

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06559

研究課題名(和文) 輸送小胞が認識されるための最小必要因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the minimal requirements for the recognition of transport vesicles

研究代表者

小池 誠一 (Koike, Seiichi)

富山大学・学術研究部工学系・特命助教

研究者番号：10431686

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)：これまで、輸送小胞に見立てたリポソームを細胞内へ導入することで、輸送小胞が標的オルガネラへターゲティングされるための「宛先」情報の十分条件を調べてきた。その結果、SNAREタンパク質が宛先情報として中心的役割を担っていることが分かった。本研究では、このターゲティングの特異性決定に、Rab GTPaseとホスホイノシチドがどのように関与しているのかについて調べ、SNAREタンパク質によるターゲティングの精度を高める働きを持つことを明らかにすることができた。また、標的オルガネラが、輸送小胞上に存在する宛先情報を解読する分子メカニズムを明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内には無数のオルガネラが隙間なく配置されており、その合間をかい潜るように輸送小胞が行き来することで、オルガネラ間での情報や物質のやり取りが行なわれている。ただ、その行き先がどのように正しく決められているのかはよく分かっていなかった。本研究では、そのための十分条件とその分子メカニズムを明らかにすることに成功した。これは、細胞内小胞輸送の理解について大きな進歩であるとともに、十分条件を明らかにできたことは、今後人為的に細胞内輸送を制御・改変できる可能性を秘めている。今後この知見を用いることで、特定のオルガネラにのみ薬剤を届ける新規技術の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：So far, we have elucidated the sufficient conditions for the "Zip-codes" information that targets transport vesicles to be targeted to specific organelles within living cells by introducing (proteo)liposomes resembling transport vesicles made in vitro. As a result, we have revealed that SNARE proteins play a central role in this process. In this study, we were able to elucidate how Rab GTPases and phosphoinositides (other Zip-code molecules) are involved in enhancing the specificity of targeting. Additionally, we successfully revealed the molecular mechanism by which target organelles receive the Zip-code information present on transport vesicles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SNAREタンパク質 Rab GTPase ホスホイノシチド VPS13B エンドソーム 輸送小胞 膜融合 テザリング因子

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。

1. 研究開始当初の背景

細胞内には無数のオルガネラが隙間なく配置されている。そして、オルガネラ間では情報や物質のやり取りが盛んに行われている。その主な役割を担うのが「輸送小胞」である。あるオルガネラで積荷を詰め込んだ輸送小胞は、無数にあるオルガネラの中から正しい標的まで運ばれた後、融合し積荷を引き渡す。これまでの研究から、小胞輸送に関わる多くの因子が同定されるとともに、申請者や他のグループの研究から、それぞれの輸送小胞には「宛先」情報がコードされており、それに従って正しい標的へと運ばれていくことが分かっている。しかし、複雑な輸送小胞輸制御システムのなかで、輸送の特異性を決めるための必要十分な宛先情報の分子実態は明らかになっていなかった。そこで、申請者は、これまでにこの最小因子を同定することを目指し研究を行ってきた。そのために、輸送小胞に見立てて既知の分子のみで再構成されたリポソームを、マイクロインジェクションを用いて生細胞内へ導入し、それらのオルガネラへのターゲティングを調べるという新規の合成生物学的手法を用いてきた。この方法を用いることでこれまでの手法では不可能であった十分条件を明らかにできる。そして、リポソームに再構成した「SNARE タンパク質」が、宛先情報として十分であることを明らかにした (Koike and Jahn, 2017)。しかし、SNARE タンパク質による宛先情報がどのように受け取る側の標的膜によって認識されるのか、その分子実体は分かっていた。

2. 研究の目的

本研究では、輸送小胞上に存在する宛先情報 (SNARE タンパク質) が、標的膜上に存在する何らかのタンパク質によって識別・捕獲されることが特異的輸送の分子メカニズムなのではないかと考え、初期もしくは後期末期エンドソームへ運ばれるための宛先情報を持ったリポソームを認識する因子を同定することを目指した。具体的には、まず初期エンドソームと後期末期エンドソームへの輸送の宛先情報として見つけてきた STX6/STX13 と STX8 と結合するタンパク質を網羅的にスクリーニングする。次に、そこから得られた候補タンパク質のノックダウン細胞へリポソームを導入したり、それら候補タンパク質をミトコンドリアに異所的に局在させた時のリポソームのターゲティング先の変化を調べることで、SNARE タンパク質を認識し、小胞輸送の特異性を決定するための標的側因子を同定する。更に、そのタンパク質のノックダウン細胞における小胞輸送の異常や、そこから引き起こされる細胞レベルでの異常について調べることにより、小胞の特異的輸送が、細胞増殖、細胞移動などの振る舞いに、どのような影響を与えるのかを明らかにすることによって、小胞輸送の特異性決定が細胞機能に与える役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

タンパク質の精製

SNARE タンパク質 (Syntaxin 13, Syntaxin 6, Syntaxin 8) をコードする cDNA 配列を pET28 ベクター (Merck Millipore) にクローニングした。これらの DNA を *E. coli* 株 BL21 に発現させ、Ni-NTA カラム (Qiagen) とイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

リポソーム作成

クロロホルム:メタノール(2:1)有機溶媒中に、リン脂質を以下の割合で混合した:PC(L-リン脂質コリン)が79.7%、PS(L-リン脂質セリン)が20%、Rhodamine-PEが0.3%

(モル比)。溶媒を蒸発させた後、ジエチルエーテルに再溶解し、1 mM DTT を含む HB150 緩衝液 (150 mM KCl、20 mM Hepes (pH 7.5)) を添加した。超音波分散後、ジエチルエーテルを蒸発させた。合成されたリポソームは、100 nm のポリカーボネート膜 (Avanti Polar Lipids) を押し通すことで、サイズを均一にした。タンパク質のリポソームへの再構成は、n-オクチル-β-D-グルコシド (OG) を用いて行った。OG に溶解したタンパク質とリポソームを混合した後、SM-2 バイオビーズ (BioRad) を含む HB150 緩衝液で 4 °C で一晩透析することで、OG を除去した。

リポソームのマイクロインジェクション

最終濃度 2 mM (プロテオ) リポソームと 10 μg/ml の DAPI を HB150 で希釈し、Femtotips (Eppendorf) に注入した。1 × 10⁴ 個の HeLa 細胞をポリ-L-リジン (Sigma-Aldrich) でコーティングした 12 mm カバーガラス (Marienfeld GmbH) 上に播種し、その後カバーガラスを培地 (F12 培地に 10% FCS、10 mM HEPES (pH 7.5)、ペニシリンとストレプトマイシン) で満たされた 35-mm のペトリ皿 (Becton Dickinson) に移し替えた。そしてマイクロインジェクションを、Leica DMIL 倒立顕微鏡の下で Injectman マイクロマニピュレータ (Eppendorf) を使用して行なった。マイクロインジェクション後、細胞は 37 °C で 5 分間インキュベーションし、その後 4% のパラホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich) 液に移し替え 10 分間固定した。特定のオルガネラに対する抗体を用いた免疫細胞化学染色を行うことで、導入されたリポソームのターゲット先を調べた。

ノックダウン細胞の作成

Vps13B のノックダウン細胞株を作成するために、5 つの異なるターゲット shRNA を含むベクター (GE Dharmacon) を使用した。トランスフェクション後、1 μg/ml のピューマイシンを用いて安定発現細胞株をクローニングした。そのためのスクリーニングはウェスタンブロッティングによる Vps13B 発現量のチェックによって行った。

4. 研究成果

初期エンドソームへのターゲッティングに関わる因子の同定

STX6/STX13 と結合するタンパク質のスクリーニングの結果、機能未知の「Vps13B」が得られた。酵母 Vps13 遺伝子の変異体で小胞輸送に異常が見られる (Park et al., 2015)

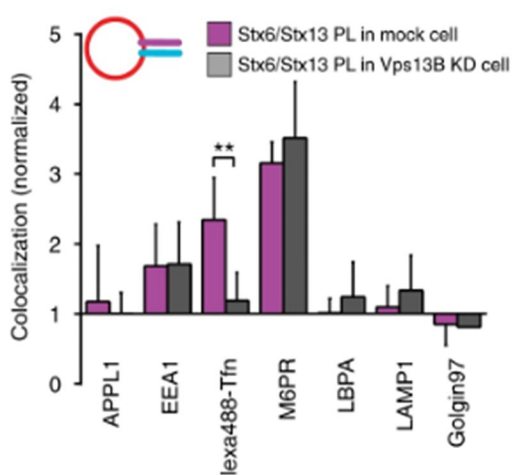


図 1. Vps13B ノックダウン細胞への Syntaxin6/Syntaxin13 リポソームの細胞内オルガネラとの共局在

こと、Vps13 の立体構造がテザリング因子「HOPS 複合体」と類似している (Rzepnikowska et al., 2017) ことから、Vps13B が新規テザリング因子として機能している可能性が示唆された。そこで、Vps13B に注目して解析したところ、免疫沈降実験から Vps13B が実際に STX6/STX13 と結合すること、更に Vps13B が初期エンドソームに局在することを明らかにした。

そこで、Vps13B が実際に STX6/STX13 リポソームの初期エンドソームへのターゲッティングに関与しているかどうかを明らかにするために、Vps13B ノックダウン細胞株を作成

し、その細胞に STX6/STX13 リポソームを導入し、それらのターゲッティングを調べた。

コントロール細胞では、STX6/STX13 リポソームは上記した通り、初期エンドソームへと運ばれたのに対し、ノックダウン細胞では初期エンドソームとの共局在の割合が有意に低下した(図1)。次に Vps13B があればこのリポソームのターゲティングに十分であるかどうかを確かめるために、ミトコンドリア局在化シグナルを付加した Vps13B を HeLa 細胞に発現させた。その異所性に Vps13B を局在させた細胞に STX6/STX13 リポソームを導入すると、それらはミトコンドリア表面に蓄積した。これらの結果から、Vps13B は、STX6/STX13 リポソームの初期エンドソームへの特異的なターゲティングに必要十分であることが明らかになった。

Vps13B の細胞内生理機能を明らかにするために、上記で作成した Vps13B ノックダウン細胞株での小胞輸送に異常が見られないかを調べた。まずオルガネラの局在に変化が見られないか、オルガネラマーカータンパク質の局在を免疫染色によって調べたが、大きな変化は見られなかった。次にノックダウン細胞のエンドソームでの物質輸送機能変化を調べるために、蛍光標識されたトランスフェリンを細胞内に取り込ませて細胞内輸送を可視化した。Vps13B ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べてトランスフェリンの輸送が遅延していた(図2)。更にトランスフェリンレセプター

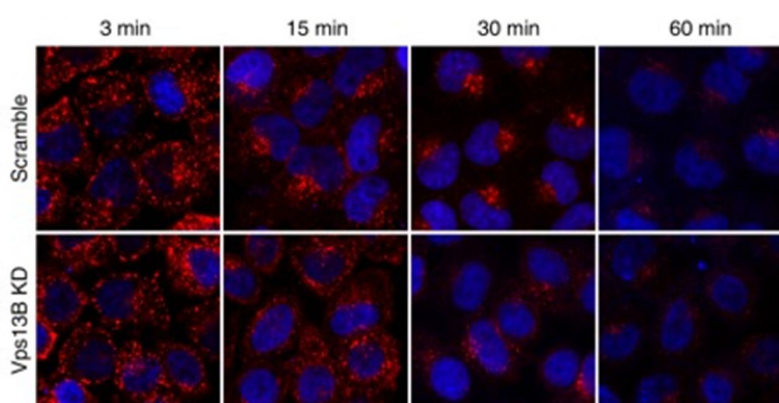


図2.Vps13B ノックダウン細胞でのトランスフェリン輸送の異常

化を調べるために、蛍光標識されたトランスフェリンを細胞内に取り込ませて細胞内輸送を可視化した。Vps13B ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べてトランスフェリンの輸送が遅延していた(図2)。更にトランスフェリンレセ

プターの細胞内局在を調べたところ、Rab11 陽性エンドソームでの局在が減少し、その代わりに Rab 4 陽性エンドソームでの局在が増加していることが分かった。この結果から、Vps13B はエンドソームの物質輸送を制御していることを明らかにすることができた。これらの成果は Nature communications に論文として発表した (Koike and Jahn, 2019)。

後期エンドソームへのターゲティングに関わる因子の同定

後期エンドソームへの宛先情報として働く STX8 と特異的に結合するタンパク質の同定を質量分析によって目指した。得られたいくつかの候補タンパク質については、実際に STX8 と結合することが分かったため、それらについてノックダウン細胞を作成し、STX8 リポソームを導入した。しかし、リポソームのターゲティングに変化がみられなかったノックダウン細胞は見出せなかった。

SNARE 依存的ターゲティングを制御する因子の同定

上記したように、SNARE タンパク質が膜上に存在するとリポソームが特異的オルガネラへターゲットされるようになること、また再構成する SNARE タンパク質の種類によってその行き先が変化することを見出した。そこで次に、初期エンドソームへの宛先となる STX6/STX13 と後期エンドソームへの宛先となる STX 8 の両方を同じリポソームに再構成した場合、リポソームがどこへ運ばれるのかを調べた。STX6/STX13/STX 8 リポソームを細胞内に導入した時、初期エンドソームと後期エンドソームの両方へターゲットされることが分かった。この結果は、小胞に存在する SNARE タンパク質の種類が増えれば増えるほど、宛先が増えて運ばれていく標的が増えることを意味している。しかし、実

際の細胞内の輸送小胞には何種類もの SNARE タンパク質が局在しているにも関わらず、非常に高いターゲティングの特異性を示す。では、どうして細胞内の輸送小胞は決められた標的のみに運ばれるのだろうか？申請者は SNARE タンパク質以外の分子も特異性決定に関わっているのではないかと考えた。そこで、これまで小胞輸送プロセスにおいて中心的な役割を担っていることが知られている Rab GTPase とホスホイノシチドに着目した。両分子ともに、オルガネラごとに異なった種類のものが存在しており、オルガネラのアイデンティティー決定にも深く関わっていることが知られている (Behnia and Munro, 2005)。そこで初期エンドソームに特異的に局在している Rab GTPase である Rab5 と、ホスホイノシチドである PI(3)P をリポソームに再構成し、細胞内へと導入した。これらの分子のみでは特異的なターゲティングが観察できなかったことから、次に SNARE タンパク質も加えて様々な組み合わせでリポソームに再構成した。その結果、SNARE タンパク質と Rab5 もしくは PI(3)P の 2 種類を再構成すると、興味深いことに SNARE タンパク質のみを再構成したリポソームで観察されていた初期エンドソームへのターゲティングが消失した。つまり、Rab5、PI(3)P は SNARE タンパク質によるターゲティング機能を抑制することが分かった。最後に、SNARE タンパク質、Rab5、PI(3)P の 3 種類全てを再構成したリポソームを細胞内に導入した。このリポソームでは再びエンドソームへのターゲティングが観察された。しかし、そのターゲティング部位は、SNARE タンパク質だけを再構成した場合に比べて非常に狭まっている (より特異性が高まっている) ことが分かった。更にそのターゲット部位は、リポソーム膜に加えた PI(3)P の濃度によって変化することが分かった。つまり、PI(3)P の濃度が低いときにはエンドサイトーシスされたばかりの未熟な初期エンドソームへ、高いときはより成熟した初期エンドソームへと、リポソームが運ばれた。これまでの研究から、PI(3)P 濃度はエンドソームの成熟に伴って上昇していくことが知られている (Puchner et al., 2013) ことから、細胞内ではこの PI(3)P の濃度変化が、Rab5 と協調的に、SNARE タンパク質によって決められるおおまかなターゲティングを修飾し、輸送の特異性を高めていることが示唆された。この研究成果は現在論文としてまとめて投稿している。

リポソームのモータータンパク質依存的輸送に関わるタンパク質の同定

リポソームを細胞内に導入すると、一定時間後、モータータンパク質依存的な輸送が観察された (Koike and Jahn 2017)。しかし、脂質のみからなるリポソームがどのようにモータータンパク質に認識されるのかは未知であった。そこで、リポソームに引き寄せられてくる細胞質タンパク質を網羅的に単離した。その中の一つがスペクトリンであった。スペクトリンは膜の裏打ち構造に関わり、細胞形態の維持に関わっていることが知られているが、本研究から、モータータンパク質を介した小胞輸送にも関係していることが示唆された。現在、これまでに得られた成果を論文にまとめて発表する準備をしている。

総説の執筆

輸送小胞がどのように標的となるオルガネラまで正しく輸送されるのかについてこれまでの研究から明らかになっていることをまとめ総説として執筆し、発表した (Koike and Jahn 2022)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Koike Seiichi, Jahn Reinhard	4. 巻 479
2. 論文標題 SNARE proteins: zip codes in vesicle targeting?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 273 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20210719	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 Seiichi koike, Jahn Reinhard	4. 巻 10
2. 論文標題 SNAREs define targeting specificity of trafficking vesicles by combinatorial interaction with tethering factors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09617-9	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小池誠一
2. 発表標題 SNAREタンパク質が輸送小胞の行き先を決定する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池誠一
2. 発表標題 SNAREタンパク質による小胞ターゲティングメカニズムの解明
3. 学会等名 第3回オルガネラゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川大智、磯部正治、黒澤信幸、小池誠一
2. 発表標題 細胞内輸送におけるスペクトリンの機能解明
3. 学会等名 第40回日本生化学会大会北陸支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川大智、磯部正治、黒澤信幸、小池誠一
2. 発表標題 スペクトリン IIはエンドソーム膜のダイナミクスを制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池誠一、Reinhard Jahn
2. 発表標題 輸送小胞の細胞内再構成
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出相 貴史、小池 誠一、朝岡 竜士、片桐 崇史、大嶋 佑介
2. 発表標題 ラマン分光法を用いた卵子の老化のメカニズム解析
3. 学会等名 第43回レーザー学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daichi KITAGAWA, Seiichi KOIKE
2. 発表標題 Spectrin II suppresses endosomal vesicle trafficking by regulating membrane dynamics
3. 学会等名 XXII GEM CONGRESS, INTERACTIONS LIPIDS/POLYMERS/MEMBRANE PROTEINS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 スペクトリン IIはエンドソーム膜の変形を抑制することで小胞輸送を制御する
2. 発表標題 北川大智, 黒澤信幸, 磯部正治, 小池誠一
3. 学会等名 第41回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2023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		
ドイツ	Max Planck Institute for Biophys. Chem.		