

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15752

研究課題名（和文）近位依存性ビオチン標識を用いたライリンの新規相互作用分子の同定による機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of layilin by identification of layilin-interacting proteins using proximity-dependent biotin identification

研究代表者

土屋 貴大 (Tsutiya, Atsuhiko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：30790068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近位依存性ビオチン標識（BioID）とそれに続く二次元ウエスタンブロットにより、ライリンと結合したと思われるタンパク質スポットを17個見出した。質量分析によりこれらのタンパク質の同定を試み、複数の候補タンパク質が同定された。一方、二重免疫細胞染色を用いたライリンの細胞内局在の解析により、ライリンがミトコンドリアとその近傍に主局在することが見出された。さらに、ライリンがサイクリン依存性キナーゼ1（CDK1）とダイナミン関連タンパク質1（DRP1）の活性化を介してミトコンドリアの切断を促進す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

これまでライリンが結合するタンパク質は、一部の細胞骨格タンパク質を除いて不明であった。本研究はライリンと細胞質中で結合する新規候補タンパク質を複数同定できたという点で学術的意義がある。また本研究は、これまでヒアルロン酸の受容体とされていたライリンについて、「ミトコンドリアの切断促進」という新たな細胞内での機能を見出したという点で学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Proximity-dependent biotin identification (BioID) followed by 2D Western blot showed 17 protein spots that were likely bound to layilin. We analyzed them by mass spectrometry and identified several candidate proteins. On the other hand, we analyzed subcellular localization of layilin using double immunocytochemistry and found that layilin localized to mitochondria or in their close proximity. In addition, we revealed that layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and dynamin-related protein 1 (DRP1) activation.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：ライリン 近位依存性ビオチン標識 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) ライリンは構造的には細胞外ドメインとされる N 末端側に C 型レクチン様モチーフを持つ膜貫通型タンパク質であり、ヒアルロン酸の受容体とされている (Bono et al., 2001)。一方で、タリン等の細胞骨格関連タンパク質と結合し (Borowsky et al., 1998)、細胞接着や癌細胞の浸潤・転移に関与することが示唆されている (Zhuo et al., 2006)。また、研究代表者のグループは、腎炎患者の腎組織においてライリンの発現が増強していることを見出した (Adachi et al., 2015)。さらに、がん組織における T 細胞疲弊にライリンが関与することが最近報告された (Zheng et al., 2017)。これらの報告から、ライリンが多様な機能を持ち病態に関わっていると考えられるが、その分子機序は不明である。また、ライリンの生理的機能も分かっていない。

(2) 研究代表者はこれまでに、神経膠腫細胞株 A172 や T98G、尿管上皮細胞株 KMRC-1 の他、複数の細胞株を用い、構造的には膜受容体であるライリンが実際には細胞質中に、特に核近傍に、斑点状に主局在することを見出した。その際、ライリンの N 末側を認識する抗体でも、C 末側を認識する抗体でも、同様の染色結果が示された。およそ膜タンパク質とは言えない局在であり、ライリンは細胞質中においても機能を有しているのではないかと考えるに至った。これを明らかにすることにより、これまで単なるヒアルロン酸受容体の 1 つとされていたライリンの新たな役割が見出される可能性がある。また上述の病態にライリンが関与する意義の解明にも繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究はライリンの細胞質中での機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではライリンの細胞質中での機能を明らかにするために、(1) ライリン結合タンパク質の網羅的解析、および (2) ライリンの細胞内局在の解析、の 2 つのアプローチで研究を進める。

(1) ライリン結合タンパク質の網羅的解析

本研究では、ライリンと細胞質中で結合するタンパク質を網羅的に同定する。そして、それらの分子的関連性からライリンの細胞質中での機能を明らかにする。

ライリンと細胞質中で結合するタンパク質の解析手法として、近位依存性ビオチン標識 (BioID) という新しい技術を用いる。この技術では、ライリンと結合した (あるいは近位にまで近づいた) タンパク質を、BioID2 (近年改良されたビオチンリガーゼ) によりビオチン標識し、標識されたタンパク質を質量分析で網羅的に同定する。ごく短時間の一時的な結合でも捉えることができ、従来の免疫沈降を大きく超える感度を持つという特徴がある。

本実験には研究代表者が樹立した細胞株を用いる。この細胞株はドキシサイクリン (Dox) によって BioID2 とライリンの細胞内領域との融合タンパク質 (BioID2-ライリン²⁵⁰⁻³⁷⁴) を安定して発現させることができる。ライリン²⁵⁰⁻³⁷⁴ と一時的にでも結合したタンパク質は、BioID2 によりビオチン標識される。本細胞のタンパク質抽出液を二次元電気泳動で分離し、メンブレンへ転写後、ストレプトアビジン-HRP を用いてビオチン標識タンパク質のスポットを検出する。コントロール (BioID2 のみ) と比べ、BioID2-ライリン²⁵⁰⁻³⁷⁴ でのみ検出されるビオチン標識タンパク質スポットを同定の対象とする。これらのタンパク質スポットはトリプシン消化後、質量分析 (MALDI-TOF/MS) に供し、ライリン結合タンパク質を同定する。

(2) ライリンの細胞内局在の解析

本研究では、ライリンが細胞内のどこに局在するかを明らかにする。そして、ライリンはその局在部位で役割を果たしていると仮説を立て、これを検証することによりライリンの細胞質中での機能を明らかにする。

ライリンに対する抗体と各オルガネラ (ミトコンドリア、小胞体、リソソーム、ゴルジ装置、ペルオキシソーム、初期エンドソーム、後期エンドソーム) のマーカータンパク質に対する抗体を用いた二重免疫細胞染色を HEK293T 細胞で行う。染色した細胞の画像は共焦点レーザー顕微鏡により取得する。撮影した細胞の画像を用いた共局在解析は ImageJ ソフトウェアを用いて行う。具体的には、ライリンのシグナル面積のうち、各オルガネラマーカータンパク質のシグナルに重なる割合を算出する。これによりライリンの細胞内局在を明らかにする。

次に、ライリンが局在部位でどのような役割をするか明らかにする。形態面からの探索として、siRNA でライリンの発現抑制を行い、ライリンが局在するオルガネラの形態変化が起こるか否かを観察する。また、形態変化が見られた場合、そこに関与することが報告されているタンパク質の量を、ウェスタンブロットにより解析する。

4. 研究成果

(1) ライリン結合タンパク質の網羅的解析

BioID とそれに続く二次元ウエスタンブロットにより、ライリン²⁵⁰⁻³⁷⁴ と結合したと思われるタンパク質スポットを 17 個見出した。質量分析によりこれらのタンパク質の同定を試み、複数の候補タンパク質が同定された。現在、これらの同定されたタンパク質がライリンと直接結合するか等、さらに検討を進めている。

また、より多くのライリン相互作用タンパク質を同定するために、BioID を行ったサンプルを用いた液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を実施する予定である。

(2) ライリンの細胞内局在の解析

ライリンと各オルガネラのマーカータンパク質に対する抗体を用いた二重免疫細胞染色を行った。その結果、ライリンのシグナルは他のオルガネラマーカーと比べてミトコンドリアマーカー (TOMM20) のシグナルと重なる割合が高かった。具体的には、ライリンのシグナル面積の約 75%が TOMM20 のシグナルと重なっていた。また、ライリンのシグナル面積の約 35%は小胞体マーカー (カルネキシン) のシグナルと重なっていた。ライリンのシグナルがそれ以外のオルガネラマーカーのシグナルに重なる面積の割合は 10%以下であった。これらの結果から、ライリンはミトコンドリアとその近傍に主局在することが示された。

上記の結果を踏まえ、ライリンがミトコンドリアで役割を果たしている可能性を考え、これを検討した。まずライリン siRNA (siL-1 および siL-2) によりライリンの発現を抑制させた HEK293T 細胞のミトコンドリアの形態を観察した。対照として用いたコントロール siRNA (siC) 導入細胞では、長径の比較的短いミトコンドリア (fragmented mitochondria) が大部分であった (図 1 上段)。その形状は無処理の細胞におけるミトコンドリアの形状とほぼ同じであった (data not shown)。これに対し、siL-1 または siL-2 を導入してライリンをノックダウン (KD) させた細胞では共に、長径が長いミトコンドリア (tubular mitochondria) が大部分であり (図 1 中段および下段)、コントロール細胞との差は明らかであった。これらのことからライリンはミトコンドリアの短い形状を維持するのに必要であると考えられた。

次に、ミトコンドリアの切断を担っているダイナミン関連タンパク質 1 (DRP1) とその活性化型 (pS616-DRP1)、およびミトコンドリアの融合を担っている mitofusin-1 と mitofusin-2 について、ライリン-KD の影響を調べた。その結果、ライリン-KD 細胞では対照細胞と比べ、DRP1 の総量は約 80%に有意に減少していること ($p < 0.05$)、pS616-DRP1 は半分程度に優位に減少していることが明らかになった ($p < 0.01$)。一方、mitofusin-1、-2 の量については、ライリン-KD によりほとんど影響を受けないことが判明した。これらの結果から、ライリンはミトコンドリアの切断に必要な活性化型 DRP1 の量の維持に必要であると考えられた。

次に、DRP1 の S616 のリン酸化を触媒することが知られているサイクリン依存性キナーゼ 1 (CDK1) とその不活性化型 (pY15-CDK1)、および CDK1 と複合体を形成する cyclin B1 のタンパク質量に対するライリン-KD の影響を調べた。その結果、ライリンを KD しても CDK1 と cyclin B1 の量に有意な変化は認められなかった。このことから、ライリンは CDK1/cyclin B1 複合体の量には影響しないと推測された。しかしながら、ライリン-KD 細胞では、不活性化型である pY15-CDK1 の量が有意に増加していた。

研究代表者はさらに、CRISPR/Cas9 システムを使って自ら樹立したライリン-ノックアウト (KO) HEK293T 細胞株を用いて同様の実験を試みた。その結果、ライリン-KO 細胞株では WT 細胞と比べて CDK1 タンパク質の総量に差は見られなかった。一方、ライリン-KO 細胞株では WT 細胞と比べて不活性化型である pY15-CDK1 の量が有意に多いことが示された。これにより、先のライリン-KD の結果と同様の結果が得られた。また、これらの結果からライリンが CDK1 の活性化に必要であるということが明らかになった。

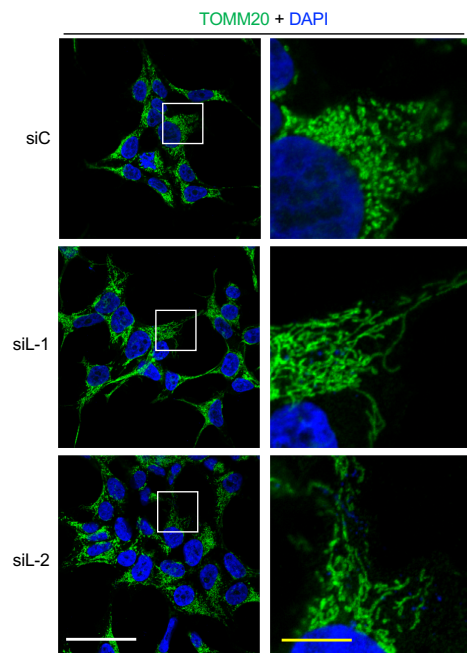


図1 ライリン発現抑制によるミトコンドリア形態への影響 (研究代表者ら論文より和訳して引用)

研究代表者はさらに、ライリン-KO 細胞株のミトコンドリアの形態観察を行った。その結果、WT 細胞では長径の短いミトコンドリアが大部分であったのに対し、ライリン-KO 細胞株では長径が長いミトコンドリアが大部分であった。これにより、ライリン-KD の結果と同様の結果がライリン-KO 細胞株でも示された。

以上の結果から、ライリンは CDK1 と DRP1 の活性化を介してミトコンドリアの切断を促進することが示された (図 2)。

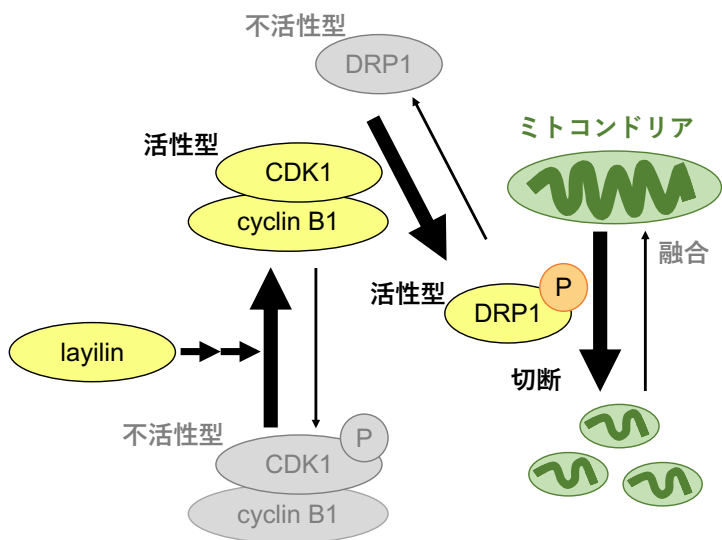


図2 ライリンはCDK1とDRP1の活性化を介してミトコンドリアの切断を促進する
(研究代表者ら論文より和訳して引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 Tsutiya Atsuhiko, Arito Mitsumi, Tagashira Takuma, Sato Masaaki, Omoteyama Kazuki, Sato Toshiyuki, Suematsu Naoya, Kurokawa Manae S., Kato Tomohiro	4. 巻 549
2. 論文標題 Layilin promotes mitochondrial fission by cyclin-dependent kinase 1 and dynamin-related protein 1 activation in HEK293T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.091	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 Ushimaru Shu, Arito Mitsumi, Tsutiya Atsuhiko, Sato Toshiyuki, Omoteyama Kazuki, Sato Masaaki, Suematsu Naoya, S. Kurokawa Manae, Kamijo-Ikemori Atsuko, Shibagaki Yugo, Kato Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of St. Marianna University	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17264/stmarieng.11.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Omoteyama Kazuki, Sato Toshiyuki, Sato Masaaki, Tsutiya Atsuhiko, Arito Mitsumi, Suematsu Naoya, Kurokawa Manae S., Kato Tomohiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of novel substrates of a disintegrin and metalloprotease 17 by specific labeling of surface proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05804 ~ e05804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaji T, Arito M, Tsutiya A, Sase T, Onodera H, Sato T, Omoteyama K, Sato M, Suematsu N, Kurokawa MS, Tanaka Y, Kato T.	4. 巻 1719
2. 論文標題 Layilin enhances the invasive ability of malignant glioma cells via SNAI1 signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 140-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.05.034.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawaguchi Takuya, Arito Mitsumi, Tsutiya Atsuhiko, Kato Tomohiro, Kitagawa Hiroaki
2. 発表標題 The effect of layilin on cancer stemness of neuroblastoma and malignant glioma.
3. 学会等名 The 53rd Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口拓哉, 有戸光美, 土屋貴大, 加藤智啓, 北川博昭
2. 発表標題 神経芽腫及び神経膠腫細胞におけるがん幹細胞性へのライリンの影響
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤利行, 佐藤政秋, 表山和樹, 土屋貴大, 有戸光美, 末松直也, 加藤智啓, 黒川真奈絵
2. 発表標題 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドプロファイルの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩野鈴佳, 土屋貴大, 大谷-金子律子
2. 発表標題 野生型仔マウスと自閉症モデル (Collapsin Response Mediator Protein4 欠損) 仔マウス間で見られた超音波発声パターンの違い
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------