

令和元年5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15218

研究課題名(和文) 素過程の統合的理解に基づく小胞体ネットワーク形成の全容解明

研究課題名(英文) Integrated understanding of fundamental processes underlying formation of the endoplasmic reticulum network

研究代表者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA, Toshiaki)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80359843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は細胞質中にある膜で囲まれた区画で、シート構造とチューブ構造からなり、チューブ同士がthree-way junction構造によって連結されることにより、迷路状のネットワークを形成する。Three-way junctionの安定化は小胞体ネットワークの流動性と密接に関わるが、その分子機構は不明な点が多い。本研究では、lunapark結合分子p120によるlunaparkの自己ユビキチン化を介した分解制御がthree-way junctionの安定化に重要であることを明らかにした。また、three-way junctionに局在し、安定化に関わる新しい小胞体膜タンパク質p57を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のp120によるlunaparkの自己ユビキチン化を介した分解制御は、小胞体ネットワークの流動性に膜変形タンパク質の分解が大きな寄与をしていることを提示したものであり、学術的な意義が大きいと考えている。また、新規three-way junction局在分子p57の発見は、three-way junctionの動態制御の全容を理解する上で重要な知見である。小胞体ネットワークの破綻は遺伝性痙性対麻痺などの神経変性疾患を引き起こすことから、本研究の成果が神経変性疾患の発症機序の理解や治療薬の開発に繋がる可能性が考えられ、社会的にも意義が大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) is a membrane-bound compartment composed of tubules and sheets in the cytoplasm. The ER tubules connect each other by three-way junctions, resulting in formation of the reticular ER network. While stability of the three-way junctions underlies dynamics of the reticular ER network, the molecular mechanism of how stability of the three-way junctions is regulated remains unclear. In this study, we revealed that p120, a protein that bound to lunapark, negatively regulated the auto-ubiquitination and proteasomal degradation of lunapark, leading to stabilization of the three-way junctions. Moreover, we identified p57 as a novel ER membrane protein that localized to and regulated the three-way junctions.

研究分野：医化学一般

キーワード：細胞小器官 小胞体 膜変形タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体は真核細胞の細胞質中にある膜で囲まれた迷路状の区画で、脂質合成、分泌タンパク質と膜貫通タンパク質の合成と品質管理、カルシウムの貯蔵などが行われている。また、細胞内小器官を形作るための膜の供給源であるという一面を持っており、核、ゴルジ体、ペルオキシソーム、オートファゴソームが小胞体膜由来であると示唆されている。小胞体は速やかに移動し、刻々と迷路状の区画を変形するため、その動きは流動的である。小胞体の動きが他の細胞小器官の形成、移動にも影響すると考えられており、小胞体の迷路状ネットワーク形成の解明は生命現象の根幹に迫るきわめて重要な課題であるが、その分子機構には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、膜構造という視点から小胞体ネットワーク形成の素過程（ホール形成、チューブ形成、チューブ融合、ネットワーク形成）を捉えなおすために、ネットワーク形成に至る全素過程を *insitu* で可視化、*live* で検出可能なアッセイ系を世界に先駆けて開発する。長年不明であったネットワーク形成に至る膜構造変化との機能関係を明らかにし、小胞体の新たな概念と分子メカニズムを生み出す。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の調製

FLAG タグをつけた lunapark 全長(Lnp-FLAG)の組換えタンパク質は HEK293 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を結合した agarose レジンでアフィニティー精製した。6xHis タグをつけた lunapark 全長(His-Lnp)の組換えタンパク質、ユビキチンリガーゼドメインのみからなる N 末フラグメントの GST 融合タンパク質(GST-Lnp Ub)、lunapark 結合タンパク質 p120 の MBP 融合タンパク質(MBP-p120)は大腸菌に発現させた。His-Lnp は Ni-agarose レジンで、GST-Lnp Ub が glutathione sepharose レジンで、MBP-p120 はアミロースレジンで、それぞれアフィニティー精製した。

(2) ユビキチンリガーゼ活性の評価

Lunapark の組換えタンパク質(Lnp-FLAG または GST-Lnp Ub)を MBP-p120 または MBP 存在下で E1 酵素、E2 酵素(UBE2D1)、ATP と試験管内で室温で 30 分間混合し、その後、HA タグをつけたユビキチン(HA-ユビキチン)を加えて 37°C で 150 分間反応させた。サンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 HA 抗体で western blot してユビキチン化された lunapark を検出し、lunapark のユビキチンリガーゼ活性を試験管内で評価した。

HEK293 細胞に Lnp-FLAG、HA-ユビキチン、HA タグをつけた p120 または HA タグの control vector をトランスフェクションし、プロテアソーム阻害剤 clasto-lactacystin β -lactone で処理した後、細胞を 1% NP-40 を含む buffer で溶解した。細胞抽出液に 1% SDS を加えて 90°C で 5 分間加熱し、タンパク質を変性させた。その後、10 倍希釈して SDS 濃度を 0.1% に低下させ、抗 FLAG 抗体を結合した agarose レジンで Lnp-FLAG をアフィニティー精製した。サンプルを SDS-PAGE で分離後、抗 HA 抗体で western blot してユビキチン化された Lnp-FLAG を検出し、lunapark のユビキチンリガーゼの活性を細胞内で評価した。

(2) ショ糖密度勾配遠心法によるサイズ分画

His-Lnp を MBP-p120 または MBP と 4°C で 1 時間混合した後、サンプルを 10-40% ショ糖密度勾配溶液に重層した。200,000 x g、4°C で 20 時間遠心した後、ショ糖密度勾配溶液の底からサンプルを回収し、17 フラクシオンに分画した。分子量サイズマーカーをサンプルと並行して密度勾配遠心分離することで、各フラクションとタンパク質の分子量を対応させ、His-Lnp の単量体及び多量体のフラクションを同定した。

(3) 組換えタンパク質を用いた結合実験

6xHis タグをつけたユビキチンリガーゼドメインを除いた lunapark の C 末フラグメント(His-Lnp Δ Ub)の組換えタンパク質を大腸菌に発現させ、Ni-agarose レジンで精製、固相化した。600pmol の固相化した His-Lnp Δ Ub を、1200pmol の GST-Lnp Ub、6000pmol の MBP-p120 または MBP と 4°C で 2 時間混合した後、レジンを洗浄し、結合したタンパク質を SDS サンプルバッファで溶出した。サンプルを SDS-PAGE で分離後、CBB 染色して、結合タンパク質を検出した。

(4) 培養細胞における小胞体ネットワークの評価

COS7 細胞に p120 に対する siRNA または control siRNA をトランスフェクションした後、ER-RFP を発現するバキュロウイルスを培地に加えて 16 時間培養し、ER-RFP をトランスフェクションした。細胞をパラホルムアルデヒドで固定した後、共焦点レーザー顕微鏡により RFP 蛍光を検出することで小胞体ネットワークを観察した。U2OS 細胞に p57 に対する siRNA または control siRNA をトランスフェクションした後、GFP-Sec61 β をトランスフェクションした。細胞をパラホルムアルデヒドで固定した後、共焦点レーザー顕微鏡により GFP 蛍光を検出することで小胞体ネットワークを可視化し、three-way junction の数を測定した。

蛍光タンパク質をトランスフェクションせずに細胞をパラホルムアルデヒドで固定した後、TritonX-100 で透過処理し、抗 CLIMP-63 抗体と抗 α -チューブリン抗体で免疫染色した。 α -チューブリンの染色像から細胞全体の輪郭を決定し、細胞の全領域に対する CLIMP-63 の染色領域から、小胞体シートの分布を定量、評価した。

4. 研究成果

小胞体はシート構造とチューブ構造からなり、チューブ同士が three-way junction 構造によって連結されることにより、細胞内に迷路状のネットワークを形成する。Three-way junction の動態は小胞体ネットワークの流動性と密接に関わっている。そこで本研究では、three-way junction に局在する分子に着目し、three-way junction 構造を安定化する分子機構を解析した。

(1) Lunapark による three-way junction 構造の安定化機構

Three-way junction に局在し、構造を安定化する分子として Lunapark がある。Lunapark はユビキチンリガーゼ活性を有するが、ユビキチンリガーゼ活性と three-way junction 構造の安定化との間の機能関係は不明である。この機能関係について解析し、以下の成果を得た。

Lunapark 結合タンパク質 p120 による Lunapark のユビキチンリガーゼ活性抑制

FLAG タグをつけた Lunapark 全長(Lnp-FLAG)の組換えタンパク質を MBP 存在下で E1 酵素、E2 酵素(UBE2D1)、ATP、ユビキチンと混合し、反応させると、Lnp-FLAG が試験管内で自己ユビキチン化された。Lunapark 結合タンパク質 p120 の MBP 融合タンパク質(MBP-p120)存在下で同様の反応を行うと、Lnp-FLAG の自己ユビキチン化が顕著に減弱した。Lunapark は N 末からユビキチンリガーゼドメイン、2 つの膜貫通領域、coiled-coil ドメイン、Zn フィンガードドメインからなる。Lunapark 全長の代わりに、p120 に結合できない Lunapark のユビキチンリガーゼドメインのみからなる N 末フラグメントの GST 融合タンパク(GST-Lnp Ub)を用いた場合、GST-Lnp Ub の自己ユビキチン化は MBP-p120 存在下で減弱しなかった。また、HEK293 細胞に Lnp-FLAG と HA-ユビキチンをトランスフェクションすると、Lnp-FLAG は細胞内で自己ユビキチン化されたが、この自己ユビキチン化は p120 のトランスフェクションにより減弱した。以上の結果から、Lunapark 結合タンパク質 p120 は Lunapark のユビキチンリガーゼ活性を抑制することが明らかとなった。

Lunapark 結合タンパク質 p120 による Lunapark の多量体形成調節

6xHis タグをつけた Lunapark(His-Lnp)の組換えタンパク質をシヨ糖密度勾配遠心法で分離すると、単量体(約 50kDa)に相当するフラクションのみならず、多量体(600kDa 以上)に相当するフラクションにも His-Lnp が分画された。MBP-p120 存在下で His-Lnp をシヨ糖密度勾配遠心法で分離すると、単量体に相当するフラクションに分画される His-Lnp が減少し、多量体に相当するフラクションに分画される His-Lnp が増加した。多量体に相当するフラクションから Ni-agarose レジンで His-Lnp をプルダウンすると、MBP-p120 が共沈した。以上の結果から、Lunapark 結合タンパク質 p120 は Lunapark の多量体形成を促進することが明らかとなった。

Lunapark 結合タンパク質 p120 による Lunapark の分子間結合の調節

6xHis タグをつけたユビキチンリガーゼドメインを除いた Lunapark の C 末フラグメントの組換えタンパク質(His-Lnp Δ Ub)を Ni-agarose レジンに固相化し、ユビキチンリガーゼドメインのみを含む Lunapark の N 末フラグメントの GST 融合タンパク(GST-Lnp Ub)と混合すると、GST-Lnp Ub が His-Lnp Δ Ub に結合した。これを MBP-p120 存在下で行うと、GST-Lnp Ub の His-Lnp Δ Ub への結合が増強した。以上の結果から、Lunapark の N 末ユビキチンリガーゼドメインは C 末と結合する能力があること、Lunapark 結合タンパク質 p120 はこの N 末と C 末の結合を促進することが明らかとなった。

Lunapark 結合タンパク質 p120 による Lunapark のプロテアソーム分解調節

p120 を siRNA ノックダウンした COS7 細胞は、control siRNA をトランスフェクションした細胞に比べて、内在性の Lunapark のタンパク量が有意に減少した。p120 ノックダウン細胞をプロテアソーム阻害剤 clasto-lactacystin β -lactone で処理すると、Lunapark のタンパク量の減少が緩和した。以上の結果から、Lunapark 結合タンパク質 p120 は Lunapark のプロテアソーム分解を抑制的に調節していることが明らかとなった。

Lunapark 結合タンパク質 p120 による小胞体ネットワーク調節

COS7 細胞に ER-RFP を発現するバキュロウイルスをトランスフェクションして小胞体ネットワークを可視化したところ、p120 を siRNA ノックダウンした細胞は、control siRNA をトランスフェクションした細胞に比べて、小胞体のチューブ状ネットワークが減少した。次に、p120 ノックダウンが小胞体のシート構造に与える効果を検討するために、小胞体シートのマーカーである CLIMP-63 を免疫染色した。Control siRNA をトランスフェクションした細胞では CLIMP-63 は核周辺の小胞体に局在したが、p120 ノックダウン細胞では CLIMP-63 は小胞体全体に分布し

た。p120 ノックダウン細胞に lunapark をトランスフェクションすると、CLIMP-63 は小胞体全体への分布を消失し、核周辺の小胞体に局在した。これらのことから、p120 のノックダウンは小胞体シートを増加させること、p120 ノックダウンによる小胞体シートの増加は lunapark の過剰発現によりレスキューされることがわかった。以上の結果から、lunapark 結合タンパク質 p120 は lunapark のタンパク量調節を介して、小胞体ネットワーク形成に重要なチューブとシートのバランスを調節していることが明らかとなった。

以上の結果を総合し、lunapark が three-way junction 構造の安定化を調節する分子機構として次のようなモデルが考えられた。

p120 は lunapark の N 末と C 末の結合を促進することで、lunapark の多量体形成を促進する。p120 による多量体形成により lunapark のユビキチンリガーゼ活性が抑制され、細胞内における lunapark の自己ユビキチン化とプロテアソーム分解が適切に調節される。結果として lunapark のタンパク量が適度に保たれ、three-way junction が安定化される。

(2) p57 による three-way junction 構造の安定化機構

Three-way junction に局在する分子として、これまでに上述の lunapark 及び膜融合因子 atlastin が同定されている。Three-way junction 構造の安定化機構についてさらに理解するために、これら既知の分子とは異なる、新しい three-way junction 局在分子の探索を行い、以下の成果を得た。

新しい three-way junction 局在分子 p57 の同定

HA タグをつけた様々な小胞体膜タンパク質を、小胞体マーカーである GFP-Sec61 β とともに U2OS 細胞にトランスフェクションし、免疫染色で局在を検討した。検討した小胞体膜タンパク質のほとんどは GFP-Sec61 β と同様な小胞体ネットワークへの一様な局在を示す一方、機能未知の小胞体膜タンパク質 p57 が three-way junction と思われる部位への局在を示した。次に、p57 が three-way junction に局在する lunapark 及び atlastin と共局在するかを調べた。HA タグをつけた p57(HA-p57)を、Lnp-FLAG または FLAG タグをつけた atlastin(FLAG-atlastin)とともに U2OS 細胞にトランスフェクションし、免疫染色したところ、HA-p57 は Lnp-FLAG および FLAG-atlastin と three-way junction で共局在した。以上の結果から、小胞体膜タンパク質 p57 は新しい three-way junction 局在分子であることが明らかになった。

p57 と lunapark、atlastin との結合

HA-p57 を Lnp-FLAG または FLAG-atlastin とともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 HA 抗体で p57 を免疫沈降したところ、Lnp-FLAG および FLAG-atlastin が共沈した。p57 のフラグメントを作成したところ、Lnp-FLAG および FLAG-atlastin は HA タグをつけた p57 の C 末膜貫通領域からなるフラグメントと共沈したが、HA タグをつけた p57 の N 末細胞質領域からなるフラグメントとは共沈しなかった。以上の結果から、p57 は C 末膜貫通領域を介して lunapark 及び atlastin と結合することが明らかになった。

p57 の three-way junction への局在化機構

p57 の N 末細胞質領域は 2 つの coiled-coil ドメインが存在する。p57 の three-way junction への局在における coiled-coil ドメインの寄与を調べるために、各 coiled-coil ドメインを欠失した p57 の変異体を作成し、U2OS 細胞にトランスフェクションして免疫染色で局在を検討した。2 番目の coiled-coil ドメインを欠失した p57 の変異体は three-way junction に局在したが、1 番目の coiled-coil ドメインを欠失した p57 の変異体は小胞体に一様に分布した。以上の結果から、p57 は 1 番目の coiled-coil ドメインを介して three-way junction へ局在することが明らかになった。

p57 による three-way junction の調節

U2OS 細胞に GFP-Sec61 β をトランスフェクションして小胞体ネットワークを可視化し、three-way junction の数を検討したところ、p57 を siRNA ノックダウンした細胞は、control siRNA をトランスフェクションした細胞に比べて、three-way junction の数を減少した。このことから、p57 は three-way junction の数を正に制御していることが明らかになった。

以上の結果を総合し、p57 は lunapark や atlastin とは異なる新しい three-way junction 局在分子であり、1 番目の coiled-coil ドメインを介して three-way junction へ局在し、lunapark や atlastin と協調して three-way junction を安定化することで、three-way junction の数を調節する重要な分子であると考えられた。

小胞体ネットワークの形成はこれまで膜変形タンパク質による小胞体膜変形という視点から重点的に研究が行われ、理解が進みつつある。他方、小胞体ネットワークの流動性には膜変形の

みならず、膜変形タンパク質の合成と分解が大きな寄与をしていると予想されるが、その分子メカニズムは全くの不明である。本研究の p120 による lunapark の自己ユビキチン化を介した分解制御は、膜変形タンパク質の量調節による小胞体ネットワークの流動性制御の一端を明らかにしたものであり、学術的に意義が大きいと考えている。また、これまで three-way junction に局在する分子として lunapark 及び atlastin が同定され、この 2 つの分子のみで three-way junction の動態を説明しようと試みられてきた。本研究の新規 three-way junction 局在分子 p57 の発見は、lunapark や atlastin とは異なる three-way junction の制御機構が存在することを示唆するものであり、three-way junction の動態制御の全容を理解する上で重要な知見である。小胞体ネットワークの破綻は遺伝性痙性対麻痺などの神経変性疾患を引き起こすことが知られている。本研究の p120 および p57 による小胞体ネットワーク調節機構の解析をさらに推し進めることで、このような神経変性疾患の発症機序の理解や治療薬の開発に繋がる可能性が考えられる。このように本研究の成果は学術的のみならず社会的にも意義が大きいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

The peroxisome biogenesis factors posttranslationally target reticulon homology domain-containing proteins to the endoplasmic reticulum membrane.

Scientific Reports, 8 巻, 2322 (2018) 査読有

DOI: 10.1038/s41598-018-20797-0.

Yamamoto, Y., Yurugi, C., and Sakisaka, T.

The number of the C-terminal transmembrane domains has the potency to specify subcellular localization of Sec22c.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 487 巻 2 号, 388-395 (2017) 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.071.

O'Hare, M., Shadmand, M., Sulaiman, R.S., Sishtla, K., Sakisaka, T., and Corson, T.W.

Kif14 overexpression accelerates murine retinoblastoma development.

Int. J. Cancer. 139 巻 8 号 1752-1758 (2016) 査読有

DOI: 10.1002/ijc.30221.

〔学会発表〕(計 6 件)

梶保 博昭、山本 泰憲、姜 山、匂坂 敏朗

小胞体の網目構造を調節する因子の多量体化機構

第 65 回 日本生化学会 近畿支部例会 2018 年

山本 泰憲、匂坂 敏朗

ペルオキシソーム形成因子による小胞体膜変形タンパク質 reticulon の翻訳後膜挿入機構

2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

梶保 博昭、山本 泰憲、匂坂 敏朗

ユビキチンリガーゼ活性による小胞体の新しい形態調節機構

2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

山本 泰憲、萬木 千聖、匂坂 敏朗

小胞輸送調節タンパク質 Sec22C は C 末膜貫通領域の数により細胞内局在を制御する

第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会 2017 年

内田 安則、山本 泰憲、出来 宏晃、匂坂 敏朗

小胞体膜タンパク質による極長鎖脂肪酸合成の制御

第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会 2017 年

梶保 博昭、姜 山、山本 泰憲、匂坂 敏朗

ユビキチンリガーゼによる小胞体の形態制御機構

第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 泰憲

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Yasunori)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30467659

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。