

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05065

研究課題名(和文)小胞体 細胞膜接着部位の脂質輸送機能の解明

研究課題名(英文) Understanding the role of the endoplasmic reticulum - plasma membrane contact sites in lipid transport

研究代表者

佐伯 恭範 (Saheki, Yasunori)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員准教授

研究者番号：30794458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：膜脂質の大部分は、小胞体によって生合成され、細胞内小器官および細胞膜へと輸送されている。しかし、その輸送メカニズムに関しては不明な点が多い。小胞体は全ての細胞内小器官および細胞膜と膜接着部位を形成していることが知られている。本研究においては、小胞体-細胞膜接着部位における脂質輸送機能に注目し、進化学的に保存された脂質輸送タンパク質であるextendedシナプトタグミンおよびGRAMD1タンパク質の機能解明を試みた。我々の研究結果から、これらの分子がいかんして、膜脂質を輸送し、細胞内の脂質恒常性に寄与するかが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の体は無数の細胞から形成されている。各々の細胞は、脂質を主成分とする細胞膜で包まれているが、いかんして細胞膜の脂質組成が保たれているかはよくわかっていない。本研究を通して、細胞内での脂質輸送の分子機構がより一層明らかになり、細胞膜脂質の維持機構に関して知見を深めることができた。細胞内での脂質分布の異常は、様々な病態を引き起こすことが知られている。特に、神経細胞における生体膜の脂質組成の破綻は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の要因となることが示唆されている。それゆえ、本研究は、将来的にこれら疾患の更なる病態解明および新規治療法の発見につながると思われる。

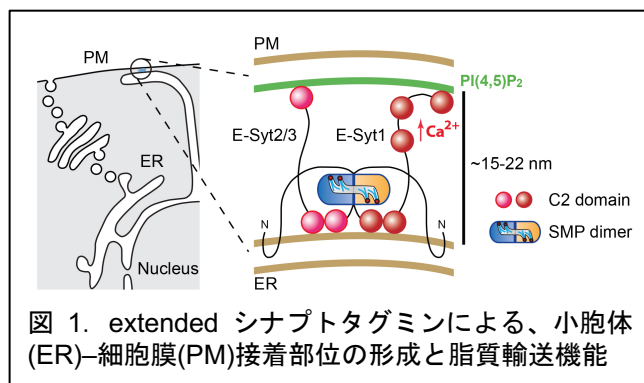
研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER), where the majority of membrane lipids are synthesized, extends throughout the cell and forms physical contacts with virtually all other cellular organelles, including the plasma membrane. Growing evidence suggests that lipid transfer proteins (LTPs) act at membrane contact sites and transport specific lipids from one membrane to another independent of membrane traffic. However, the molecular mechanisms that regulate the functions of LTPs are still largely elusive. In this study, we investigate how the functions of LTPs are regulated, focusing on ER-plasma membrane contact sites. Defects in cellular lipid homeostasis are linked to numerous human disorders, including neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Thus, our research not only provides insight into fundamental cell biology but also paves a way toward developing a novel therapeutic approach against neurodegeneration.

研究分野：細胞生物学、神経生物学

キーワード：脂質 膜接着部位 小胞体 細胞膜 extendedシナプトタグミン GRAMD1タンパク質

1. 研究開始当初の背景

我々は、先行研究として、2013年に extended シナプトタグミン (E-Syt 1/E-Syt 2/E-Syt 3) が小胞体-細胞膜接着に関わる進化的に保存された因子であることを同定した[1]。extended シナプトタグミンは、ホモ複合体およびヘテロ複合体を形成し、N 末の疎水性部分を介して小胞体に局在し、C 末の C2 ドメインを介して細胞膜のホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸および細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性に小胞体と細胞膜とを接着する (図 1)。また、extended シナプトタグミンは、SMP ドメインを有し、tubular lipid binding protein (TULIP) スーパーファミリーに属することから、SMP ドメインを介して脂質輸送に関わることが示唆された。その後の研究において、我々は、extended シナプトタグミンの SMP ドメインの結晶構造を解き明かすことに成功し[2]、*in vitro* 再構築系と CRISPR/Cas 9 を用いたゲノム編集法により作成した E-Syt 1/2/3 トリプルノックアウト HeLa 細胞を用いて、extended シナプトタグミンが、小胞体-細胞膜接着部位において、SMP ドメインを介し、 Ca^{2+} 依存性にグリセロリン脂質を輸送することを同定した[3]。



研究開始当時、extended シナプトタグミンの細胞内機能に関しては、不明な点が多く、特に extended シナプトタグミンのグリセロリン脂質輸送制御機構は未解明であった。また、膜接着部位には、多くの脂質輸送タンパク質が局在しており、いかにしてこれらのタンパク質が協調して脂質輸送を調整しているかは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究においては、extended シナプトタグミンの細胞内機能およびグリセロリン脂質輸送制御機構をさらに追求し、extended シナプトタグミンが、いかにして小胞体-細胞膜接着部位にて脂質輸送のダイナミクスを調整しているかを探求することを目指した。また同時に、これまであまりよく分かっていない、細胞内コレステロール輸送機構に注目し、小胞体-細胞膜接着部位における、GRAMD 1 タンパク質 (GRAMD 1 a/ GRAMD 1 b/ GRAMD 1 c) の細胞内コレステロール輸送への役割を調べた。

3. 研究の方法

本研究においては、ゲノム編集法、生化学的手法、ならびに、高解像度顕微鏡 (スピニングディスクおよび全反射顕微鏡) を多用し、膜接着部位における脂質輸送タンパク質の機能解析を行った。研究は、次のように進めた。

- ① *in vitro* の再構築系を用いて、extended シナプトタグミンが、いかにしてグリセロリン脂質輸送を制御しているかを調べた。また、E-Syt 1/2/3 トリプルノックアウト HeLa 細胞を用いて、extended シナプトタグミンの細胞内における生理機能を調べた。
- ② GRAMD 1 タンパク質の細胞内局在を調べ、ゲノム編集法を用いて GRAMD 1 タンパク質 (GRAMD 1 a/ GRAMD 1 b/ GRAMD 1 c) を全て欠損させた GRAMD 1 a/ 1 b/ 1 c トリプルノックアウト HeLa 細胞を作成し、その解析を行った。また、*in vitro* の再構築系を用いて、GRAMD 1 タンパク質のコレステロール輸送能を調べた。

4. 研究成果

extended シナプトタグミンのグリセロリン脂質輸送機構とその生理的役割の解明:

extended シナプトタグミンの脂質輸送能の Ca^{2+} 依存性機構の解明を目標とし、主に *in vitro* の再構築系と培養細胞系を用いて、研究を推進させた。

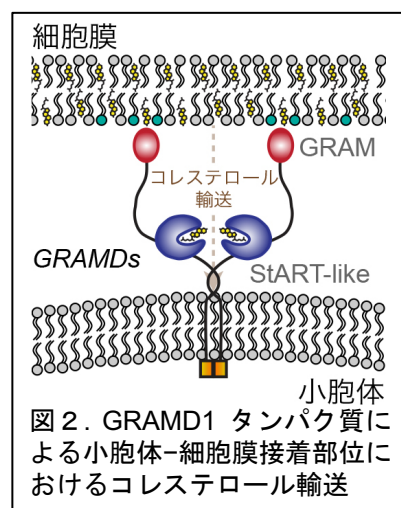
extended シナプトタグミン 1 (E-Syt 1) は 5 つの C2 ドメイン (C2 A/C2 B/C2 C/C2

D/C 2E) を有している。先行研究の結果から、extended シナプトタグミン 1 (E-Syt1) が、 Ca^{2+} 結合能力のある C 2 ドメイン (C 2A/C 2C) を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性に、小胞体-細胞膜接着部位においてグリセロリン脂質を輸送することがわかっていた[3]。そこで我々は、extended シナプトタグミン 1 の C 2A ドメインおよび C 2C ドメインの役割を、種々の extended シナプトタグミン 1 変異体を用いて解析した。その結果、C 2A ドメインが、定常状態において extended シナプトタグミン 1 の SMP ドメインの脂質輸送能力を自己抑制していることが分かった。さらに、*in vitro* の再構築系と培養細胞系を用いて、C 2A ドメインに Ca^{2+} が結合することで、C 2A ドメインによる SMP ドメインの自己抑制が解放されることを明らかにした。また、C 2C ドメインがいかんして、extended シナプトタグミン 1 による小胞体-細胞膜接着を調整するかも明らかにすることが出来た。

さらに、E-Syt 1/2/3 トリプルノックアウト HeLa 細胞を用いて、 Ca^{2+} 依存性のホスファチジルセリンの細胞外膜への露出に extended シナプトタグミン 1 が必要であることを示した。この系を用いて、extended シナプトタグミン 1 の活性には、C 2A ドメインおよび C 2C ドメインが必要であることを細胞内においても示すことが出来た。これらの研究は、Yale 大学の De Camilli 研究室との共同研究として行い、研究成果を The EMBO Journal に発表した[4]。

GRAMD1 タンパク質のコレステロール輸送機能の解明：

ステロールは、真核生物における必須脂質のひとつである。動物細胞においては、コレステロールが膜脂質のおよそ 20% を占めており、膜の機能維持や、細胞の生理機能に対して重要な役割を担っている。コレステロールは、細胞外から取り込まれるか、小胞体において生合成されているが、細胞内においては、じつにその 60% から 80% が細胞膜に蓄積されており、細胞膜脂質のおよそ半分を占めている。それゆえ、細胞は、細胞膜のコレステロール量を検知し、細胞内コレステロールの恒常性を維持する必要がある。以前の研究から、細胞膜のコレステロール量が一定を超えると、一部のコレステロールが、細胞膜から小胞体へと輸送され、小胞体でのコレステロールの生合成を停止させることが知られていた。しかしながら、その輸送制御の分子機構は不明であった。我々は、酵母からヒトへと進化学的に保存された小胞体局在型の脂質輸送タンパク質である GRAMD 1 (GRAMD 1a/ GRAMD 1b/ GRAMD 1c) が、細胞膜のコレステロールのアクセシビリティを検知し、細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送を調節することにより、細胞内コレステロールの恒常性の維持に関与することを同定した(図 2)。生化学的手法と細胞生物学的手法を組み合わせることにより、GRAMD 1 が、ホモ複合体およびヘテロ複合体を形成し GRAM ドメインを介して細胞膜コレステロールのアクセシビリティの上昇を検知し、小胞体-細胞膜接着部位に集積し、StART-like ドメインを介して、アクセス可能なコレステロールを細胞膜から小胞体へと輸送することを見出した。全ての GRAMD 1 (GRAMD 1a/ GRAMD 1b/ GRAMD 1c) を欠損させた HeLa 細胞においては、細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送の障害により、アクセス可能なコレステロールが細胞膜に異常に蓄積した。これらの結果から、GRAMD 1 が、アクセス可能なコレステロールの非小胞性輸送を、小胞体-細胞膜接着部位において調節し、細胞膜への過度なコレステロールの蓄積を阻止していることが明らかとなった。これらの研究は、熊本大学の分子生理学教室(富澤一仁教授主宰)、ならびに、シンガポール国立大学の Wenk 研究室との共同研究として行い、研究成果を eLife に発表した[5]。



<引用文献>

[1] Giordano F*, Saheki Y*, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I,

Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P (2013) PI(4,5)P₂-dependent and Ca²⁺-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* 153: 1494-509.

[2] Schauder CM, Wu X*, Saheki Y*, Narayanaswamy P, Torta F, Wenk MR, De Camilli P, Reinisch KM (2014) Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. *Nature* 510: 552-5. *Equal contribution.

[3] Saheki Y, Bian X*, Schauder CM*, Sawaki Y, Surma MA, Klose C, Pincet F, Reinisch KM, De Camilli P (2016) Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nature cell biology* 18: 504-15. *Equal contribution.

[4] Bian X, Saheki Y**, De Camilli P** (2018) Ca²⁺ releases E-Syt1 autoinhibition to couple ER-plasma membrane tethering with lipid transport. *The EMBO journal* 37: 219-234. **Corresponding author.

[5] Naito T, Ercan B, Krshnan L, Triebel A, Koh DHZ, Wei FY, Tomizawa K, Torta FT, Wenk MR, Saheki Y** (2019) Movement of accessible plasma membrane cholesterol by the GRAMD1 lipid transfer protein complex. *eLife* 8. **Corresponding author.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naito Tomoki, Ercan Bilge, Krshnan Logesvaran, Triebel Alexander, Koh Dylan Hong Zheng, Wei Fan-Yan, Tomizawa Kazuhito, Torta Federico Tesio, Wenk Markus R, Saheki Yasunori	4. 巻 8
2. 論文標題 Movement of accessible plasma membrane cholesterol by the GRAMD1 lipid transfer protein complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e51401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.51401	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 該当する
1. 著者名 Levine Tim P., Perez Franck, Saheki Yasunori, von Blume Julia	4. 巻 2
2. 論文標題 Meeting Report From the 2019 "Organelle Zone" Symposium in Osaka, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 N.A.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515256419877091	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 該当する
1. 著者名 Jeyasimman Darshini, Saheki Yasunori	4. 巻 19
2. 論文標題 SMP domain proteins in membrane lipid dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.04.007	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 Bian Xin, Saheki Yasunori, De Camilli Pietro	4. 巻 37
2. 論文標題 Ca ²⁺ releases E Syt1 autoinhibition to couple ER plasma membrane tethering with lipid transport	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 219 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201797359	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 該当する

1. 著者名 Saheki Yasunori	4. 巻 997
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum - Plasma Membrane Crosstalk Mediated by the Extended Synaptotagmins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organelle Contact Sites. Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-4567-7_6	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 Saheki Yasunori, De Camilli Pietro	4. 巻 1864
2. 論文標題 The Extended-Synaptotagmins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta.	6. 最初と最後の頁 1490 ~ 1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2017.03.013	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 該当する

1. 著者名 Saheki Yasunori, De Camilli Pietro	4. 巻 86
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum - Plasma Membrane Contact Sites	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annual Review of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 659 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-biochem-061516-044932	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 The regulation of plasma membrane cholesterol states via GRAMD1 lipid transfer protein complex
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Functional dissection of membrane contact sites in intracellular lipid transport
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Cross-talk between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane mediated by the extended synaptotagmins
3. 学会等名 NEURO2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Functional dissection of membrane contact sites in intracellular lipid transport
3. 学会等名 Organelle zones: opening a new era of Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Understanding dynamic membrane contact sites in health and disease
3. 学会等名 EMBO Young Investigator Meeting 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Functional dissection of membrane contact sites in intracellular lipid transport
3. 学会等名 New Frontiers in Synapse Biology and Brain Disorders (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Cross-talk between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane mediated by the extended synaptotagmins
3. 学会等名 15th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunori Saheki
2. 発表標題 Functional dissection of intracellular lipid transport via mammalian cell biology and C. elegans genetics
3. 学会等名 The 6th National Conference on Laboratory Animal Science (NCLAS) [organized by Laboratory Animal Science Association of Malaysia (LASAM)] (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saheki Yasunori
2. 発表標題 Cross-talk between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane mediated by the extended synaptotagmins
3. 学会等名 The 6th International and the 15th National Symposium on Membrane Biology (ISMB2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saheki Yasunori
2. 発表標題 Cross-talk between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane mediated by the extended synaptotagmins
3. 学会等名 ISLS7: 7th International Singapore Lipid Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saheki Yasunori
2. 発表標題 The regulation of intracellular lipid transport at membrane contact sites
3. 学会等名 第15回生命資源研究・支援センター シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saheki Yasunori
2. 発表標題 Cross-talk between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane mediated by the extended synaptotagmins
3. 学会等名 Korean Society for Brain and Neural Science (KSBNS) Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐伯研究室ウェブサイト https://www.thesaheki lab.com 南洋理工大学医学部ウェブサイト http://www.lkcm edicine.ntu.edu.sg/aboutus/Faculty-and-Staff/Pages/Yasunori-Saheki.aspx
--

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
研究協力者	富澤 一仁 (Tomizawa Kazuhito)		
研究協力者	魏 范研 (Wei Fan-Yan)		
研究協力者	荒木 喜美 (Araki Kimi)		