

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07311

研究課題名（和文）細胞質内分子流動に関わる内膜微小揺動の発生機序とその生理作用の解明

研究課題名（英文）Studies on structural fluctuation of the endoplasmic reticulum

研究代表者

和田 郁夫（WADA, IKUO）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体を示す微小な揺動について生細胞とsemipermeableな細胞を用いて高い時間分解能による定量的解析を行った。揺動は膜成分のATPあるいはNADPHを必要とする反応によって引き起こされ、これには小胞体膜の柔らかさが関係した。内腔での蛋白拡散は、溶液とは異なり広い範囲で変動しないが、微小な構造揺動も同様であり、CLIMP-63を介した微小管との結合による制御が適切な流動性を保持すると考えられた。揺動を起こす分子本体は同定できてないが、抗炎症薬ebselenが揺動を止めることが見つかった。Ebselenはperoxynitriteをトラップするので、本現象の発生との関連性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体では分泌蛋白の新生、脂質合成、異物代謝など多くの反応をおこなう。その内腔は数十nmの厚みからなる狭い空間で、高い混雑度を持つ。この構造が示す微小な構造揺動が反応自体を進める可能性について、本研究で調べた。得られた知見から、小胞体内では反応の基盤となるタンパク質の動きは温度依存性を示さないという特性を見出し、これには構造の細かな揺れが関連し、小胞体内反応で恒常性を保持する機構と考えられる。この動きは小胞体膜自体で発生するもので、エネルギーあるいは一電子還元によって生み出されていた。またこの研究過程で多くの先端的な技法を用いたが、これらが活用されて多くの共同研究成果も得られた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed microdynamics exhibited by the endoplasmic reticulum (ER) in living and semi-permeable cells. We found that the fluctuations were triggered by reactions requiring ATP or NADPH from membrane components, which were related to the softness of the ER membranes. While protein diffusion in the lumen is relatively constant over a wide range of temperature, unlike in solution, the microstructural fluctuation showed the same property. Since the motion was controlled by binding to microtubules via CLIMP-63, it is conceivable that it functions to maintain proper flow in the ER lumen. Interestingly, we found that anti-inflammatory, anti-oxidative reagent, ebselen, abolishes the micromotion of the ER. Given that ebselen traps peroxynitrite, the NADPH driven micromotion may involve related reactions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 構造揺動 拡散 微小管

### 1. 研究開始当初の背景

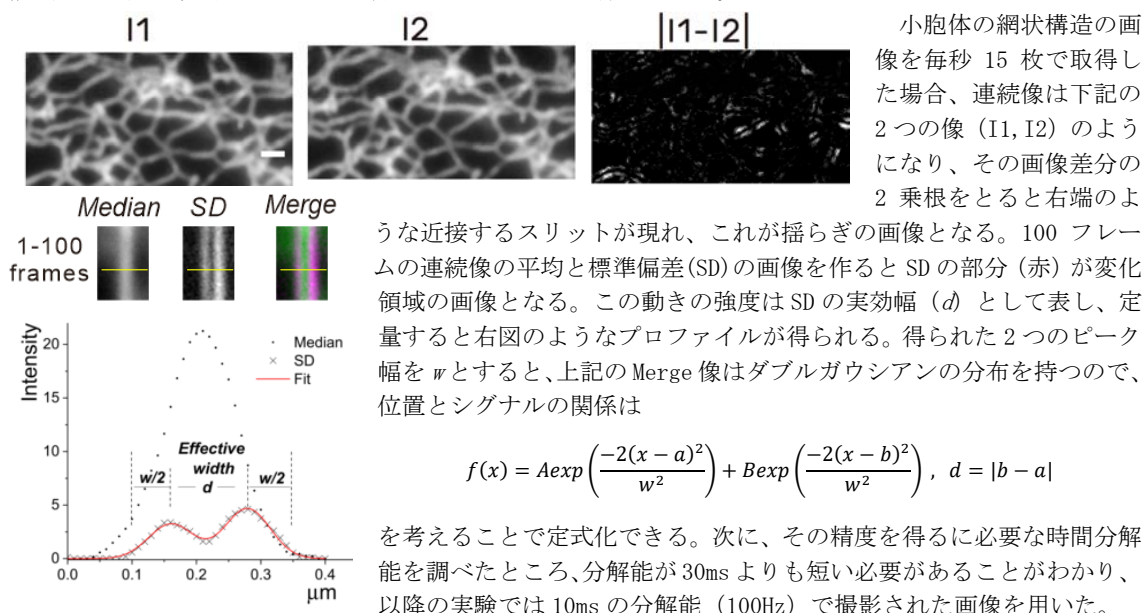
後生動物の細胞内では飽和に近い高濃度で溶けこむタンパクなどの溶質成分がもたらす粘性によって、高分子の熱運動は妨げられるはずである。ところがこれらの細胞質での拡散係数は溶液の~1/3程度であり、これは、分泌系で機能するタンパクを形成するための空間である小胞体内腔においても同程度である[1]。一方、熱運動以外の力が関わるとする報告もある。しかしこれらがほんとうに細胞質での crowding に抗して分子の流動性増大を介して反応推進を進める力なのか、また分子機構など詳細は明らかでなかった。我々は哺乳類細胞の小胞体を高い時空間分解能で観察すると、それまでは知られていなかった微小な揺らぎが発生している事を見出し、第 22 回バイオイメージング学会（2013 年、東京）シンポジウム「MICRODYNAMICS ANALYSIS OF CELLULAR STRUCTURES BY STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY (SIM)」、第 66 回日本細胞生物学会シンポジウム（2014 年、奈良）「細胞内反応に関わる微小揺動の定量的イメージングによる解析」において発表していた。

### 2. 研究の目的

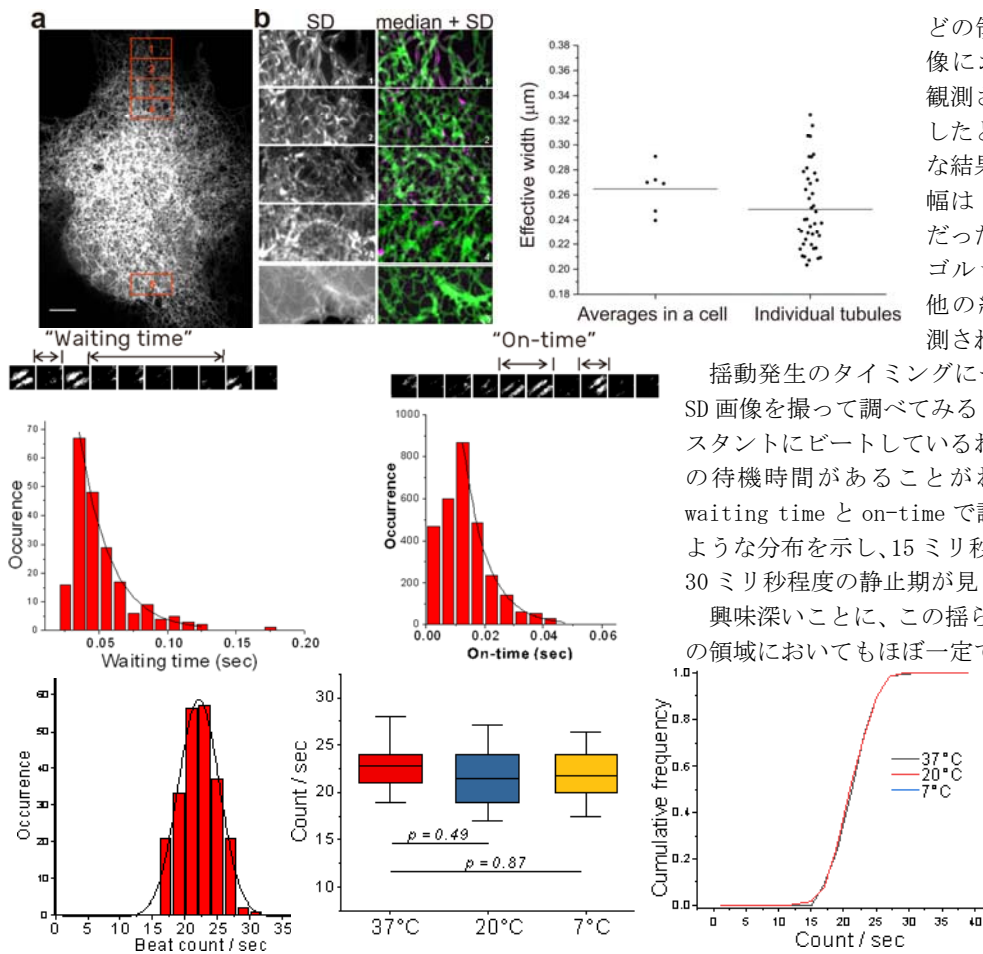
小胞体は広大な容積を持つオルガネラで分泌蛋白の新生、脂質合成、異物代謝など多くの必須の反応をおこなう。その内腔は数十 nm の厚みからなる狭い空間で、分泌が盛んな細胞では様々な大きさの未成熟蛋白に満たされている。これらの解消には長年研究を行ってきた分子シャペロン類がそこでの恒常性のために機能することは我々を含めて多くの研究が示してきた。しかしそこでの適切な反応場の形成に微小な構造揺動が関連する可能性があり、本研究で検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法及び成果

画像解析には COS7 細胞に Sec61b-SGFP2 を一過性に発現したものを用い、撮影時の培地はリボフラビンとピリドキサルリン酸を含まない DMEM[2]を用いた。高速画像の取得に、光源として 100 mW 488 nm 半導体レーザーからの励起光を diffuser でスクランブルしたものを用い、3.75 倍のリレーレンズを介して 100 倍 (NA1.49) 油浸対物レンズで取得された wide field 像を用いた。



次に細胞全域における揺らぎの定量を次に行った。ネットワーク構造が密な中心部を除いて記録を行い、その一つの例を示す。



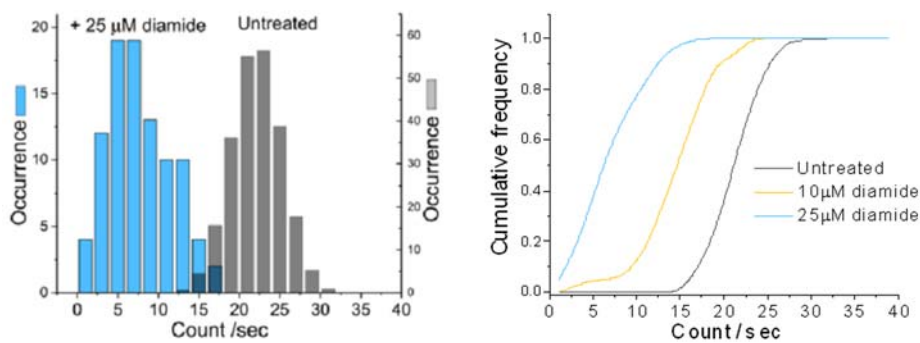
どの領域においても SD 像においてスリットが観測され、実効幅を測定したところ、左図のような結果が得られて、実効幅は  $0.248 \pm 0.016 \mu\text{m}$  だった。なおこの揺動はゴルジ体や微小管など他の細胞内構造では観測されなかった。

揺動発生のタイミングについて frame 毎に SD 画像を撮って調べてみると、同じ領域がコンスタントにビートしているわけではなく、一定の待機時間があることがわかった。これを waiting time と on-time で調べた場合、左図のような分布を示し、15 ミリ秒程度変位した後に 30 ミリ秒程度の静止期が見られた。

興味深いことに、この揺らぎの発生頻度はどの領域においてもほぼ一定であり (左図)、生理的温度においても有意な変化はなく一定であることが明らかになった。この頻度は多くの培養細胞でほぼ同値だった。

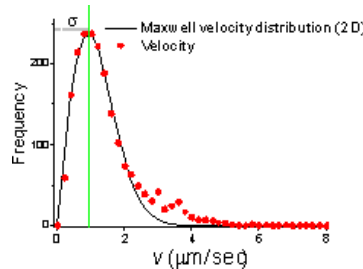
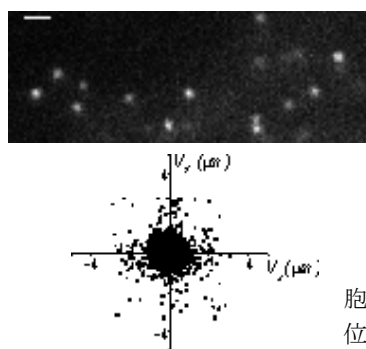
次にこの生理

的作用を知るために、動きを停止させる条件について検討した。Diamide (tetramethylazodicarboxamide)

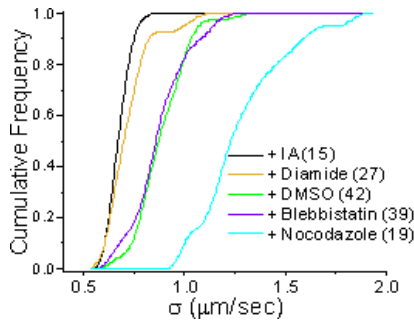


は膜透過性でチオール基の酸化を起こす。細胞培地に diamide を添加した場合、この動きは急速に低下することが上図のように観測された。

なお、このような手法ではシグナルの s/n が低い場合には定量が困難になる。このために小胞体内腔にトラップされる conditional な凝集体 (右図) を作成した。これは自己集合する FKBP 変異体 [3]4 量体に蛍光蛋白と小胞体内腔へのシグナル配列、また KDEL 小胞体滞留シグナルが融合されたもので、小胞体内腔では中央下図のような凝集体を作る。生細胞でのこれらの輝点の位置をプロットすると右図のような変異を示した。



小胞体内腔では中央下図のような凝集体を作る。生細胞でのこれらの輝点の位置をプロットすると右図のような変異を示した。

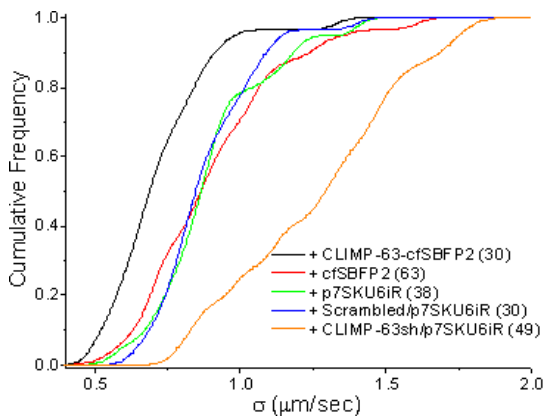


これは小胞体の揺動を反映しているはずなので、これの定量を各点が示す速度( $v$ )分布を求めると左図のようになり、Maxwell の2次元速度分布の式

$$P(v) = A v \exp\left(\frac{-v^2}{2\sigma^2}\right)$$

で表すことができる。 $\sigma$ の自乗が速度分散となり、この分布から速度を $\sigma$ として求める事ができるので、累積確率を右図に示した。また細胞を diamide (200  $\mu$ M) や、同じくチオール基の修飾をもたらすヨードアセタミド(IA, 1mM)で処理すると揺動はフロアノイズのレベルに低下した。

一方、アクチン線維の形成を阻害する blebbistatin 処理 (50  $\mu$ M) は有意な影響をおこさなかった。これに対して微小管の重合を阻害する nocodazole (10 $\mu$ M) では微小管の消失に伴い速度分布の大きな昂進が認められた。

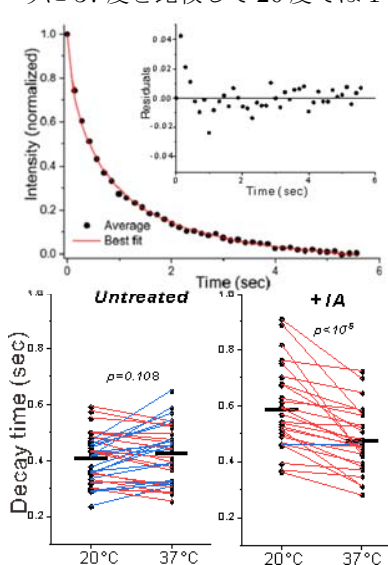


小胞体と微小管との結合成分の一つがII型膜蛋白である CLIMP-63 なので、この結合の増大に伴う影響について調べたところ、蛍光マーカーcfSBFP2 との融合蛋白を一過性に発現した細胞(下図、黒)においては、コントロール(赤)に比べて大幅な $\sigma$ の低下、すなわち揺動停止が認められた。逆に、CLIMP63のshRNAベクター、CLIMP-63sh/p7SKU6iRを発現した細胞においては、nocodazole 処理と同様に $\sigma$ 値の大幅な上昇が見られた。このような結果から、小胞体のネットワーク構造がもつ微小な揺動は、CLIMP-63を介した制御を受け一定の強度を持つと推測された。

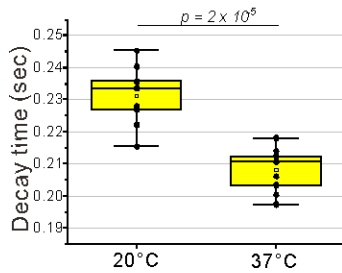
次にこの動きの細胞内反応への影響について、蛋白の単純拡散への影響について調べた。このため光活性化する蛍光蛋白 cfPAS-E を PA-GFP を元に cfSGFP2 から作成し小胞体内に発現して、FDAP により調べた。減衰時間は拡散方程式の解[4]を用いて

$$F(t) = 1 - \exp\left(-\frac{2\tau_D}{t}\right)\left[I_0\left(-\frac{2\tau_D}{t}\right) + I_1\left(-\frac{2\tau_D}{t}\right)\right]$$

の式とのフィッティングにより求めた(下左図)。なお、 $F(t)$ は $t$ 時間後の蛍光輝度、 $\tau_D$ は拡散時間、 $I_0$ と $I_1$ は修正ベッセル関数。小胞体のネットワーク構造はIA処理でも保持される。まず溶液(40%グリセロール)における単純拡散について光活性化後の蛍光分子の拡散による減衰時間を測定したところ、下右図のように37度と比較して20度では1割程度の増加が見られた。



#### cfPAS in vitro



そこで、生細胞での小胞体内の単純拡散についてFDAPで20度と37度で測定を行った。この場合、細胞毎のばらつきを抑えるために、同じ細胞で温度を変化して減衰時間を測定した。この場合には溶液とは異なり、左図のように、温度を変化させても拡散に差は見られなかった。これに対して、IA処理を行った細胞では、

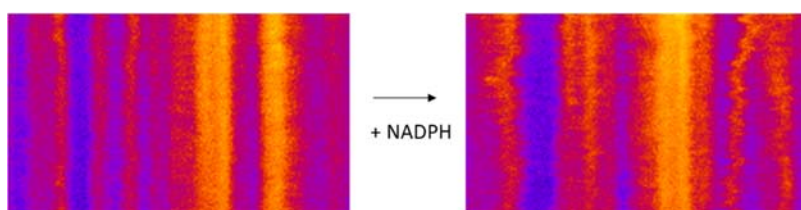
37度では減衰時間が減少し、平均では1割程度の変化が見られ、溶液と同じように拡散が起きていた。

この知見は小胞体内腔での蛋白質拡散はブラウン運動以外の要素により促進され、生体が晒される温度においてほぼ一定を保つような仕組みがあることが示唆され、それには構造微小揺動がその要因である可能性が考えられる(なおCLIMP-63の過剰発現によっても揺動は停止できるが、構造が著しく変形しおそらく容積が大きく変

わるため、上記のような計測はおこなっていない)。そこで揺動を起こす機構について以下に検討を行った。このために Sec61b-SGFP2 を発現する semipermeable な COS7 細胞において必要因子を調べた。条件検討の結果、細胞質バッファー中[5]でジギトニン 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加した場合、数分で小胞体ネットワーク構造をおおむね保持したまま細胞質蛋白は除かれることがわかった。この場合に構造揺動は全く起きないが、必須因子を調べることでほぼ再構成された。その条件について調べたところ、下記の要件が明らかになった。

1. 構造保持のためには GTP が必要だが、これでは構造揺動は起こさない
2. ATP あるいは UTP の添加により揺動が直ちに開始される
3. 2 以外にも NADPH にも同様の揺動作用があり、この作用は NADH や NADP<sup>+</sup>、あるいはグルタチオンなど他の電子授与に関わる関連化合物ではみられない
4. 細胞質成分及び小胞体内腔の成分は揺動に必要とされない
5. 小胞体膜に対する多価の抗体が細胞質側から結合した場合には、この揺動は停止する

下記には NADPH 添加による semipermeable 細胞の揺動の再構成結果をキモグラフで示す。



このような研究の結果、小胞体の微小揺動は膜成分の ATP あるいは NADPH を必要とする反応によって引き起こされ、この動きは小胞体膜の柔らかさが関係していることも示された。これは

CLIMP-63 を介した微小管との結合によって制御されて小胞体が一定の頻度で動きを保ち、低い温度でも蛋白質拡散を 37 度と同程度に保持する特性に貢献していると考えられる。本研究では、さらにこれらの知見に基づいて、ATP あるいは NADPH を補酵素として用いる小胞体酵素について網羅的な発現抑制の検討を siRNA を用いて行ったが、揺動を明確に抑えるものは同定されていない。またこれらの反応阻害剤について網羅的に調べたところ、抗炎症薬、抗酸化薬として用いられている ebselen が  $\mu\text{M}$  レベルで揺動を止めることが見つかった。Ebselen は peroxynitrite をトラップする事が知られており、本現象の発生との関係が示唆される。これらのような研究をさらに進めて、小胞体という微小空間での反応の安定な進行を確保するための仕組みと意味に関するより正確な理解につながる事が期待される。

#### 引用文献

1. Dix, J. A. & Verkman, A. S. (2008) Crowding effects on diffusion in solutions and cells, *Annu Rev Biophys.* **37**, 247-63.
2. Nagaya, H., Tamura, T., Higa-Nishiyama, A., Ohashi, K., Takeuchi, M., Hashimoto, H., Hatsuzawa, K., Kinjo, M., Okada, T. & Wada, I. (2008) Regulated motion of glycoproteins revealed by direct visualization of a single cargo in the endoplasmic reticulum, *The Journal of cell biology.* **180**, 129-43.
3. Rollins, C. T., Rivera, V. M., Woolfson, D. N., Keenan, T., Hatada, M., Adams, S. E., Andrade, L. J., Yaeger, D., van Schravendijk, M. R., Holt, D. A., Gilman, M. & Clackson, T. (2000) A ligand-reversible dimerization system for controlling protein-protein interactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **97**, 7096-101.
4. Soumpasis, D. M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments, *Biophysical journal.* **41**, 95-7.
5. Dickens, J. A., Ordonez, A., Chambers, J. E., Beckett, A. J., Patel, V., Malzer, E., Dominicus, C. S., Bradley, J., Peden, A. A., Prior, I. A., Lomas, D. A. & Marciniak, S. J. (2016) The endoplasmic reticulum remains functionally connected by vesicular transport after its fragmentation in cells expressing Z-alpha1-antitrypsin, *FASEB J.* **30**, 4083-4097.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuto Matsui, Yukihiro Hirata, Ikuo Wada, Nobuko Hosokawa	4. 巻 45
2. 論文標題 Visualization of Procollagen Iv Reveals Er-to-Golgi Transport by Ergic-Independent Carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Struct Funct	6. 最初と最後の頁 107, 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20025	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 -
1. 著者名 Naokazu Inoue, Takako Saito, Ikuo Wada	4. 巻 147
2. 論文標題 Unveiling a novel function of CD9 in surface compartmentalization of oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev189985.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.189985	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 -
1. 著者名 Hanafusa K, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 294
2. 論文標題 SDF2-like protein 1 (SDF2L1) regulates the endoplasmic reticulum localization and chaperone activity of ERdj3 protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 19335-19348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009603	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 Omae Y, Ito S, Takeuchi M, Isa K, Ogasawara K, Kawabata K, Oda A, Kaito S, Tsuneyama H, Uchikawa M, Wada I, Ohto H, Tokunaga K	4. 巻 59
2. 論文標題 Integrative genome analysis identified the KANNO blood group antigen as prion protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 2429-2435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15319	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 Tanabe Yuuki, Arai Seisuke, Wada Ikuo, Adachi Hiroyuki, Kamakura Takashi, Yoda Koji, Noda Yoichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Svp26 facilitates ER exit of mannosyltransferases Mnt2 and Mnt3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gen Appl Microbiol	6. 最初と最後の頁 180-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2018.09.001	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 Sakurai C, Itakura M, Kinoshita D, Arai S, Hashimoto H, Wada I, Hatsuzawa K	4. 巻 29
2. 論文標題 Phosphorylation of SNAP-23 at Ser95 causes a structural alteration and negatively regulates Fc receptor-mediated phagosome formation and maturation in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell	6. 最初と最後の頁 1753-1762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E17-08-0523	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 -

1. 著者名 Inoue N, Wada I	4. 巻 17
2. 論文標題 Monitoring dimeric status of IZUMO1 during the acrosome reaction in living spermatozoon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 1279-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2018.1489181	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 -

1. 著者名 Yu S, Ito S, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 293
2. 論文標題 ER-resident protein 46 (ERp46) triggers the mannose-trimming activity of ER degradation-enhancing -mannosidase-like protein 3 (EDEM3)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 10663-10674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003129	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 -

1. 著者名 Fujimori T, Suno R, Iemura SI, Natsume T, Wada I, Hosokawa N	4. 巻 8
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to cells	6. 最初と最後の頁 684-698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12506	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kuiper Bastiaan Pepijn, Hanafusa Ken, Hosokawa Nobuko, Wada Ikuo
2. 発表標題 Photon counting multiple histograms (PCMH) analysis of the ERdj3-SDF2L1 complex
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 貴子, 和田 郁夫, 井上 直和
2. 発表標題 Izumoi遺伝子の選択的スプライシングによってマウスの配偶子融合は保証される
3. 学会等名 日本動物学会 第90回
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noda Y, Arai S, Wada I, Yoda K
2. 発表標題 Efficient ER Exit of Mnn4 Is Dependent on Both Svp26 and Mnn6 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
3. 学会等名 International conference on yeast genetics and molecular biology (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Takako Saito, Ikuo Wada and Naokazu Inoue
2. 発表標題 Sperm IZUM01 dependent gamete fusion influences male fertility in mice
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田幸大、松井優人、和田郁夫、細川暢子
2. 発表標題 ライブイメージング法を用いたIII型コラーゲン細胞内輸送メカニズムの解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takako Saito, Ikuo Wada and Naokazu Inoue
2. 発表標題 Sperm IZUM01 dependent gamete fusion influences male fertility in mice
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noda Y, Arai S, Wada I, Yoda K
2. 発表標題 Efficient ER Exit of Mnn4 Is Dependent on Both Svp26 and Mnn6 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 International conference on yeast genetics and molecular biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒井斉祐、鈴木貴久、和田郁夫
2. 発表標題 Live-cell imaging of antitrypsin Z-variant polymer inclusion
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細川暢子、Yu Shangyu、和田郁夫
2. 発表標題 Erp46によるEDEM3マンノーストリミング活性の制御機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒井斉祐、橋本仁志、和田郁夫
2. 発表標題 小胞体膜の微小揺動に関する研究
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村 浩二, 久我 一弘, 岩瀬 駿志, 和田 郁夫, 清水 英寿, 地阪 光生, 横田 一成, 中川 強
2. 発表標題 Improvement of fluorescence proteins suitable for live-cell imaging in the oxidative environment in plant cells
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細川暢子、和田郁夫
2. 発表標題 SEL1Lタンパク質による小胞体関連分解の調節機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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