

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15787

研究課題名（和文）小胞体出芽部位の局在と分泌機能との関わり

研究課題名（英文）Involvement of the localization of ER exit site in secretory function

研究代表者

馬場 崇 (Baba, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90609992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内には多様なオルガネラが存在し、さらに幾つかの膜区画には小胞体出芽部位（ERES）をはじめとするマイクロドメインが形成されている。本研究ではERESやその他オルガネラが、高乳酸環境下において局在や形態が変化することを見出した。また、当講座で行われたゲノムワイドCRISPRスクリーニングからエンドソームの局在を制御する可能性のある候補遺伝子を特定し、解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPII小胞は小胞体のタンパク質や脂質をゴルジ体へ向かって運ぶ輸送小胞である。COPII小胞はコートタンパク質の重合により形成されることが解明されている。一方で、COPII小胞形成部位すなわちERESやその他分泌経路のオルガネラは局在によって機能的な差があるかは不明である。本研究は未だ完全には解明されていないオルガネラ局在と機能の相関関係の解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Various organelles exist in cells, and microdomains, such as ER exit sites (ERES), are formed at several organelles. In this study, localization and morphology of ERES and other organelles were found to be altered under high-lactic acid conditions. The genome-wide CRISPR screening possibly screened a few candidate genes essential for such alteration of endosomes and analyzed them.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体出芽部位

※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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質は小胞体において COPII (Coat protein complex II) 小胞に包み込まれ、ゴルジ体に運ばれたのち、最終的に細胞膜に到達し細胞外に分泌される。COPII 小胞は小胞体上のマイクロドメインである小胞体出芽部位 (ERES: ER exit site) にて形成される。小胞体は細胞全体に網目状に張り巡らされているが、ERES は小さなドットが小胞体に沿って細胞全体に分布し、さらに核近傍に特に集中して観察される。

ERES ではコートタンパク質が階層的に重合されることにより COPII 小胞が形成される。最初に Sec12 により Sar1 が GDP 型から GTP 型に変換され、膜にリクルートされる。次に Sec23-Sec24 複合体、Sec13-Sec31 複合体の順に膜に結合し、最終的にカゴ型の構造をとることによって小胞は形成される¹⁾。その他にも TANGO1²⁾、p24³⁾ファミリータンパク質などのタンパク質が COPII 小胞のコートタンパク質に結合しカーゴを選別している。COPII 小胞はコアなコートタンパク質は同じであるが、その他の結合タンパク質の多様性から厳密に言えば同一ではなく、それに伴い COPII 小胞の形成部位である ERES の特性も多様である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究はゴルジ体近傍の ERES とそれ以外の ERES の機能的な差異を見出すため、ERES の局在制御機構を解明する。加えて、ERES だけでなく他のオルガネラにも着目することにより ERES の局在との関連を見出す。

3. 研究の方法

オルガネラの局在や形態は細胞外 pH と相関があることが報告されている。例を挙げると、HeLa 細胞のゴルジ体は pH6.5 の酸性条件で培養すると分散する⁴⁾。また、細胞内の pH の変化はリソソームの局在に影響を及ぼす⁵⁾。低 pH 環境は、実際に腫瘍や慢性炎症などの局所にて存在する。そのような環境は構成細胞の解糖系の過剰な亢進が引き起こされ、乳酸が多量に産生・分泌されることにより形成されと考えられている。本研究では最初に乳酸添加時の pH 低下が引き起こす様々なオルガネラの局在への影響を調べた。具体的な方法を以下に記述する。

(1) 細胞培養

細胞はマクロファージ様細胞である J774.1 細胞を理化学研究所バイオリソース研究センターより提供していただき使用した。マクロファージは腫瘍内や慢性炎症部位に存在し、さらに乳酸に感受性のある細胞である⁶⁾。細胞は RPMI-1640 培地に非動化したウシ胎児血清（終濃度 10%）、ペニシリン（終濃度 100 U/ml）とストレプトマイシン（終濃度 100 µg/ml）を加え培養した。

(2) 免疫染色

J774.1 細胞をカバーガラスに撒き 15mM 乳酸を加え一晩培養後、4%のパラホルムアルデヒドで固定した。0.2% triton X-100 にて膜透過を行い、2%ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングを行った。トランスフェリン抗体 (Abcam)、Sec31A 抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY) を適切な倍率で希釈し処理した細胞と反応させ、二次抗体は Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594 が conjugate されたものを使用した。細胞は共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM900) を用いて観察し、その画像を取得した。

加えて、乳酸反応性に関与する可能性があるエンドソーム局在タンパク質複合体のノックアウト細胞の樹立を行った。

(3) ノックアウト細胞の樹立

ノックアウト細胞は CRISPR/Cas9 システムを利用して樹立した。最初に Cas9 発現細胞は以下の方法で得た。psPAX2、pMD2.G および pKLV-EF1a-Cas9Bsd-W を Lipofectamine LTX により 293FT 細胞にランスクレクションし、翌日培地交換した。さらに 24 時間培養し、培養上清を回収した。得られた培養上清を J774.1 細胞に適量加え、感染させた。ブラストサイジンにより感染細胞を選別した。さらに限界希釈を行い Cas9 が均等に発現した細胞株を得た。gRNA の導

入は標的遺伝子の標的配列を pKLV2-U6gRNA5(BbsI)-PGKpuro2ABFP-W の BbsI サイトに通常のクローニング法により挿入したのち、上述と同様の方法で Cas9 発現細胞に導入した。ピューロマイシンを用いて gRNA 導入細胞を選別し、ノックアウト細胞とした。

4. 研究成果

(1) J774.1 細胞を乳酸に晒したときの ERES やエンドソームの局在や形態変化

15 mM の乳酸存在下にてマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を一晩培養し、ERES、ゴルジ体やエンドソームの局在または形態を観察した。J774.1 細胞は細胞生物学の研究で汎用される HeLa 細胞と比べて丸い形態をしている。ゴルジ体付近の ERES は、乳酸を添加すると Sec31 陽性 ERES のドットが大きく、また数も減少しているように観察された。プレフェルジン A による小胞体からゴルジ体への順行輸送の阻害はゴルジ体の形態変化を引き起こすこと、低 pH 環境ではゴルジ体は分散することから⁷⁾、この現象は順行輸送の阻害と関連がある可能性がある。トランスフェリン受容体は、細胞全体にドットとして分布する初期エンドソームそして核近傍に存在するリサイクリングエンドソームに局在する。J774.1 細胞では全ての細胞でリサイクリングエンドソームが明確に観察される訳でないが、乳酸を添加するとリサイクリングエンドソームは凝集し、膜区画の境界が明瞭に観察される細胞の割合が増加した。これは2つの可能性がある。一つはリサイクリングエンドソームから細胞膜への輸送が抑制され、トランスフェリン受容体が蓄積して引き起こされた可能性である。もう一つは単純に細胞のサイズが縮小し、凝集したように観察されているだけかもしれない。過剰な乳酸は細胞に対して毒性を持ち、15 mM の乳酸は細胞が死滅しない境界の濃度である。今後はこれまで見られた現象が乳酸の毒性によるものではないことを示せればと考えている。

(2) 乳酸反応性に関わるタンパク質とノックアウト細胞の試み

ERES やオルガネラの位置決定の分子機構の解明は細胞内局在と機能との相関を調べるために重要である。最近、当講座で行われたゲノムワイド CRISPR スクリーニングによりエンドソームに局在する複合体が同定された。この複合体の2つの遺伝子のノックアウト細胞株を樹立し、乳酸反応性を調べた。マクロファージは Toll 様受容体 2/4 の刺激により IL23a を転写誘導するが、乳酸はこの転写誘導を促進する⁵⁾。ノックアウト細胞は乳酸依存的な IL23a の転写誘導が抑制されていた。この複合体は小胞輸送に関与することから、今後は得られた複合体が乳酸添加時にどのように機能するかを調べ、エンドソームの位置決定に関与するかを調べていく。

[引用文献]

- 1) Miller EA, Schekman R. COPII - a flexible vesicle formation system. *Curr Opin Cell Biol.* 2013 Aug;25(4):420-7.
- 2) Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):891-902.
- 3) Strating JR, Martens GJ. The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol Cell.* 2009 Sep;101(9):495-509.
- 4) Soonthornsit J, Yamaguchi Y, Tamura D, Ishida R, Nakakoji Y, Osako S, Yamamoto A, Nakamura N. Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. *Exp Cell Res.* 2014 Nov 1;328(2):325-39.
- 5) Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, Menzies FM, O'Kane CJ, Deretic V, Rubinsztein DC. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):453-60.
- 6) Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7175-83.
- 7) Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly

of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 1988 Dec 5;263(34):18545-52.

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 1件）

1. 著者名 Maemoto Y, Maruyama T, Nemoto K, Baba T, Motohashi M, Ito A, Tagaya M, Tani K.	4. 巻 23
2. 論文標題 DDHD1, but Not DDHD2, Suppresses Neurite Outgrowth in SH-SY5Y and PC12 Cells by Regulating Protein Transport From Recycling Endosomes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	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） 10.3389/fcell.2020.00670. eCollection 2020.	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 —

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------