

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0015

研究課題名(和文)オルガネラ間脂質交換輸送の再構成

研究課題名(英文)In vitro reconstitution of lipid countertransport

研究代表者

中津 史(Nakatsu, Fubito)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50360607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：オルガネラや細胞膜は、小胞体に近接して「膜接触部位」を形成する。膜接触部位では、脂質輸送タンパク質群を介して脂質が輸送されていることがわかりつつあるが、その制御機構には不明な点が多い。本研究では、構成的手法により脂質輸送タンパク質による脂質輸送を試験管内で再構成することで、その定量的な理解を目指した。人工脂質二重膜(リボソーム)と精製タンパク質を混合し、リボソーム間の脂質輸送を定量評価する系を確立した。一連の解析から、オキシステロール結合タンパク質群によるイノシトールリン脂質PI4Pとホスファチジルセリンの交換輸送のキネティクスが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜接触部位を介した脂質輸送制御機構の解析において、細胞を用いた解析では様々な要素が複雑に関与するため、個々の脂質輸送タンパク質による脂質輸送の定量的なキネティクス解析は容易ではない。本研究では、試験管内における脂質交換輸送を再構成することで、そのキネティクスが明らかになった。これは、オキシステロール結合タンパク質群による細胞生理機能の解明に大きく貢献すると期待される。また、本研究で樹立した解析系は小分子スクリーニングに応用可能であり、種々の疾患やウイルス性感染症に関与することが知られている脂質輸送タンパク質群の阻害剤開発等に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum forms membrane contact sites (MCSs) with other organelles or the plasma membrane. At the MCSs, lipid transfer proteins (LTPs) mediate transport of lipids between membranes. However, the underlying mechanism is incompletely understood. The goal of this study was to investigate the LTP-mediated lipid transport quantitatively by taking advantage of the in vitro lipid transfer reactions between liposomes. We established the lipid transfer assay system, in which the rate of lipid transfer can be quantitatively evaluated in vitro. A series of in vitro lipid transfer experiments revealed the kinetics of lipid transport between liposomes by oxysterol-binding proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質交換輸送 イノシトールリン脂質 膜接触部位

1. 研究開始当初の背景

細胞内には、独自の機能を持った細胞小器官が独立して存在する。これまで、細胞小器官同士は積極的に相互作用するとは考えられていなかった。しかし近年になり、細胞小器官は、互いに近接・接触することで物質や情報を交換しながら細胞機能を維持していることがわかってきた。オルガネラ膜同士が接触する部位は、“オルガネラ膜接触部位”と呼ばれ、2つの膜がわずか10-30nmの距離で近接している(図1左)。中でも小胞体は、細胞内全体に広く分布することで、ほとんどのオルガネラ膜や細胞膜と膜接触部位を形成していることがわかってきた。

膜接触部位では、脂質の交換輸送が行われていることがわかってきた。申請者は、小胞体と細胞膜の間で、2種類の異なる脂質(ホスファチジルセリンとイノ

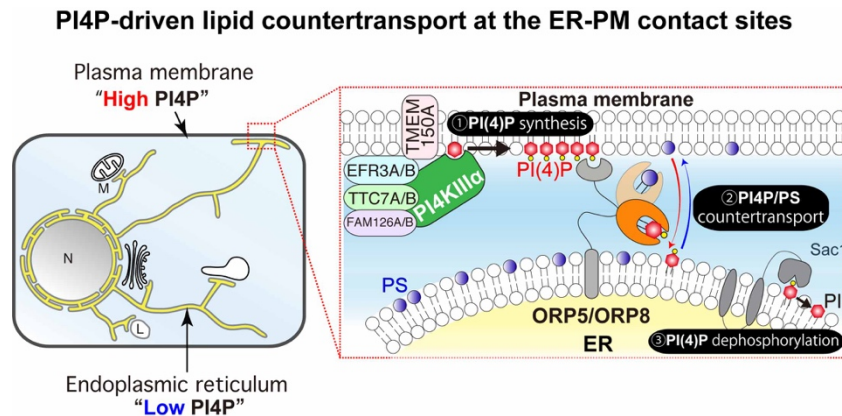


図1

シトールリン脂質 PI4P) が交換輸送される仕組みを見いだした(図1右)(Chung et al., 2015)。これは、オキシステロール結合タンパク質ファミリーの ORP5 および ORP8 が、小胞体膜と細胞膜が近接する“小胞体—細胞膜接触部位”で制御するオルガネラ間脂質交換輸送である。ORP5/8 は、①細胞膜上で PI4P を引き抜き自身の脂質結合ポケットに囲い込み、②それを小胞体へ輸送した後、③今度は小胞体で合成されたホスファチジルセリンを受け取り、④それを細胞膜へ逆輸送していたのである。PI4P は細胞膜に豊富に存在し、小胞体で壊される(Sac1により脱リン酸化される)ことから、細胞膜と小胞体膜間には PI4P の濃度勾配が存在する。ORP5/8 は、この PI4P の濃度勾配を利用することで、ホスファチジルセリンを小胞体から細胞膜へと対向輸送しているのである。

2. 研究の目的

オキシステロール結合タンパク質ファミリーは、酵母からヒトまで高度に保存されており、ヒトでは12種類存在する。本研究開始当初の段階で、脂質交換輸送の制御機構に関する知見は、限定的であった。これら脂質交換輸送タンパク質による脂質輸送が担う細胞生理機能の解明には、個々の脂質輸送タンパク質による脂質輸送の定量的な解析が必須である。しかしながら、細胞を用いた解析では、細胞生理機能の解明に繋がる大きな利点がある一方で、ファミリー分子もしくは類似機能分子群による代償機能や、副次的に起こる複雑な代謝制御などの様々な影響から、その解析は容易ではない。これらの問題を回避するためには、脂質輸送を可能な限り単純化した実験系を用いて解析する必要がある。そこで本研究では、膜接触部位で機能する脂質交換輸送タンパク質であるオキシステロール結合タンパク質ファミリーに着目し、その脂質輸送を構成的手法により *in vitro* で再構成することで、その詳細な分子メカニズムの解明および定量的な理解を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

前述のように、細胞内での脂質輸送解析は、様々な要因が複雑に絡み、単純化することは極めて難しい。そこで本研究では、人工脂質二重膜(リポソーム)を用いて疑似生体膜を調整し、精製した脂質輸送タンパク質と混合することで、リポソーム間の脂質輸送を再構成して解析を行った。

(1) リポソームの調整

先行研究において確立したプロトコルに準じてリポソームを調整した(Chung et al., 2015)。ガラス試験管に必要量の脂質をクロロホルムにより溶解させ、窒素ガスを噴射して溶媒を揮発させた。減圧装置を用いて完全に溶媒を揮発させたのち、適量のバッファーを加えボルテックスにより脂質を懸濁した。凍結融解処理を行ったのち、mini-extruderを用いてそれぞれの解析に適したポアサイズのフィルターを通すことで、均一の径のリポソームを調整した。

(2) 脂質輸送タンパク質および脂質結合ドメインタンパク質の精製

脂質輸送タンパク質および脂質結合ドメインタンパク質を、プロテアーゼ切断部位有する GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21 に発現させ、精製した。プロテアーゼ消化により GST タグを切断したのち、Superose 6 ゲル濾過カラムを用いて単量体の精製タンパク質を調整した。ニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)付加した脂質結合タンパク質についても同様に、NBD付加反応後に再度ゲル濾過カラムを通してタンパク質を精製した。

(3) 脂質抽出および脂質定量法

遠心分離により分取したリポソームに含まれる脂質の定量解析は、リポソームから脂質を抽出し、それをイオンクロマトグラフィーにより定量した。リポソームをクロロホルム・塩酸・メタノールを含むバッファーで抽出し、窒素ガスにより乾燥させた。次いで脱アシル化処理を行い、グリセリン脂質頭部を DW に可溶化して、これをイオンクロマトグラフィーにより定量した。

(4) プレートリーダーを用いた脂質定量法

蛍光色素を付加した脂質結合タンパク質による解析は、蛍光プレートリーダーを用いて定量した。リポソームと NBD 付加した脂質輸送タンパク質を混合して一定時間反応を行ったのち、これをプレートリーダーを用いて NBD 蛍光値の測定を行った。

4. 研究成果

本研究では、リポソーム間での脂質輸送反応のうち、遠心分離により 2 つのリポソームを分取後にイオンクロマトグラフィーを用いて測定する方法と、リポソームを分取せずに蛍光プレートリーダーを用いる測定の方法、2 つの方法により脂質輸送を解析した (図 2)。

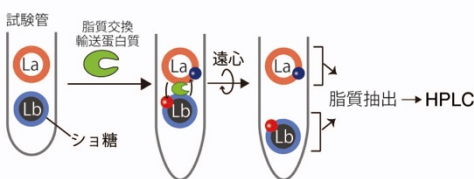
遠心分離を用いた方法では、一方のリポソームにシヨ糖を含ませることで、比重の違いにより 2 つのリポソームを分取した (図 2B)。この方法を用いて ORP8 による PI4P とホスファチジルセリンの脂質交換輸送を測定したところ、ORP8 は PC のみからなるアクセプター・リポソームへの PI4P 輸送活性は低かったが、ホスファチジルセリン含有アクセプターリポソームへの PI4P 輸送活性は顕著に増加しており、脂質交換輸送が測定可能な定量解析系が樹立できた。そこで、脂質交換輸送機能が不明であるオキシステロール結合タンパク質ファミリーの ORP10 について、その脂質交換輸送活性の測定を試みた。ORP10 がどのような脂質をリガンドとするのかについても不明であることから、まず ORP10 のリガンドとなる脂質種の特定制を行った。ORP10 の脂質輸送ドメインを動物細胞に発現させ、タグ抗体を用いてアフィニティ精製を行った。そしてこの精製タンパク質を質量分析により解析したところ、イノシトールリン脂質 PI4P が濃縮されていることが判明した。もう一方の基質については、ホスファチジルセリンが基質となりうることが報告されている (Maeda et al., 2013)。そこで ORP10 の脂質交換輸送は、PI4P とホスファチジルセリンを用いることとした。PC のみを含有するアクセプターリポソームへの PI4P の輸送は 0.02A.U.であったのに対し、ホスファチジルセリン含有アクセプターリポソームへの PI4P 輸送は 0.19A.U.であった。同様に、PC のみを含有するアクセプターリポソームへの PS の輸送活性は 0.008A.U.であったのに対し、PI4P を含有するアクセプターリポソームへの輸送活性は 0.008A.U.であった。このことから、ORP10 は PI4P と PS の交換輸送活性を有することが示唆された。

上記の方法は、輸送される脂質を直接定量できる点で極めて優れているが、解析に時間を要する上に安定してリポソームを分取する高度な技術が要求されるため、汎用性に乏しい。そこで次に、プレートリーダーを用いて簡便に測定が可能な解析方法を試みた。この測定の原理を図 2C に示す。この測定では、脂質の輸送を、脂質結合タンパク質により検出する。PI4P もしくはホスファチジルセリンに結合するタンパク質である FAPP1-PH ドメインおよび Lactadherin-C2 (Lact-C2) ドメインに NBD を付加し、これらの脂質リポーターが発する蛍光を指標に輸送を評価する。NBD は、環境応答性蛍光特性を持っており、極性環境下では蛍光は低いが、疎水性環境下では強い蛍光を発する。つまり、NBD ラベル化した脂質レポーターは、水溶液中では極めて弱い蛍光しか発さないが、リポソームに結合した時には強い蛍光を発することとなる (図 2C)。また、ドナーリポソーム (Ld) には、ローダミン標識したホスファチジルエタノールアミンを含有させておき、ドナーリポソーム上での NBD 蛍光はローダミンにより消光される。したがって、輸送された脂質のみを特異的に検出可能となる (図 2C)。実際、適量の脂質レポーター-FAPP1-PH-NBD を PC のみからなるリポソームと、PI4P を含有するリポソームと混合し NBD 蛍光値を測定したところ、PC のみからなるリポソームに比して PI4P を含有するリポソームでは蛍光値が 12 倍以上増加した。このことから、NBD 付加脂質レポーターを用いた測定が可能となる解析系が樹立できた。そこで

A リポソームを用いた脂質交換輸送反応



B 遠心分離により分取する測定方法



C 蛍光脂質レポーターを用いた測定方法

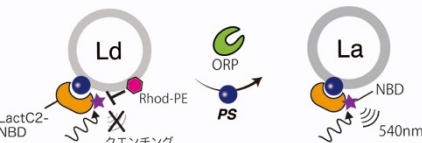


図 2

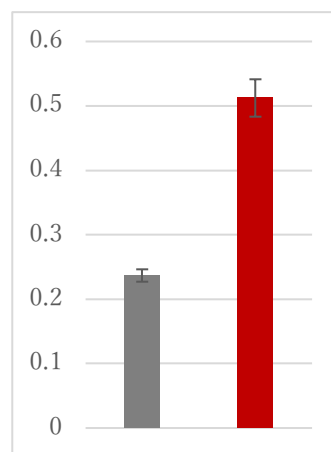


図 3 : ORP8 による脂質輸送
灰色は PC のみからなるリポソーム、赤色はホスファチジルセリン含有リポソームを、それぞれアクセプターリポソームとした時のデータ。

そこで

まず、ORP8によるPI4Pとホスファチジルセリンの交換輸送の測定を行った。ORP8の脂質輸送ドメインをドナーリポソームおよびアクセプターリポソームと混合し、20分後のNBD蛍光値を測定した。PI4P輸送活性は、PCのみからなるアクセプターリポソームを用いた場合は0.24A.Uであったのに対し、PS含有するアクセプターリポソームでは0.51A.Uであった(図3)。また、PS輸送活性は、PCのみからなるアクセプターリポソームを用いた場合は0.31A.Uであったのに対し、PI4P含有するアクセプターリポソームでは0.45A.Uであった。これらのことから、ORP8によるPI4P/PS脂質交換輸送活性をプレートリーダーを用いて評価可能であることが判明した。次に、ORP10によるPI4Pとホスファチジルセリンの脂質交換輸送を測定した。PI4P輸送活性は、PCのみからなるアクセプターリポソームを用いた場合は0.06A.Uであったのに対し、ホスファチジルセリン含有するアクセプターリポソームでは0.31A.Uであった(図4)。また、ホスファチジルセリン輸送活性は、PCのみからなるアクセプターリポソームを用いた場合は0.12A.Uであったのに対し、PI4P含有するアクセプターリポソームでは0.28A.Uであった。このことから、ORP10は確かにPI4Pとホスファチジルセリンの脂質交換輸送活性を有していることが判明した。

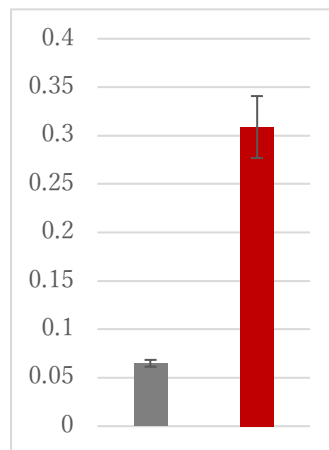


図4: ORP10による脂質輸送。灰色はPCのみからなるリポソーム、赤色はホスファチジルセリン含有リポソームを、それぞれアクセプターリポソームとした時のデータ。

参考文献

- Chung, J., F. Torta, K. Masai, L. Lucast, H. Czaplá, L.B. Tanner, P. Narayanaswamy, M.R. Wenk, F. Nakatsu, and P. De Camilli. 2015. INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*. 349:428–432. doi:10.1126/science.aab1370.
- Maeda, K., K. Anand, A. Chiapparino, A. Kumar, M. Poletto, M. Kaksonen, and A.-C. Gavin. 2013. Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature*. doi:10.1038/nature12430.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中津 史	4. 巻 269
2. 論文標題 オキシステロール結合蛋白質ファミリーによる細胞内脂質輸送制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 0037-1141
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 Sawada Shunsuke, Nakamura Akinobu, Yoshii Tatsuyuki, Kuwata Keiko, Nakatsu Fubito, Tsukiji Shinya	4. 巻 56
2. 論文標題 Protein-recruiting synthetic molecules targeting the Golgi surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 15422 ~ 15425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0cc06908f	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15件（うち招待講演 11件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクトの機能と制御
3. 学会等名 2019年生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Membrane contact sites: zones for lipid countertransport
3. 学会等名 SFB1190 Minisymposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Countertransport of lipids at membrane contact sites
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河崎 麻実、酒井 晶子、荒川 聡子、中西 広樹、佐々木 雄彦、清水 重臣、五十嵐 道弘、中津 史
2. 発表標題 新規・小胞体-エンドソーム膜接触部位における脂質交換輸送機構とその生理機能の解明
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河崎 麻実、酒井 晶子、荒川 聡子、中西 広樹、佐々木 雄彦、清水 重臣、五十嵐 道弘、中津 史
2. 発表標題 膜接触部位での脂質交換輸送機構と生理機能の解明
3. 学会等名 第60回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Countertransport of Lipids at Membrane Contact Sites and Its Role in Membrane Trafficking
3. 学会等名 Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asami Kawasaki, Akiko Sakai, Satoko Arakawa, Hiroki Nakanishi, Takehiko Sasaki, Shigeomi Shimizu, Michihiro Igarashi & Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Countertransport of Lipids at Membrane Contact Sites and Its Role in Membrane Trafficking
3. 学会等名 Gordon Research Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 1. イノシトールリン脂質・PI(4)P の新しい生理機能: 膜接触部位形成と脂質交換輸送制御
3. 学会等名 2018年生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送とその生理機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質によるメンブレンコンタクト形成と脂質 交換輸送制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 膜接触部位を介した脂質交換輸送による細胞内脂質クオリティ・ホメオスタシス制御
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質・PI4Pによる細胞機能制御
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質・PI4Pが駆動する脂質対向輸送システム
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学会プレシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fubito Nakatsu
2. 発表標題 Phosphoinositide-driven lipid countertransport at membrane contacts
3. 学会等名 第72回細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質が駆動する脂質交換輸送システム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
研究分担者	三間 穰治 (Mima Joji) (30335301)	大阪大学・蛋白質研究所・准教授 (14401)	

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
---------	---------