

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650066

研究課題名(和文)小胞体ラフト構造：アポトーシス、オートファジー、脂肪滴の形成への関与

研究課題名(英文)Raft-like structures in the ER: Implication of apoptosis, autophagy, and lipid droplet formation

研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, MITSUO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

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)：MAM (mitochondria-associated membrane) や他の小胞体サブドメインのいくつかはラフト様の構造を持つ。申請者らは小胞体ラフト様構造に存在するsyntaxin17 (Syn17) とVAPA/Bが以下の機能を持つことを明らかにした。(1) Syn17はアポトーシスを制御する。(2) 栄養飢餓に伴ってSyn17はラフト様構造から非ラフト様構造(オートファゴソーム)へ移動する。(3) Syn17はラフト局在タンパク質であるSNAP23と協調して、脂肪滴形成を制御する。(4) VAP-A/Bは小胞体とゴルジ体の境界面に存在し、トランス・ゴルジネットワークのラフト構造を制御する。

研究成果の概要(英文)：The MAM (mitochondria-associated membrane) and some of the other ER subdomains appear to have raft-like structures. In the present project we made the following findings about raft-localized proteins, syntaxin 17 (Syn17) and VAP-A/B: (1) Syn17 regulates apoptosis. (2) Upon nutrient deprivation, Syn17 redistributes from the raft-like structure (MAM) to the non-raft-like structure (autophagosomes). (3) Syn17 in cooperation with another raft-localized protein, SNAP23, regulates lipid droplet formation. (4) VAP-A/B localize to the ER-Golgi contact site and regulate the raft-like structure of the trans-Golgi network.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 ラフト syntaxin17 オートファジー 脂肪滴 VAP-A/B

### 1. 研究開始当初の背景

ラフトは細胞膜のカベオレに類似した膜構造で、スフィンゴ脂質とコレステロールに富んでいる。最近、小胞体-ミトコンドリア接触領域にもラフト様構造が存在し、スフィンゴ脂質代謝 (Chipuk et al. (2012) Cell 148, 988) や小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出 (Sano et al. (2009) Mol Cell 36, 500) を通じてアポトーシスを制御していることが報告されている。このラフトの場所に関しては種々議論があるが、おそらく MAM (mitochondria-associated membrane) と呼ばれる小胞体サブドメインあるいはその一部であると考えられる。興味深いことに、スフィンゴ脂質合成を調節する TORC2 は動物細胞では MAM に存在する (Betz et al. (2013) PNAS 110, 12526)。ラフト様構造は小胞体だけでなく、ゴルジ体、特にトランス・ゴルジネットワークにも存在することが報告されている (Waugh (2013) Nature Protoc 8, 2429)。

申請者らは、膜融合装置として知られている SNARE の一種である syntaxin17 (Syn17) が MAM のラフト様構造に局在することを見出した。ラフトに存在する Syn17 は、膜融合活性とは無関係にミトコンドリアの分裂を制御しており、この知見は、小胞体膜がミトコンドリアの分裂する位置を決定しているという発見 (Friedman et al. (2011) Science 334, 358) に、分子的裏付けをもたらすものである。Syn17 は最近、オートファジーに関与することが示されたタンパク質である。申請者らはさらに、Syn17 の発現抑制によって脂肪滴が減少することを見出ししている。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリアと接する小胞体領域 MAM にはラフト様構造が存在し、アポトーシス誘導等に関与すると考えられているが、その性質や機能はよくわかっていない。申請者らは、ヘアピン型膜結合領域を有する SNARE タンパク質 Syn17 がラフトに存在し、膜融合とは異なる機能でミトコンドリアの分裂を調節していることを見出した。本研究では、Syn17 とその結合タンパク質を中心とし、小胞体内ラフト様構造の構築と動的性質を調べ、脂肪滴形成やオルガネラ間のコミュニケーションを仲介するラフトの役割を解明する。また、小胞体-ゴルジ体の接触についても調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗体、プラスミド、試薬

Syn17 の膜結合ドメイン以降を欠失させた断片の N 末端側に GST タグを付加するプラスミドを構築し、タンパク質を大腸菌で発現・精製して抗原とした。ウサギに免疫した後、MBP タグを付加した Syn17 (膜結合ドメイン以降を欠失) を用いて抗体をアフィニティ精製した。他の抗体は市販品を用いた。動物細胞発現プラスミドは、GFP、FLAG、Myc タグが付くもの

を用いた。ジギトニンは Wako 社から購入し、 $30 \mu\text{g/ml}$ 、5 分間室温で細胞を処理した。

#### (2) 細胞培養

培養細胞は主に HeLa 細胞を用いたが、結合実験には 293T 細胞、分化実験では NIH3T3-L1 細胞を用いた。RNAi は合成オリゴ RNA を用いて行った。複数のオリゴ RNA を用いるか、あるいはオリゴ RNA 耐性の cDNA を発現させて、発現抑制の効果が特異的であることを検証した。

#### (3) 顕微鏡による解析

蛍光顕微鏡解析にはオリンパス fluoview 300 あるいは 1000 を用いた。

#### (4) 定量

蛍光画像の定量は ImageJ (NIH) を利用した。実験結果で得られた数値を平均し、平均値  $\pm$  SD または  $\pm$  SEM で表示した。

### 4. 研究成果

#### (1) アポトーシスにおける Syn17 の役割

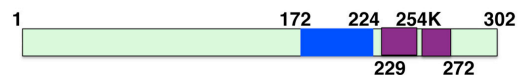
2014 年度にスタウロsporin を用いたアポトーシス誘導実験を行ったが、2015 年に条件を詳細に検討して再度実験を行ったところ、スタウロsporin によって引き起こされるアポトーシスが Syn17 発現抑制細胞においては抑制されていることが判明した。一方、TRAIL によるアポトーシスは Syn17 の発現抑制では抑制されなかった。Fas 刺激については現在再現性を取っている。

#### (2) 栄養飢餓に伴う Syn17 の局在変化

Syn17 を含む構造はミトコンドリア (Tom20) と共局在しているが、低濃度 ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) ジギトニンによってコレステロールを除去するとミトコンドリアから解離する。一方、栄養飢餓を誘導してオートファゴソームへ移動した Syn17 はジギトニン処理によって膜から遊離しない。これは、Syn17 が栄養条件に従って、ラフト様構造から非ラフト様構造へ移行することを示唆する。

#### (3) 脂肪滴形成における Syn17 の役割

Syn17 は膜融合を司る SNARE ドメインの後に、中央部分が Lys によって分断された 44 アミノ酸の疎水性膜ドメイン (HMD) を持つ (下図：青が SNARE ドメイン、紫色は HMD)。Syn17 の発現抑制によってトリアシルグリ



セロール量および脂肪滴は減少するが、その効果を回復させるためには、Syn17 の SNARE ドメインおよびそれ以降の C 末端領域が必要であることが分かった。それゆえ、Syn17 は膜融合とそれ以外の機能の両方で脂肪滴形成を促していると考えられる。

ラフト局在タンパク質である SNAP23 は Syn5 と結合して脂肪滴形成に関与することが報告されていたが、このタンパク質は Syn17 とも結合する。NIH3T3 細胞を脂肪細胞に分化させると、Syn17 の発現が上昇するが、この時 SNAP23 の発現も上昇した。

ACSL3 (Acyl-CoA synthetase 3) はトリア

シルグリセロールの原料となるアシル CoA を産生する酵素で、HeLa 細胞においては、通常、小胞体に存在するが、脂肪滴を形成させる条件（オレイン酸の添加）では脂肪滴へ移動する。Syn17 の発現を抑制すると、ACSL3 の脂肪滴へ局在化は阻害された。結合実験から、ACSL3 は Syn17 の SNARE ドメインと結合していることが判明した。また、この結合は、SNAP23 と競合的であった。一方、ACSL3 は Gate ドメインと呼ばれる脂肪滴局在（そして酵素活性）に必要なドメインを介して Syn17 と結合していた。これらの結果から、ACSL3 が脂肪滴へ局在化するためにはラフトが重要な役割をしている可能性が示唆された。

（4）小胞体-トランス・ゴルジネットワークの接触

VAP-A/B は小胞体ラフトに存在するタンパク質であり、細胞膜やゴルジ体（トランス・ゴルジネットワーク）へのコレステロールやセラミドの輸送に関与する。また、ミトコンドリアとの接触にも関わる。VAP-A/B の発現を抑制するとトランス・ゴルジネットワークから細胞膜へ輸送される小胞（CARTS 小胞）の形成が抑制されることを見出した。VAPA/B はホスホイノシチド 4-ホスファターゼである Sac1、オキシステロール結合タンパク質である OSBP と複合体を形成し、小胞体-ゴルジ体の接触領域に存在している。詳細な解析の結果、VAP-A/B の発現抑制によってコレステロールやセラミドが輸送されなくなった結果、トランス・ゴルジネットワークのラフト様構造が崩壊し、そのために輸送小胞形成が抑制されることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- ① Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N., Murate, M., Kobayashi, T., Arasaki, K., Inoue, H., and Tagaya, M. CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell* **26**, 4686-4699 (2015). 査読有
- ② 多賀谷光男、若菜裕一、川端美緒、MAM の新たな機能と関連疾患、細胞工学 **33** (4) 学研メディカル秀潤社、436-442 (2014) . 査読無

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 新崎恒平、木村葉那、大崎雄樹、多賀谷光男、脂肪滴形成における MAM の役割～Stx17 の機能を中心として～、第 121 回日本解剖学会総会、2016/3、福島（招待講演）
- ② 木村葉那、新崎恒平、大崎雄樹、多賀谷

光男、Stx17 は ACSL3 を制御することで脂肪滴形成に関与する、第 121 回日本解剖学会総会、2016/3、福島

- ③ Yuichi Wakana、Richika Kotake、Nanako Oyama、Mitsuo Tagaya、Roles of endoplasmic reticulum-Golgi contacts in transport carrier biogenesis from the trans-Golgi network、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015/6-7、東京（招待講演）
- ④ 木村葉那、新崎恒平、多賀谷光男、脂肪滴の生合成形における syntaxin 17 の関与、第 38 回日本分子生物学会年会-第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015/12、神戸
- ⑤ 吉田爽、若菜裕一、大山南菜子、多賀谷光男、ゴルジ体の機能調節における小胞体-ゴルジ体接触の役割、第 38 回日本分子生物学会年会-第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015/12、神戸
- ⑥ 若菜裕一、小竹莉愛、大山南菜子、多賀谷光男、VAP が仲介する小胞体-トランスゴルジ網 (TGN) 接触部位における脂質輸送は、TGN からの輸送小胞形成に必要である、第 87 回日本生化学会大会、2014/10、京都
- ⑦ 大山南菜子、若菜裕一、小竹莉愛、多賀谷光男、脂質ホスファターゼ Sac1 は VAP と相互作用し、トランスゴルジ網に近接した小胞体サブドメインに共局在する、第 87 回日本生化学会大会、2014/10、京都
- ⑧ 木村葉那、新崎恒平、茂刈寛史、谷佳津子、多賀谷光男、脂肪滴形成および 3T3-L1 の脂肪細胞への分化における syntaxin 17 の関与、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014/6、奈良

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pathos.ls.toyaku.ac.jp/> 分子細胞  
生物学-1/

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, Mitsuo)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：30179569

### (2) 研究分担者

谷 佳津子 (TANI, Katsuko)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：40266896

### (3) 連携研究者

若菜 裕一 (WAKANA, Yuichi)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：90635187