

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14488

研究課題名(和文)オルガネラ膜接触部位微小空間におけるイオン濃度のリアルタイム測定法の確立

研究課題名(英文)Development of a method for real-time measuring ion concentrations within membrane contact sites

研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA, YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00294124

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)：膜接触場(MCS)を介したオルガネラ間コミュニケーションの動態を明らかにするために、MCSに於けるイオン濃度変化をリアルタイムにin vivoで測定できる系を以下のように確立した。まず、各々FRBとFKBPを持つ異なったオルガネラに局在するレポータータンパク質を作製し、rapamycinを添加することでMCSを形成させる系を確立した。カルシウム感受性蛍光タンパク質はpH変動に抵抗性を考慮してGFPとエクオリンタンパク質の融合タンパク質を作製した。オルガネラ特異的レポーターにイオン感受性蛍光タンパク質を結合させることでMCSのpH及びカルシウム濃度をリアルタイムで測定できる系を確立した。

研究成果の概要(英文)：To reveal the communications between organelles through membrane contact sites (MCS), we established the assay system to measure ion concentrations within the MCS in real-time as the following. First, we created organelle-specifically localized reporter molecules harboring FRB or FKBP, and these molecules could form MCS by adding rapamycin. Taken pH-resistance into consideration, we created a fusion molecule of GFP and aequorin as a calcium sensor. By fusing organelle-specific reporter molecules with ion-sensitive fluorescent reporter molecules such as pHluorin and calcium sensor, assay systems for ion measurement in MCS were established.

研究分野：分子細胞生化学

キーワード：膜接触部位 pH カルシウム バイオイメーjing

1. 研究開始当初の背景

- 1) 膜接触部位(membrane contact sites; MCS)は、2つの異なったオルガネラ(通常一方は小胞体でありもう一方は残りの様々なオルガネラである)の膜が非常に接近(10nm~30nm)した部位のオルガネラ膜およびそれに挟まれる微小空間であり、オルガネラ間のイオンや脂質の効率的な輸送を行うことで、代謝・シグナリングのオルガネラ間コミュニケーションという重要な機能を果たしていると考えられている。しかしながら主に酵母の研究結果が中心で、哺乳類細胞においてその実体(構成タンパク質など)はほとんど解明されていない。
- 2) MCSを介したイオン、特にカルシウムイオンの流れは細胞膜-小胞体間のstore-operated Ca²⁺ entry(SOCE)や小胞体-ミトコンドリア間のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。MCSの論文で一般的なカルシウム測定用蛍光プローブを用いたオルガネラ内腔や細胞質全体のカルシウム濃度をモニターしている論文は散見されるが、MCSの可視化の困難さと相まって、MCS微小空間でのイオン濃度を直接モニターした報告はこれまでない。
- 3) MCSの環境の動態研究を困難にしている要因は、「2つの異なったオルガネラの膜が非常に接近している」という電顕のみで確認できる形態学的な定義に加え、イオン・脂質というモニターが容易でない物質の輸送を司っている機能によると考えられる。
- 4) 例えば、2 microm四方で厚さ40 nmという大きめに見積もったMCSの場合、そのpHが平均的な細胞質のpH 7程度であれば、計算上は当該空間中のプロトンは10個程度しかないことになる。つまりその微小さゆえにわずかなイオンのやり取りでもMCSの環境に大きな影響を与える事態が想定でき、その事実はイオン濃度のモニターの重要性を意味する。
- 5) 様々なMCSの局所イオン濃度をリアルタイムにin vivoでモニターすることが可能になれば、どのオルガネラ間でどのタイミングでどのイオン濃度が変化し、それが生理的機能をどのように調節しているかを明らかにすることができ、基礎学問的にも医学的にも重要なMCSやイオンシグナルの研究の進展に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

MCSでは、微小空間で集約的にイオン輸送が行われるために、閉鎖空間系でないにも拘らず他の空間への影響が少ない。言い換えると、MCS微小空間の環境は他の部位と大きく異なる可能性が非常に高く、それがゆえに、MCS局所のイオン

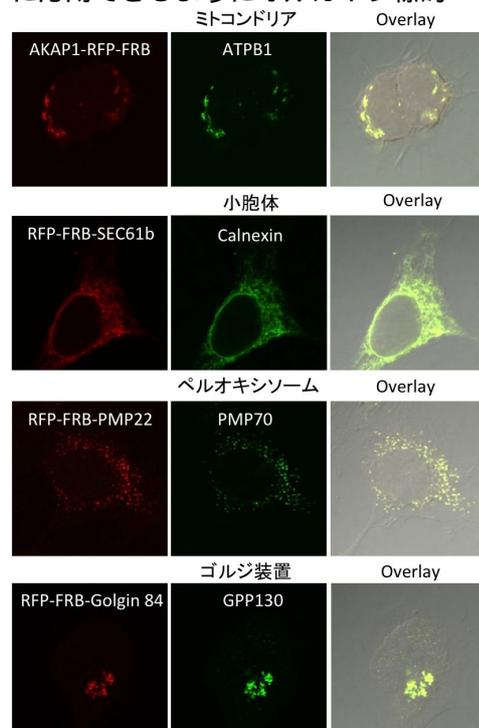
濃度を生細胞でリアルタイムに測ることはMCSでの生理機能の制御方法を知る上で極めて重要なテーマである、当該課題研究は、「MCSの可視化」という独自の研究成果を応用して、オルガネラ間コミュニケーションの動態を明らかにするためにMCS微小空間における様々なイオンの濃度変化をリアルタイムにin vivoで測定できる系を確立する事を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 「小胞体-ゴルジ装置間のMCSの可視化」の為に作製したsplit-proteinシステムを様々なオルガネラ間MCSでのイオン測定に応用できるようにオルガネラ標的ペプチドを変更し、更にイオン測定蛍光プローブの励起・放出波長に応じて蛍光タンパク質のタグへの変更または削除を行う。
- 2) ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の完全型(活性型)のみに特異的に結合できるカルシウム、プロトン、亜鉛、マグネシウムイオン測定用蛍光プローブを作製する。これはメトトレキサート(MTX)にイオン測定用蛍光プローブを付加することで行う。
- 3) を完了後、実際にイオン濃度、特に、小胞体-ミトコンドリア、小胞体-形質膜間でのMCSにおけるカルシウムイオンの濃度と細胞質での濃度を様々な刺激後経時的に測定し比較検討することで、システムの妥当性・有用性を評価する。

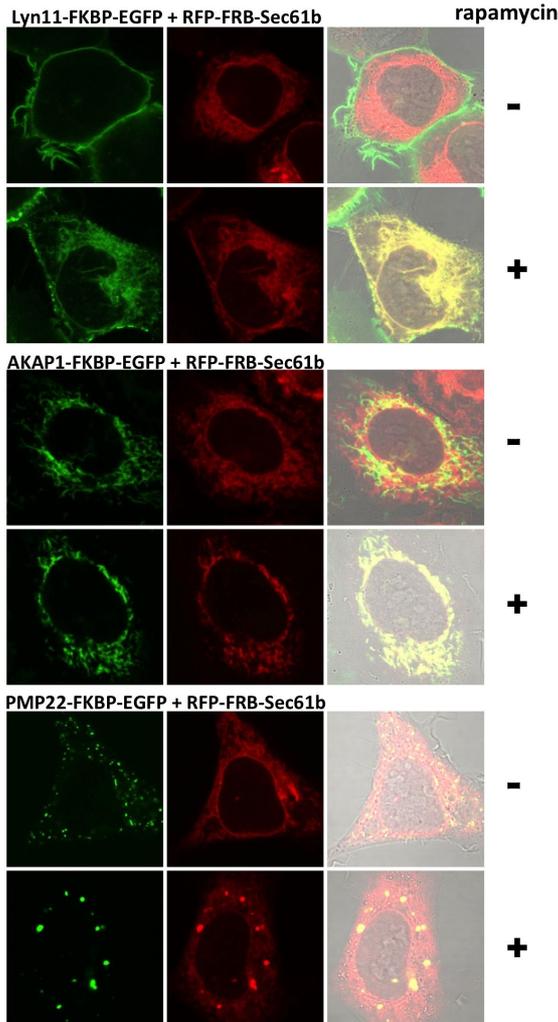
4. 研究成果

- 1) 様々なオルガネラ間MCSでのイオン測定に応用できるようにオルガネラ標的ペ



チドを変更した。

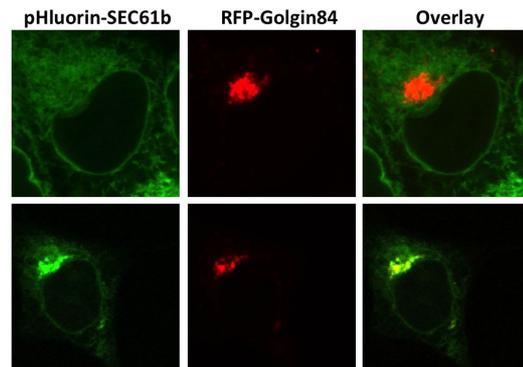
次に、これらのタンパク質がラパマイシン添加によってFRB-FKBP-Rapamycin複合体を形成し共局在するかどうか検討した結果、ラパマイシン添加後、1-2時間で共局在することが分った。



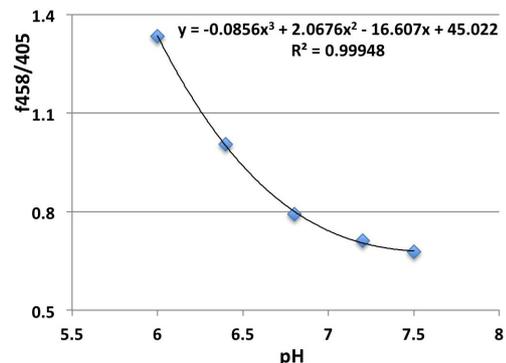
2) 実験計画ではジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の完全型 (活性型) のみに特異的に結合できるカルシウム、プロトン、亜鉛、マグネシウムイオン測定用蛍光プローブを作製する。これはメトトレキサート (MTX) にイオン測定用蛍光プローブを付加することで行うことを提案していた。学内の化学分子イメージング研究室と共同研究にてプローブの開発を行ったが、多々の問題点の存在が明らかになり、断念せざるを得なくなった。そこで新たな方針を立てた。メトトレキサート結合イオン測定用蛍光プローブを断念したためジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の split-protein システムを用いることができなくなった。そこで MCS を特異的に split-protein システムで検出し蛍光プローブで測定するのではなく、上記 1) で述べたタンパク質の組み合わせにおいて、ラパマイシンまたはその類似物質を

添加して強制的に MCS を形成させその環境を測定することにした。これは、FKBP、FRB の系を用いて強制的にオルガネラ膜を近接させることで MCS の構成タンパクの欠損による機能不全を回復できるという事実から、強制的な MCS 形成は本来の MCS の性質を完全ではないにしろ部分的には保持しているという考えに基づく。

MCS 内の pH (プロトン) とカルシウム濃度の測定にまずフォーカスすることにした。これは、それぞれのイオン濃度を測定できるセンサータンパク質が存在することに拠り、それらを上記のオルガネラ標的タンパク質に融合することで容易にオルガネラ特異的に発現させることが可能になるからである。pH 測定には pHluorin タンパク質を、カルシウム測定にはカルシウム感受性タンパク質エクオリン (及びその変異体) と GFP との融合タンパク質 (GAP; GFP and apo-aequorin) を作製した。これは一般によく使われる genetically encoded calcium indicator (GECIs) が pH の変化に強く影響されるが、GAP はかなり pH の変化に抵抗性であることが報告されていたからである。またイオンセンサーではない方のレポーター分子には RFP を融合させ、GFP と RFP が共局在している場所を MCS として定義してそこに局在するイオンセンサー分子の蛍光強度を選択的に計算できるソフトウェアも併せて開発作製した。下に一例を示す。下欄で RFP-Golgin84 と共局在している pHluorin-Sec61b がラパマイシンにより MCS を形成していると考えられ、その部分の pHluorin 蛍光シグナルから pH を計算する。下のグラフは標準曲線である。



Rapamycine: upper panels (-), lower panels (+)



3) 1) 2) より、膜接触場 (MCS) を介したオルガネラ間コミュニケーションの動態を明らかにするために、MCS に於けるイオン濃度変化をリアルタイムに in vivo で測定できる系の条件設定が現時点でほぼ完成した。今後、さまざまなオルガネラ間の MCS における pH (プロトン) やカルシウム濃度を、様々な刺激 (例えば、栄養因子、ATPase 阻害剤、ATP、ヒスタミンなど) 下で時系列的にどのように変化しているかを詳細に検討し、MCS の機能を明らかにしていく予定である。

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 1 件)

CDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. Jansen JC, Cirak S, van Scherpenzeel M, Timal S, Reunert J, Rust S, Pérez B, Vicogne D, Krawitz P, Wada Y, Ashikov A, Pérez-Cerdá C, Medrano C, Arnoldy A, Hoischen A, Huijben K, Steenbergen G, Quelhas D, Diogo L, Rymen D, Jaeken J, Guffon N, Cheillan D, van den Heuvel LP, Maeda Y, Kaiser O, Schara U, Gerner P, van den Boogert MA, Holleboom AG, Nassogne MC, Sokal E, Salomon J, van den Bogaart G, Drenth JP, Huynen MA, Veltman JA, Wevers RA, Morava E, Matthijs G, Foulquier F, Marquardt T, Lefeber DJ. Am J Hum Genet. 2016 Feb 4;98(2):310-21. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.12.010. 査読有り

[図書](計 1 件)

Maeda Y: pH control in the Golgi apparatus and congenital disorders of glycosylation, Experimental Glycoscience (edited by Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H.), pp 921-926, Springer, Tokyo, 2015

[その他]

ホームページ等

免疫不全疾患研究分野へようこそ!

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号: 0 0 2 9 4 1 2 4