれて、ゴルジ装置のGFPのシグナルは弱くなり、細胞膜のGFPのシグナルが強くなることが観察された。

ドキシサイクリンで両タンパク質の発現を誘導後、抗HA抗体で免疫沈降すると、フックタンパク質と共に、レポーターGPIが抗Flag抗体により検出された。レポーターGPIがフックタンパク質と結合していることがわかった。

細胞表面のレポーター-GPI の発現は、ビオチン添加後、20, 40, 60 分と経時的に増加した。ゴルジ装置から細胞表面へのレポーター-GPI の輸送をモニターするためには、ビオチン濃度 200  $\mu$ M で 40 分間処理することが最適であるとわかった。

以上、- より、ゴルジ装置から細胞膜へのレポーター-GPI の輸送をモニターする系を確立できた。以後、ドキシサイクリン 0.05  $\mu$ g/mL で 24 時間処理後、ビオチンを添加して 37 で 40 分間インキュベートした時に細胞表面で発現するレポーター-GPI を定量し、ゴルジ装置から細胞表面への輸送を比較することとした。

#### (4) ゴルジ装置から細胞膜へのレポーター-GPI 輸送に遅延を起こす遺伝子の網羅的な同定

変異細胞ライブラリーは順調に作製できた。ゴルジ装置から細胞表面へのレポーター-GPI の輸送が、ビオチン添加後 40 分の時点で遅延している変異細胞をセルソーターで選出した。3 回のソーティング後、レポーター-GPI の輸送が遅延した変異細胞集団を得た。この変異細胞集団から、十分量のゲノムを抽出した。現在、ゴルジ装置から細胞表面へのレポーター-GPI の輸送に働く候補遺伝子を同定するために次世代シーケンサーの解析を進めている。

#### (5) 結論

本研究では、近年に報告された可逆的タンパク質繫留法 RUSH を応用して、ゴルジ装置から細胞表面への GPI-APs の輸送を HEK293 細胞で検出する方法を新たに確立した。さらに、この検出系を利用して、ゴルジ装置から細胞膜への GPI-APs の輸送に働く遺伝子の網羅的な同定を試みた。候補遺伝子については解析中である。

#### <引用文献>

- 1) Takida S, Maeda Y, Kinoshita T. Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochemical journal*. 2008. 409(2):555-562
- 2) Fujita M, Maeda Y, Ra M, Yamaguchi Y, Taguchi R, Kinoshita T. GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. *Cell*. 2009. 139(2):352-365
- 3) Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, Mercanti V, Jollivet F, Raposo G, Perez F. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nature Methods*. 2012. 9(5):493-498.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yuko Tashima, Tetsuya Okajima. Congenital diseases caused by defective O-glycosylation of Notch receptors. *Nagoya J Med Sci*. 査読有、80(3)巻、2018、299-307, Review
2. 田嶋優子. プラスミノゲン栃木変異は血漿プラスミン活性を低下させるが、血栓症モデル実験では症状を悪化させない. 日本血栓止血学会誌. 査読無、29(4)巻、2018、398-404
3. Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata. Plasminogen Tochigi mice exhibit phenotypes similar to wild-type mice under experimental thrombotic conditions. *PLoS One*. 査読有、12(7)巻、2017、e0180981、doi: 10.1371/journal.pone.0180981

##### 〔学会発表〕(計 2 件)

1. 田嶋優子. Plasminogen Tochigi mice show reduced fibrinolytic activity but exhibit phenotypes similar to wild-type mice under experimental thrombotic conditions. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、学術奨励賞受賞講演、2018 年
2. 田嶋優子、木下タロウ. GPI アンカー型タンパク質の小胞体からの輸送に働く p24 タンパク質複合体のサブユニット構成の解析. 第 35 回日本糖質学会年会、2016 年

##### 〔図書〕(計 0 件)

##### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
該当なし

6．研究組織  
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。