

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10113

研究課題名(和文)胎盤細胞で働くエンドソーム膜タンパク質MLN64のコレステロール輸送における役割

研究課題名(英文) Role of the endosomal membrane protein MLN64 on the cholesterol trafficking in the placental cells

研究代表者

奈良 篤樹 (Nara, Atsuki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：60387959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎盤細胞におけるエンドソーム-ミトコンドリア間の接触による新規コレステロール輸送の分子機構解明を目指した。その結果、後期エンドソームとミトコンドリアとの間で20nmほどの距離で緊密に接近し、数本の柱状の構造体でこの距離を保ち支えていることを3D免疫電顕法によって明らかにした。この距離を保つ役割を持つ柱状の構造体は、妊娠維持ホルモンの産生に必要なMLN64を欠くと失われることから、エンドソームとミトコンドリアの距離維持が妊娠維持ホルモン産生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、妊娠維持ホルモン産生に関連するコレステロール輸送の分子機構解明を目的とした。得られた本研究の結果は、胎盤細胞におけるステロイドホルモン産生の分子機構の一端が解明された。胎児の安定的成長を促す謎の多い胎盤機能の新たな提示ができたと考えており、波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed the molecular mechanism of a novel cholesterol trafficking to communicate across the organelle membrane between endosomes and mitochondria in the placental cells. As a result, I used immuno-electron tomography to analyze 3D structures of approximately 20-nm distance of the late endosome-mitochondria contact sites, and identified filamentous structures, tethers, that connected between the late endosomes and mitochondria. The tethers connected with the late endosomes and mitochondria were specifically gone in the MLN64 knockdown cells. My results suggest that ultra-structural features of MLN64-dependent membrane contacts contribute the production of progesterone in the placental cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：胎盤細胞 妊娠維持ホルモン ステロイドホルモン エンドソーム MLN64

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤は、私たちが新生児として生まれる前の約9ヶ月間、プロゲステロンや栄養素などを送り届ける極めて重要な役割を果たす臓器であり、子宮内での胎児の成長を支える。ところが胎盤は、最も未解明の機能の多い臓器としても知られる。例えば、胎盤細胞でどのようにしてプロゲステロンは大量に産生されるのか、そのプロゲステロンは何に作用するのかなど、不明の部分が多い。エンドソームに存在するコレステロールは一般に、プロゲステロンを産生するミトコンドリアへ拡散によって運ばれると信じられている。しかし、胎盤細胞ではプロゲステロンを大量に産生することから、拡散ではなく、ミトコンドリアに標的を絞った安定的な細胞種特異的コレステロール輸送機構が存在することが考えられる。さらに、プロゲステロンを大量に産生するためにはコレステロールがその相応量必要であることから、如何に LDL を効率良く安定的に取り込むのかといったことに関しても殆ど分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、胎盤細胞におけるエンドソーム-ミトコンドリア間の接触による新規コレステロール輸送の分子機構解明を目指す。

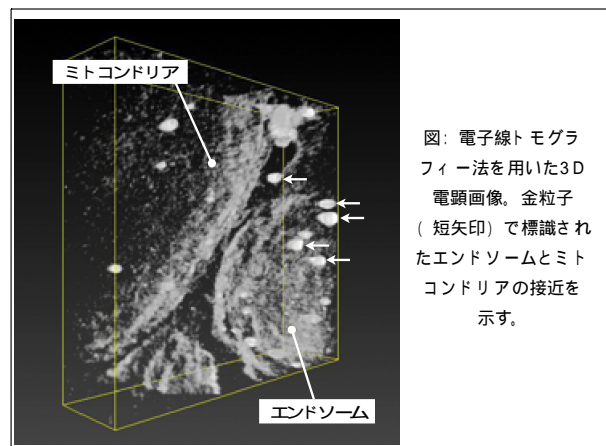
### 3. 研究の方法

- (a)電子線 3D トモグラムによる MLN64 が存在するエンドソーム-ミトコンドリア間の接触領域の微細構造解析。
- (b)エンドソーム~ミトコンドリア間強制接触系の構築とその解析。
- (c)MLN64 リン酸化変異体を用いた機能解析。
- (d)蛍光標識 LDL やその受容体の物質輸送と細胞内分布解析。
- (e)単離エンドソームとミトコンドリアを用いた接触系の構築と解析。

### 4. 研究成果

- (a)電子線 3D トモグラムによる MLN64 が存在するエンドソーム-ミトコンドリア間の接触領域の微細構造解析

後期エンドソームとミトコンドリアとの間の接近とその構造の詳細を明らかにする目的で、胎盤由来の JEG3 培養細胞を用いて免疫染色後に 3D 電顕をする新規の方法の考案に取り組み、実際に観察した。すると、およそ 20nm の極めて接近した距離で Lamp1 標識後期エンドソームとミトコンドリアが接して存在していたことを立体的に観察できた。しかも、この近接した領域の空間を極めて細い柱様の構造体がいくつも直立していたことも判明し、この柱様の構造体が両オルガネラの距離を保つことが示唆された。MLN64 をロックダウンし発現抑制された JEG3 細胞では、100nm ほどに両オルガネラの距離が離れてしまい、柱様の構造体がほとんど観察できなかった。一方、コレステロール輸送の阻害剤である U18666A を処理した JEG3 細胞では、両オルガネラ間の距離がおよそ 300nm 以上に広がることから、MLN64 は後期エンドソームとミトコンドリアの間の距離維持に重要というよりはむしろ、柱様の構造体形成に重要であるという結論に達した。この結果は、近年多く報告されているオルガネラ接触の新たなメカニズムを提唱できると考えている。



- (b)エンドソーム~ミトコンドリア間強制接触系の構築とその解析

後期エンドソームとミトコンドリアの距離を接近させた場合の構造やステロイドホルモン産生等の機能的特徴を明らかにする目的で、エンドソーム局在化シグナルを持つ配列とミトコンドリア移行シグナルを持つ配列を融合し、JEG3 培養細胞に一過的に発現させた。結果、後期エン

ドソームとミトコンドリアとの接近部分に発現タンパク質が多く見られることを免疫電子顕微鏡解析によって明らかにした。しかし、肥大化した後期エンドソーム内腔にミトコンドリアが取り込まれる像も多数認められ、過剰な接近によりミトコンドリアがマイクロオートファジー様の取り込みが生じたと考えられた。今後、融合タンパク質作製の際に、両配列を繋ぐリンカー部分の長さを調節するなどの工夫をして行く予定である。

(c)MLN64 リン酸化変異体を用いた機能解析

エンドソームにおける MLN64 の機能を詳細に明らかにする目的で、MLN64 の細胞質部分に存在する 4 箇所のリン酸化予想部位の変異導入を行った。この変異 MLN64 を MLN64 安定発現抑制 JEG3 培養細胞に発現させると、エンドソームとは異なる局在を示した。現在、この局在についてさらなる解析を行っている。

(d)蛍光標識 LDL やその受容体の物質輸送と細胞内分布解析

MLN64 は、コレステロールと結合しその輸送を制御するタンパク質である。そこで、外界の LDL の取り込みとリソソームへの輸送を明らかにする目的で、MLN64 安定発現抑制 JEG3 培養細胞を用いて蛍光標識 LDL の取り込み実験を行ったところ、取り込みがほとんど見られないことがわかった。これは、生化学的な解析からでも証明された。LDL 受容体は細胞表面にほとんど発現していないことも判明した。現在、LDL 受容体がどこに存在しているのか、解析を進めている。

(e)単離エンドソームとミトコンドリアを用いた接触系の構築と解析

エンドソームとミトコンドリアの接触とそれを介したコレステロール輸送の分子メカニズムを明らかにする目的で、まずエンドソームの単離を試みた。ショ糖密度勾配遠心法によって、内在性 MLN64 の存在するエンドソームを immuno-isolation 法にて単離した。驚いたことに、MLN64 を含むエンドソームのほとんどが初期エンドソームの特徴を有しており、後期エンドソームタンパク質の存在はわずかであった。今後、ミトコンドリアの単離を進めるとともに、なぜ後期エンドソームには内在性 MLN64 がほとんど存在しないのかについても解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 1件）

1. 著者名 Ohno Y., Nara A., Nakamichi S., and Kihara A.	4. 巻 92
2. 論文標題 Molecular mechanism of the ichthyosis pathology of Chanarin-Dorfman syndrome: Stimulation of PNPLA1-catalyzed -0-acylceramide production by ABHD5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Dermatol. Sci.	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.11.005	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 奈良篤樹	4. 巻 50
2. 論文標題 エンドソームと接触するオルガネラへの物質輸送	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 452-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 奈良篤樹, 渡邊静香, 藤井梨帆	4. 巻 33
2. 論文標題 胎盤細胞におけるエンドソーム-ミトコンドリア間膜接触による細胞内コレステロール輸送	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 242-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 奈良篤樹	4. 巻 31
2. 論文標題 胎盤細胞で働くエンドソーム膜タンパク質MLN64のコレステロール輸送における役割	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 69-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 奈良篤樹	4. 巻 49
2. 論文標題 胎盤細胞におけるミトコンドリアへのコレステロール輸送に関わるエンドソーム膜タンパク質MLN64の研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Tabata K, Nara A, Omori H, Morita E	4. 巻 1998
2. 論文標題 Immuno-localization of ESCRT proteins in virus-infected cells by fluorescence and electron microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The ESCRT Complexes	6. 最初と最後の頁 73-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9492-2_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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奈良篤樹
2. 発表標題 胎盤細胞におけるステロイドホルモン産生に關するMLN64は、エンドソームとミトコンドリアとの接触に必要である
3. 学会等名 第7回ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 奈良篤樹, 辻真矢, 谷口勇斗, 佐藤弥颯
2. 発表標題 胎盤細胞におけるエンドソーム膜タンパク質MLN64は、エンドソームとミトコンドリアの接近に必要である
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----