

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02400

研究課題名（和文）PI(4)P依存的な小胞体-細胞膜接触部位による細胞運動制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of membrane contact sites controlled by PI4P

研究代表者

中津 史（Nakatsu, Fubito）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50360607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年、オルガネラは互いに近接して“膜接触部位”を形成し、直接物質や情報をやり取りすることで細胞機能を維持していることがわかってきた。特に膜接触部位では脂質の輸送が制御されているが、その機能については不明な点が多く残されている。本研究から、小胞体と細胞膜、及び小胞体とエンドソームの間に形成される新たな膜接触部位の制御と機能が明らかになり、膜接触部位を介した脂質交換輸送の生理的役割の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜接触部位は、がん、神経変性疾患、ウイルス感染症など様々な疾患との関連が明らかになりつつある。近年のイメージング解析や生化学的・細胞生物学的解析技術の進歩により、新たな膜接触部位や膜接触部位形成分子が同定されているものの、その生理機能に関する知見は未だ十分に得られていない。本研究により得られた知見は、膜接触部位の生理機能解明の大きな手がかりになり、疾患の機序解明や新たな治療薬開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Membrane contact sites (MCSs) are zones where cellular membranes are closely apposed. MCSs serve as platforms for exchanging materials including lipids or ions. Recent technical advances have accelerated the identification of the novel MCSs. However, their physiological functions remain elusive. Our study revealed novel insights into MCSs between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane or endosomes, which would contribute to the deeper understanding of the role of MCSs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜接触部位 メンブレンコンタクト イノシトールリン脂質

1. 研究開始当初の背景

“膜接触部位”とは、細胞膜やオルガネラ膜同士が部分的に 10-30nm で近接する領域である。近年、オルガネラは互いに近接して直接物質や情報をやり取りすることで細胞機能を維持していることがわかってきた。中でも小胞体は、細胞内に広く分布して、ほとんどのオルガネラ膜や細胞膜と膜接触部位を形成していることが明らかになりつつある (図 1 左)。

膜接触部位では、脂質が交換輸送されていることがわかってきた。我々は、小胞体-細胞膜接触部位において、2 種類の異なる脂質 (ホスファチジルセリンと phosphatidylinositol 4-phosphate

(PI4P)) が交換輸送されることを見出した (Chung et al., 2015)。これは、脂質輸送タンパク質であるオキシステロール結合タンパク質ファミリー・ORP5 及び ORP8

によって媒介される脂質交換輸送である。この交換輸送は、細胞膜で合成された後小胞体で分解されるという PI4P の代謝特性によって生じる細胞膜と小胞体間の PI4P の濃度差が鍵となっていた。つまり、PI4P は細胞膜から小胞体へ濃度差に沿って一方向性に輸送され、これがホスファチジルセリンの逆向き方向の輸送を促進していた。これは PI4P の濃度勾配が駆動する脂質交換輸送であった (Nakatsu & Kawasaki, 2021)。

近年の急速な膜接触部位研究の進展により様々な膜接触部位が同定され、その多くが脂質制御に関与することが判明しつつある。しかし膜接触部位の生理機能に関しては、十分に明らかになっていない。膜接触部位は、半世紀以上前からその存在が形態学的に示唆されていた。近年、膜接触部位で何が起きているかに関する知見は徐々に蓄積してきたが、それによってどのような細胞内プロセスが制御され、どのような細胞生理機能を担うのかについては、不明な点が多い。

2. 研究の目的

申請者は、PI(4)P 研究の経験・実績から、膜接触部位形成の鍵は PI(4)P である点、細胞膜 PI(4)P が細胞膜シグナリングや細胞運動に密接に関与する点などに着目した。本研究は、PI4P 依存的な膜接触部位による細胞運動制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞に種々のプラスミドを導入して発現させ、定法に従い免疫染色後にオリンパス社 FV3000 共焦点顕微鏡システムを用いて観察した。また、ライブイメージングは 37°C にて同共焦点顕微鏡を用いて解析した。データ解析には Image J ソフトウェアを用いて行った。APEX2 を用いた近傍分子ラベル化法は、原著 (Rhee et al., 2013) に従って行った。ノックアウト細胞の作成は、CRISPR/Cas9 法を用いて、シーケンス解析によるゲノム配列の確認、およびウエスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析により行った。

4. 研究成果

(1) PI4P は、細胞膜において phosphatidylinositol 4-kinase type IIIa によって合成され、シグナル伝達や細胞骨格の制御に重要な役割を担う。方向性を持って運動している細胞の細胞膜イノシトールリン脂質分布をあらためて詳細に調べるために、抗体染色法による検出を試みた。抗体染色法によるイノシトールリン脂質の検出は、論文報告 (Hammond et al., 2009) されているものの、条件設定が極めて困難であった。そこで、種々の培養条件、固定化条件などを検討し、野生型細胞で最終的に精度良くイノシトールリン脂質の検出が可能なる条件を見いだした。これをもとに、運動性の高い細胞をイノシトールリン脂質種に対する抗体で染色したところ、特に PI4P の分布の偏りを検出した。phosphatidylinositol 4-kinase type IIIa に対する特異的阻害剤を用いてその効果を検証したところ、特異的阻害剤の処理によって細胞膜の膜ラフリングの消失および細胞運動の顕著な低下が観察された。

(2) 上記の現象をさらに検証するために、まず PI4P を急速に分解するイノシトールリン脂質操作法の樹立を試みた。これを達成するために、FRB-FKBP ヘテロ 2 量体形成誘導システムを用いて PI4P 脱リン酸化酵素である INPP5F/Sac2 の酵素ドメインを細胞膜に急速にリクルートする手法の確立を目指した。mTOR の FKBP12 ラパマイシン結合ドメインである FRB をミリスチル化により細胞膜に局在化させた。そして、FK506 結合タンパク質 FKBP12 をイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素ドメインに融合したキメラ分子を発現させ、ラパマイシンを添加する

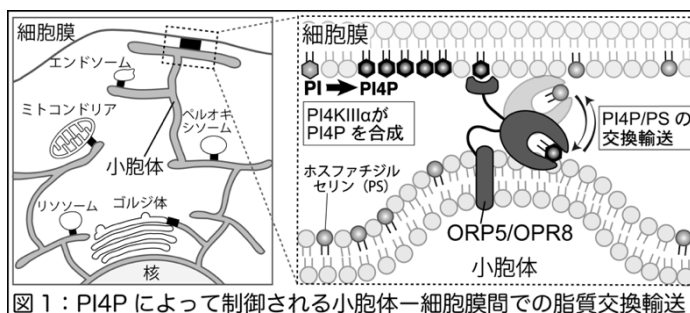


図 1: PI4P によって制御される小胞体-細胞膜間での脂質交換輸送

ことで、このキメラ分子を細胞膜に急速にリクルートする系を作成した。この系を用いて、細胞膜の PI4P 量の変化を PI4P 特異的プローブである OSBP-PH を用いて検出したところ、ラパマイシン添加後急速に細胞膜 PI4P の減少が確認された (図 2)。この FRB-FKBP システムによる PI4P 脱リン酸化ツールを用いて細胞膜の PI4P を急速に分解誘導したところ、膜ラフリングの消失及び細胞運動の顕著な低下が観察された。

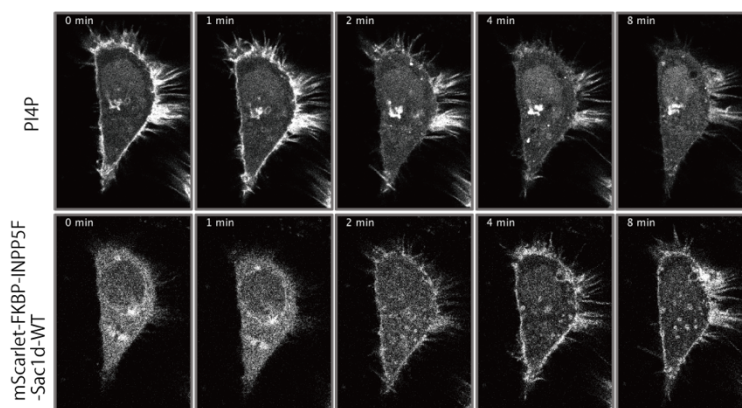


図 2 FRB-FKBP ヘテロ 2 量体形成誘導システムによる PI4P 操作ツール mTOR の FKBP12 ラパマイシン結合ドメインである FRB をミリスチル化により細胞膜に局在化させ、FK506 結合タンパク質 FKBP12 をイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素ドメインに融合したキメラ分子 (mScarlet-FKBP-INPP5F-Sac1d-WT) を発現させた細胞にラパマイシンを添加すると、このキメラ分子は細胞膜にリクルートされ (下段)、これに伴い細胞膜 PI4P が減少した (上段)。

(3) 膜ラフリング形成や細胞運動などの細胞膜機能を

制御する小胞体-細胞膜接触部位形成分子の同定を試みた。バイオインフォマティクスを駆使した *in silico* スクリーニング等から、小胞体-細胞膜接触部位形成候補分子として、13 分子

(ER-PM contact (EPC) 1-13) を同定した。これらを細胞に発現させ、その局在を詳細に検討したところ、EPC 5 が小胞体-細胞膜接触部位に局在することが判明した (図 3)。EPC3 は、細胞膜局在化ドメインなどの複数のドメイン構造を有する分子であるが、その機能はほとんど明らかになっていない。更なる詳細なイメージング解析から、EPC 5 は先端端付近に小胞体-細胞膜接触部位を形成することが明らかになった。また、APEX2 による近傍分子ラベル化法を用いた網羅的な近傍局在タンパク質の同定や分子細胞生物学的解析から、EPC3 はシグナル伝達や細胞骨格制御に関与することが判明した。phosphatidylinositol 4-kinase type IIIa に対する特異的阻害剤や FRB-FKBP ヘテロ 2 量体形成誘導システムによる PI4P 脱リン酸化ツールを用いた PI4P 急速分解により、EPC 5 による小胞体-細胞膜接触部位形成および細胞運動制御能の低下が観察された。

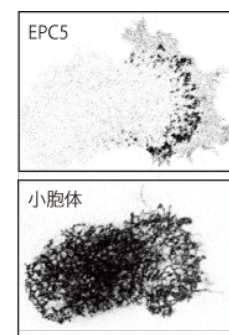


図 3 EPC5 による小胞体-細胞膜接触部位形成

(4) 上記解析を行う中で、高い運動性を示す細胞では、小胞体-エンドソーム膜接触部位が高頻度に形成する知見を得た。特に、オキシステロール結合タンパク質ファミリーのうち、脂質交換輸送活性が示されていない分子種による小胞体-エンドソーム膜接触部位の形成が観察された。そこで ORP10 に着目して局在を解析したところ、小胞体局在タンパク質 VAP 及び ORP9 に依存して小胞体-エンドソーム膜接触部位を形成することが判明した (Kawasaki et al., 2022)。また、脂質生化学的解析から ORP10 は、PI4P とホスファチジルセリンを交換輸送する活性を有すること、ORP10 ノックアウト細胞では、エンドソームの PS レベルが減少することなどが明らかになり、膜接触部位を介した脂質交換輸送による細胞運動制御が示唆された。

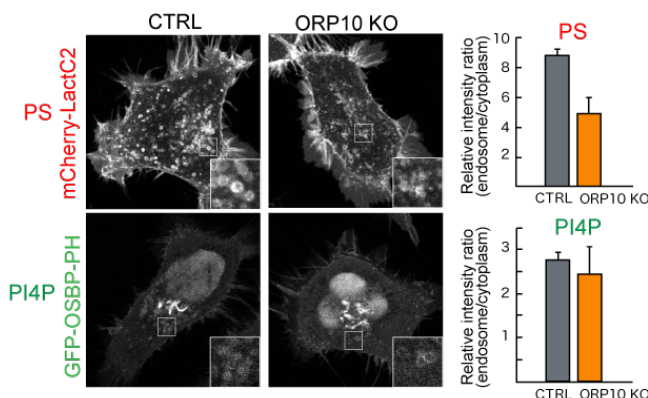


図 4 小胞体-エンドソーム膜接触部位における脂質交換輸送 ORP10 ノックアウト細胞におけるホスファチジルセリン (PS) (上段) および PI4P (下段) の得意的プローブを用いた定量解析。

<引用文献>

Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czapl H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, De Camilli P.: INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):428-32. doi: 10.1126/science.aab1370.

Kawasaki A, Sakai A, Nakanishi H, Hasegawa J, Taguchi T, Sasaki J, Arai H, Sasaki T, Igarashi M, Nakatsu F.: PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome

fission. *J Cell Biol.* 2022 Jan 3;221(1):e202103141. doi: 10.1083/jcb.202103141. Epub 2021 Nov 24.

Hammond GR, Schiavo G, Irvine RF.: Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P(2). *Biochem J.* 2009 Jul 29;422(1):23-35. doi: 10.1042/BJ20090428.

Nakatsu F, Kawasaki A.: Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 24;9:664788. doi: 10.3389/fcell.2021.664788. eCollection 2021.

Rhee HW, P. Zou, N.D. Udeshi, J.D. Martell, V.K.Mootha, S.A. Carr, A.Y. Ting.: Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339 (2013), pp. 1328-1331

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sawada Shunsuke, Nakamura Akinobu, Yoshii Tatsuyuki, Kuwata Keiko, Nakatsu Fubito, Tsukiji Shinya	4. 巻 56
2. 論文標題 Protein-recruiting synthetic molecules targeting the Golgi surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 15422 ~ 15425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0cc06908f	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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質・PI4Pが駆動する脂質対向輸送システム
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学会プレシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Phosphoinositide-driven lipid countertransport at membrane contacts
3. 学会等名 第72回細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河崎麻実、中津 史
2. 発表標題 小胞体-エンドソーム膜接触部位における脂質交換輸送の生理機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質が駆動する脂質交換輸送システム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質・PI(4)P の新しい生理機能:膜接触部位形成と脂質交換輸送制御
3. 学会等名 2018年生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送とその生理機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質によるメンブレンコンタクト形成と脂質 交換輸送制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------