

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18507

研究課題名(和文) ゴルジ体における輸送小胞形成とそれに基づく細胞機能制御

研究課題名(英文) Transport carrier biogenesis at the Golgi complex and its role in regulating cellular functions

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質分泌経路の新規輸送小胞CARTSに着目し、(1)小胞体-ゴルジ体膜接触によるCARTS形成制御機構ならびに、(2)細胞分裂期CARTSの生理的役割の解明を目指した。(1)の成果として、タンパク質分泌に関わる膜接触部位新規構成因子を同定するとともに、Ca<sup>2+</sup>依存性積み荷選別への膜接触の関与を示唆する結果を得た。(2)については、当初目標の達成には至らなかったが、膜接触部位構成因子の新たな機能を示す興味深い結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on CARTS, a new class of transport carriers that mediate protein secretion, aiming to elucidate (1) molecular mechanisms by which ER-Golgi contacts regulate CARTS biogenesis and (2) physiological roles of CARTS in mitotic cells. For the first aim, we succeeded in the identification of a novel component of ER-Golgi contact sites, which is involved in protein secretion. Our data also suggest the involvement of the contacts in Ca<sup>2+</sup>-dependent cargo sorting. Although we could not achieve the second aim, our data imply a novel function of components of the contact sites.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ膜接触 小胞体 ゴルジ体 輸送小胞

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは以前、トランスゴルジ網 (TGN) から細胞膜へのタンパク質分泌経路を仲介する新規の輸送小胞として CARTS (carriers of the TGN to the cell surface) を単離・同定し、その微小管上の輸送が双極性モータータンパク質であるキネシン-5 (Eg5) によって特異的に調節されていることを報告した (Wakana *et al.*, EMBO J, 2012; Wakana *et al.*, J Cell Biol, 2013)。私たちはその後、TGN 膜からの CARTS の形成に小胞体膜タンパク質である VAMP-associated protein (VAP) が必要であることを見出した。VAP は、小胞体膜とゴルジ体膜 (厳密にはトランスゴルジ/TGN 膜) の接触部位において ceramide transfer protein (CERT) および oxysterol-binding protein (OSBP) との結合を介して、それぞれセラミドとコレステロールを小胞体からゴルジ体へと輸送する (Hanada *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2009; Mesmin *et al.*, Cell, 2013)。コレステロールの輸送は、ゴルジ体から小胞体へのホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI4P) のカウンター輸送を伴うことが明らかになっており、小胞体膜に局在する Sac1 ホスファターゼは、PI4P を PI へと加水分解することによってこの脂質交換輸送の駆動力を生み出していると考えられている。私たちの結果は、小胞体-ゴルジ体接触部位におけるこれら脂質の輸送が CARTS 形成に必要であることを示した。このことは、ゴルジ体における輸送小胞の形成が別のオルガネラである小胞体によって直接的な制御を受けていることを意味しており、小胞輸送研究に新たなパラダイムをもたらすものである。

私たちはまた、CARTS 積み荷分泌タンパク質である pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) の安定発現株を作製し、このタンパク質の局在を指標とした解析から、分裂期において CARTS が、二つの娘細胞の中間に位置し細胞質分裂に重要な役割を果たす midbody と呼ばれる領域に顕著な集積を示すことを見出した。しかし、その生理的役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

### (1)小胞体-ゴルジ体膜接触による CARTS 形成制御機構の解明

本研究では、CARTS 形成制御の分子機構の詳細を明らかにするため、小胞体-ゴルジ体接触部位の新規構成因子の探索を行うことにした。

TGN での積み荷選別には、TGN 内腔の  $Ca^{2+}$  レベルが重要であるが、その制御メカニズムは不明な点が多い。TGN の  $Ca^{2+}$  レベルは、TGN

膜の  $Ca^{2+}$  ポンプ SPCA1 が細胞質から  $Ca^{2+}$  を取り込むことによって制御されるが、小胞体の関与は明らかになっていない (Pizzo *et al.*, Cell Calcium, 2011; von Blume *et al.*, Dev Cell, 2011)。本研究では、小胞体-ゴルジ体膜接触が脂質輸送だけでなく、 $Ca^{2+}$  輸送によっても輸送小胞形成を制御しているのではないかと考え検証を行うことにした。

### (2)細胞分裂期 CARTS (mCARTS) の生理的役割の解明

本研究では、mCARTS の midbody への輸送に Eg5 が関与するかどうか明らかにするため解析を行うことにした。

mCARTS は、midbody に局在することから細胞質分裂に働く可能性が考えられた。CARTS 形成には、小胞体-ゴルジ体膜接触が必要であることから、本研究では膜接触部位構成因子に着目して仮説の検証を行うことにした。

## 3. 研究の方法

### (1)小胞体-ゴルジ体接触部位の新規構成因子の探索

小胞体-ゴルジ体接触部位の主要な構成因子であることが見出された Sac1 に着目し、結合タンパク質のプロテオーム解析を行った。候補タンパク質の評価を行うため、免疫沈降実験により、VAP、OSBP および Sac1 との相互作用を確認した。また、その相互作用が膜接触部位で起きているかどうかを Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法により可視化し検証した。加えて、RNAi 法による発現抑制を行い、CARTS 積み荷タンパク質 PAUF の分泌に与える影響を調べるとともに、膜接触部位における脂質ホメオスタシスへの影響を調べた。

### (2)ゴルジ体への $Ca^{2+}$ 輸送に小胞体-ゴルジ体膜接触が関与するかどうかの検証

小胞体-ゴルジ体膜接触の破綻が、ゴルジ体内腔  $Ca^{2+}$  レベルに与える影響を Cab45 と呼ばれる  $Ca^{2+}$  結合性ゴルジ体内腔タンパク質の局在を指標として調べた。 $Ca^{2+}$  依存性積み荷選別に働く Cab45 は、ゴルジ体内腔の  $Ca^{2+}$  レベルが低下するとゴルジ体に留まることができず細胞外へと分泌されることがわかっている (von Blume *et al.*, J Cell Biol, 2012)。膜接触部位構成因子の発現抑制が Cab45 のゴルジ体局在に影響を及ぼすかどうかを調べた。

### (3)mCARTS 輸送への Eg5 の関与の検証

MycHis タグを付加した PAUF の安定発現細胞株を用い、このタンパク質をマーカーとし

て mCARTS を可視化し、GFP-Eg5 陽性微小管と局在を比較した。

#### (4)細胞質分裂への mCARTS の関与の検証

小胞体-ゴルジ体接触部位構成因子の発現抑制ならびに、膜接触のダイナミクスを低下させ CARTS 形成を阻害する OSBP 変異体の過剰発現が細胞質分裂に与える影響を多核化を指標として調べた。また、ライブセルイメージングにより、細胞質分裂の進行をモニターした。

#### 4. 研究成果

本研究では、小胞体-ゴルジ体接触部位の新規構成因子の候補として、複数のタンパク質を見出した。その中には、これまで膜接触部位との関連が報告されていない細胞機能に関わる分子が含まれ、今後の解析により膜接触部位の新たな機能の解明につながることを期待される。今回特に詳細な解析を行った脂質代謝関連タンパク質は、コレステロール/PI4P 交換輸送の制御に関わっている可能性が示された。私たちはまた、小胞体-ゴルジ体膜接触が  $Ca^{2+}$  輸送に働く可能性を見出した。これらの成果から、CARTS 形成制御の分子メカニズム解明に向け大きな前進があったと考えている。

mCARTS の解析では、間期と同様、Eg5 陽性微小管上に mCARTS が局在することが示された。Eg5 は、逆平行に並んだ二本の微小管の滑り込みを引き起こすことによって紡錘体の形成に働くことから (Kapitein *et al.*, Nature, 2005)、CARTS の輸送が逆平行微小管の滑り込みに依存するののかという非常に興味深い問題が提起された。一方、mCARTS の生理的役割の解明には至らず、今後さらなる解析が必要である。

本研究で得られた成果の詳細については、以下に記述する。

#### (1) Sac1 結合タンパク質の同定

プロテオーム解析の結果、VAP や OSBP などの既知の結合タンパク質や既に膜接触部位に局在することが報告されている複数のタンパク質に加え、興味深いタンパク質が複数同定された。中でも小胞体-ゴルジ体接触部位で機能する可能性が推測された脂質代謝関連タンパク質 X (論文投稿準備中) に着目し以降の解析を行った。

同定されたタンパク質には、本研究の目的である小胞体-ゴルジ体接触部位だけでなく、他の膜接触部位で Sac1 と相互作用するタンパク質も含まれていると考えられた。そこで、機能解析へと進める候補タンパク質をさらに絞り込むための二次スクリーニングの準備も並行して進めることにした。

#### (2) タンパク質 X は VAP-OSBP-Sac1 と小胞体-ゴルジ体接触部位で相互作用する

FLAG タグを付加したタンパク質 X を細胞に発現させ、FLAG 免疫沈降実験を行った。その結果、内在性 Sac1 と VAP-A の結合が確認された。また、Myc-OSBP 野生型および変異体を共発現させて FLAG 免疫沈降実験を行った結果、タンパク質 X は Sac1 を介して VAP-A、OSBP と相互作用することが示唆された。その一方、タンパク質 X の欠失変異体のひとつは、OSBP や VAP-A とより高い結合親和性を示したことから、タンパク質 X には VAP-A-OSBP-Sac1 との結合を負に制御する仕組みが存在するのではないかと考えられた。

次に、蛍光タンパク質 Cerulean の N 末端 (Cn) と C 末端 (Cc) をそれぞれ付加したタンパク質 X と VAP-A を Myc-OSBP と共に細胞に発現させた。25-ヒドロキシコレステロール (25-OH) 処理により Cc-VAP-A の膜接触部位への集積を誘導したところ、BiFC のシグナルが核近傍において検出された (図 1)。同様のシグナルは、Cc-VAP-A の代わりに Cc-Sac1 を用いた時にも観察され、タンパク質 X と VAP-A および Sac1 の相互作用が小胞体-ゴルジ体接触部位で起きることがわかった。

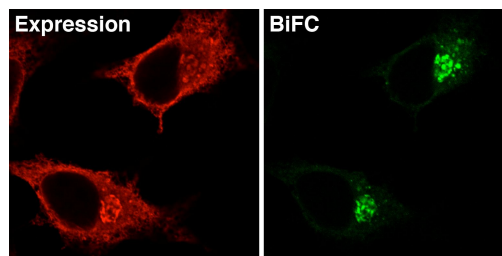


図1 VAP-Aとタンパク質Xは、小胞体-ゴルジ体接触部位で相互作用する

#### (3) タンパク質 X は PAUF 分泌とゴルジ体での PI4P ターンオーバーに必要である

タンパク質 X 発現抑制細胞に PAUF-MycHis を発現させ、培地中の量を調べた。その結果、発現抑制細胞ではコントロールに比べ約 60% 分泌量が低下していることがわかった。タンパク質 X は VAP-A-OSBP-Sac1 と相互作用することから、コレステロールと PI4P の交換輸送に関与している可能性が考えられた。抗 PI4P 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、タンパク質 X 発現抑制細胞では核近傍に顕著な PI4P の蓄積が認められた (図 2)。

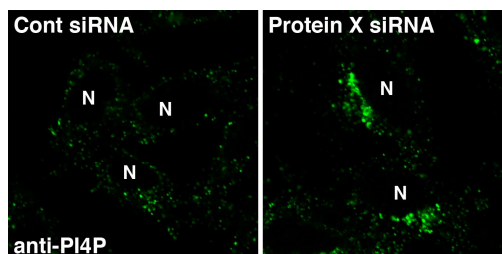


図2 タンパク質Xの発現抑制は、ゴルジ体へのPI4Pの蓄積を引き起こす (N: 核)

今後、コレステロールについても解析が必要であるが、この結果はタンパク質 X がコレステロール/PI4P 交換輸送に参与している可能性を示している。

#### (4) ゴルジ体への Ca<sup>2+</sup>供給における小胞体-ゴルジ体膜接触の関与の可能性

HeLa 細胞において、VAP-A と VAP-B の二重発現抑制を行った結果、約 30% の細胞において、Cab45 がゴルジ体から消失していることがわかった (図 3)。この効果は、培地中の Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させることによって増強されるだけでなく、コレステロールの合成・輸送を阻害する 25-OH によっても増強されることがわかった。同様の効果は、CERT と OSBP を二重発現抑制した細胞においても見られた。

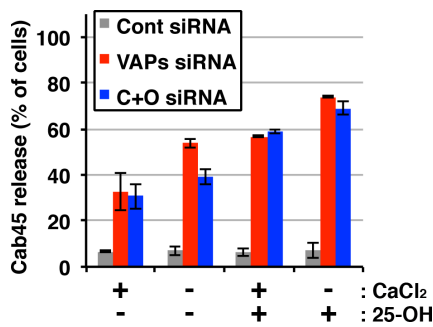


図3 VAP-A/B、CERT/OSBPの二重発現抑制は Cab45のゴルジ体からの消失を引き起こす

これらの結果は、小胞体-ゴルジ体接触部位がゴルジ体への Ca<sup>2+</sup>輸送に関わっていることに加え、脂質輸送と Ca<sup>2+</sup>輸送が共役しているという興味深い可能性を示している。実際の Ca<sup>2+</sup>レベルの変化を調べるため、現在私たちは、fluorescence resonance energy transfer (FRET)に基づく TGN 特異的 Ca<sup>2+</sup>センサーを用いた実験系の構築を進めている。

#### (5) 分裂期細胞においても CARTS は Eg5 陽性微小管上に局在する

PAUF-MycHis 安定発現株に GFP-Eg5 を発現させ、ジギトニンを用いた膜透過処理によって微小管に結合していない細胞質の Eg5 を除去した後、固定した。その結果、後期および終期の細胞において GFP-Eg5 が局在している微小管上に PAUF-MycHis のドット (mCARTS) が分布している様子が観察された (図 4)。

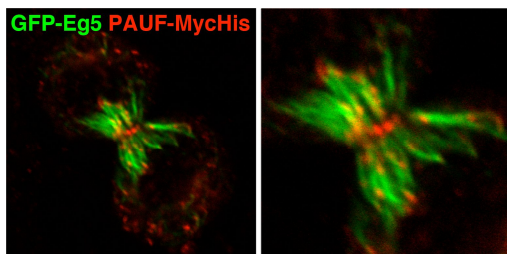


図4 mCARTSはEg5陽性微小管上に局在する

この結果から、CARTS は分裂期においても間期と同様、微小管を利用し Eg5 依存的に輸送される可能性が考えられた。

#### (6) 小胞体-ゴルジ体接触部位構成因子の発現抑制は細胞質分裂を阻害する

HeLa 細胞で CERT と OSBP の二重発現抑制を行い、Hoechst 33342 で核への影響を調べた。その結果、ほとんどのコントロール細胞では一つの核が観察されたのに対し、CERT/OSBP 二重発現抑制時には、約 35% の細胞において二つ以上の核が含まれることがわかった。ライブセルイメージングでは、これらの細胞において細胞質分裂の進行に大きな遅延が認められた。一方、VAP-A/VAP-B の二重発現抑制では、多核化の傾向は見られたものの、前者ほどの顕著な影響は認められなかった。

CARTS 形成阻害に対して強い阻害効果を示す OSBP 変異体の過剰発現を行い、同様の解析を行ったが、細胞質分裂に対する顕著な影響は認められず、CERT/OSBP の二重発現抑制は mCARTS 形成の阻害とは異なる経路で細胞質分裂を阻害しているのではないかと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wakana, Y., Kotake, R., Oyama, N., Murate, M., Kobayashi, T., Arasaki, K., Inoue, H., and Tagaya, M. (2015). CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell* 26, 4686-4699. 査読有, DOI: 10.1091/mbc.E15-08-0599

##### 〔学会発表〕(計 3 件)

Wakana, Y., Yoshida, S., Okuma, R., and Tagaya, M. A role for endoplasmic reticulum-Golgi contacts in CARTS biogenesis from the trans-Golgi network. EMBO workshop, Organelle contact sites: Intracellular communication and role in disease, 2016/9/15-18, Domus de Maria, Italy.

吉田爽、若菜裕二、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、2015/12/1-4、神戸

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、2015/6/30-7/2、東  
京

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ls.toyaku.ac.jp/node/73#over  
lay-context=molbio](http://www.ls.toyaku.ac.jp/node/73#overlay-context=molbio)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

若菜 裕一 (WAKANA, Yuichi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：9 0 6 3 5 1 8 7