

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05947

研究課題名（和文）成長円錐の膜動態を支えるイノシトールリン脂質制御分子群の統合的機能解析

研究課題名（英文）Orchestration of growth cone membrane dynamics by phosphoinositides

研究代表者

河崎 麻実（Kawasaki, Asami）

新潟大学・医歯学系・特任講師

研究者番号：10609358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、脂質合成の場である小胞体が、細胞膜や他のオルガネラに近接して“膜接触部位”と呼ばれる領域を形成し、そこが脂質輸送の場となっていることが分かってきました。しかし、この膜接触部位を介した脂質制御の生理機能はほとんど明らかになっていません。本研究では、脂質を制御するオキシステロール結合タンパク質（ORP）ファミリーのうち機能未知であったORP10に関して、小胞体-エンドソーム膜接触部位において脂質交換輸送分子として機能し、エンドソームからゴルジ体への膜輸送を制御することが判明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最も重要な意義は、「膜接触部位における脂質交換輸送の生理的意義の一つが解明されたこと」です。膜接触部位は古くから知られる構造ですが、その役割は長年の謎でした。近年になり、脂質輸送の場であることが判明しつつありますが、では脂質輸送が起こることでのどのような生命現象が制御されているのか、という最も重要な点が依然大きな謎のまま未解決でした。本研究により、膜接触部位における脂質交換輸送は“特定のオルガネラの脂質組成を局所的に変化”させることで“生体膜の分裂や輸送を制御する”ことが明らかになりました。

研究成果の概要（英文）：Membrane contact sites (MCSs) serve as a zone for nonvesicular lipid transport by oxysterol-binding protein (OSBP)-related proteins (ORPs). ORPs mediate lipid countertransport, in which two distinct lipids are transported counterdirectionally. However, its functional contribution to cell physiology remains elusive. In this study, we report that lipid countertransport by ORP10 at ER-endosome MCSs regulates retrograde membrane trafficking.

研究分野：神経科学

キーワード：成長円錐

1. 研究開始当初の背景

成長円錐とは、神経軸索先端に形成される運動性の高い構造体で、成長因子などを含む様々な細胞外シグナルに応答し、細胞膜伸展と細胞骨格形成を繰り返すことで軸索を伸ばす役割を担う。その作動メカニズムに関しては、これまでの多くの研究から徐々に明らかになりつつあるものの、膜進展を制御する膜脂質制御機構の詳細は未だ解明されていない。これまでに研究代表者は成長円錐のリン酸化プロテオミクス解析を実施し、メンブレンコンタクトを介した脂質交換輸送に関与するイノシトールリン脂質制御分子群の多くがリン酸化されていることに着目した(Kawasaki et al., 2018)。

2. 研究の目的

研究代表者らの研究グループは、細胞膜 PI4P がオキシステロール結合タンパク質ファミリー分子を介してメンブレンコンタクトの形成および脂質交換輸送を制御することを明らかにしている (Chung et al., 2015, Nakatsu & Kawasaki, 2021)。本研究では、成長円錐において高頻度にリン酸化されるホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) 合成酵素の細胞機能について、脂質交換輸送を中心に解明する。

3. 研究の方法

培養細胞に種々のプラスミドを導入して発現させ、オリンパス社 FV3000 共焦点顕微鏡システムを用いてライブイメージング観察した。データ解析には ImageJ ソフトウェアを用いて行った。ノックアウト細胞の作成は、CRISPR/Cas9 法を用いて、シーケンス解析によるゲノム配列の確認、およびウエスタンブロット法によるタンパク質発現量の解析により行った。

4. 研究成果

エンドソーム局在型 PI4P 合成酵素が制御する新規脂質交換輸送システムの解明

1) ORP10/9 は PI4 kinase typeII 依存的にエンドソーム-小胞体膜接触部位を形成する

成長円錐においてリン酸化修飾が確認されたイノシトールリン脂質制御分子の一つである PI4 kinase typeII は、エンドソームに局在する PI4P 合成酵素である。PI4 kinase typeII 陽性のエンドソームに局在するオキシステロール結合タンパク質ファミリー分子群の細胞内局在を調べたところ、機能未知であった ORP10 がエンドソーム-小胞体間の膜接触部位に局在することを見出した (図 1-A)。ORP10 のエンドソーム局在は、自身の PH ドメインの PI4P 結合に依存しており、また小胞体局在は ORP9 との結合を介していることを明らかにした。

2) ORP10 はエンドソーム-小胞体膜接触部位において PI4P および PS を交換輸送する

次いで、ORP10 のエンドソーム-小胞体間で脂質交換輸送機能について検証を行った。まず、ORP10 の脂質輸送ドメインである ORD を Expi293 細胞に発現させ、アフィニティーカラムおよびゲルろ過カラムによる精製した。そして、イノシトールリン脂質を標的とした脂質分析 (東京医科歯科大学・佐々木 雄彦教授との共同研究) を実施し、PI4P が主要なリガンド基質であることを明らかにした。先行研究により、ORP10 はホスファチジルセリン (PS) を輸送することが報告されていることから、ORP10-ORD の PI4P/PS 交換輸送活性について次に検証を行った。まず、リボソームを用いた脂質交換輸送アッセイ系において、ORP10-ORD が PI4P と PS を交換輸送する活性があることが証明された。次いで、エンドソーム-小胞体膜接触部に ORP10-ORD をラマパイシン依存的にリクルートする系を構築し、この化学ツールを用いたイメージング解析から ORP10 がエンドソーム-小胞体間においても PI4P/PS 交換輸送を実行する活性を有することを明らかにした。

3) ORP10 による PI4P/PS 交換輸送はエンドソームの膜分裂を制御する

次に ORP10 によるエンドソームと小胞体間での PI4P/PS 交換輸送が制御する細胞機能を調べる目的で、Crispr/Cas9 法を用いて ORP10 欠損 HeLa 細胞株を作成した。まず、エンドソーム膜の PI4P および PS 量について各脂質プローブを用いて検証したところ、ORP10 欠損細胞ではエンドソーム PS 量が減少していることが明らかになった。エンドソーム膜の PS はエンドソームからトランスゴルジへの逆行性膜輸送において重要な機能を担っている。そこで、逆行性輸送についてマンノース 6 リン酸受容体 (M6PR) を指標に検証したところ、ORP10 欠損細胞においてはエンドソームからトランスゴルジへの M6PR の逆行性輸送が低下

し、エンドソームに M6PR が蓄積していることが明らかとなった。この ORP10 欠損による表現型は、野生型 ORP10 によって回復するが、脂質輸送変異体では回復しないことから、ORP10 による脂質交換輸送によってエンドソームからトランスゴルジへの膜輸送が制御されていることが示唆された。さらに、エンドソーム膜 PS の主要なエフェクターであり、エンドソームの膜分裂制御分子の一つである EHD1 の局在について検証したところ、ORP10 欠損細胞では EHD1 のエンドソーム局在が低下しており、エンドソーム膜の膜分裂速度が低下していた (図 1-B)。

以上の結果から、ORP10 は小胞体—エンドソーム膜接触部位において PI4P/PS 交換輸送分子として機能し、エンドソームからゴルジ体への膜輸送を制御することが判明した (Kawasaki et al., 2021, 図 1-C)。

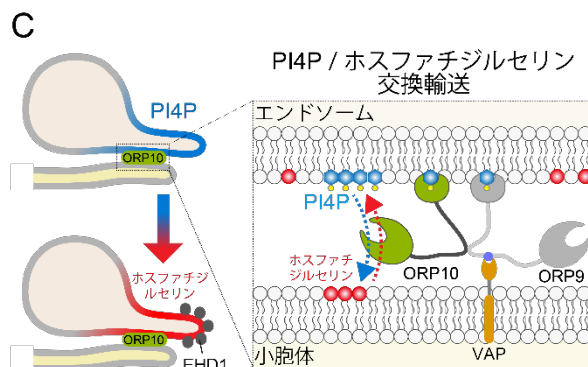
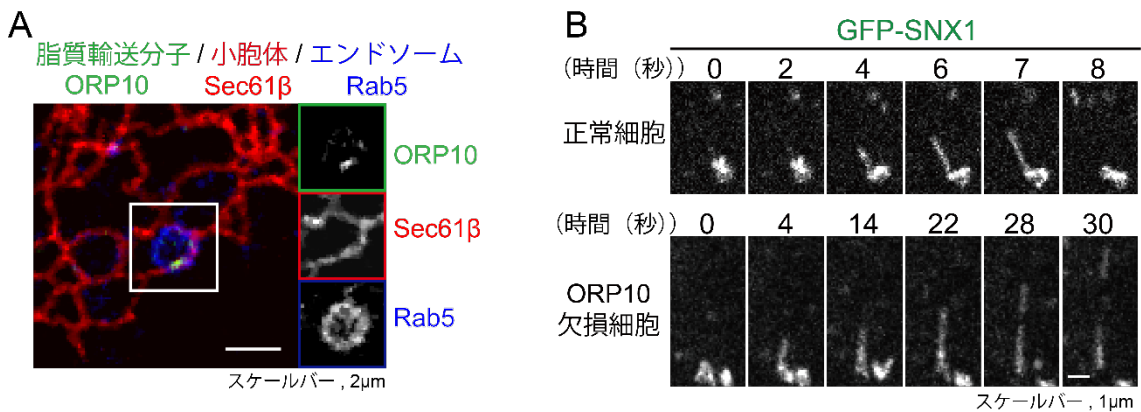


図 1. 小胞体 - エンドソーム膜接触部位における ORP10 の局在と機能

- A. 小胞体膜 (Sec61β) とエンドソーム (Rab5) が接する膜接触部位に局在する ORP10 の顕微鏡撮影画像
 B. エンドソーム膜 (GFP を融合した SNX1) が輸送される過程
 C. 小胞体—エンドソーム膜接触部位における ORP10 の機能を示した模式図

<引用文献>

Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czapl H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, De Camilli P.: INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):428-32.

Kawasaki A, Okada M, Tamada A, Okuda S, Nozumi M, Ito Y, Kobayashi D, Yamasaki T, Yokoyama R, Shibata T, Nishina H, Yoshida Y, Fujii Y, Takeuchi K, Igarashi M.: Growth Cone Phosphoproteomics Reveals that GAP-43 Phosphorylated by JNK Is a Marker of Axon Growth and Regeneration. *iScience*. 2018 Jun 29;4:190-203.

Kawasaki A, Sakai A, Nakanishi H, Hasegawa J, Taguchi T, Sasaki J, Arai H, Sasaki T, Igarashi M, Nakatsu F.: PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J Cell Biol*. 2022 Jan 3;221(1):e202103141.

Nakatsu F, Kawasaki A.: Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 24;9:664788.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawasaki Asami, Sakai Akiko, Nakanishi Hiroki, Hasegawa Junya, Taguchi Tomohiko, Sasaki Junko, Arai Hiroyuki, Sasaki Takehiko, Igarashi Michihiro, Nakatsu Fubito	4. 巻 221
2. 論文標題 PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER?endosome membrane contact sites regulates endosome fission	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202103141	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 Nakatsu Fubito, Kawasaki Asami	4. 巻 9
2. 論文標題 Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664788	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 Igarashi Michihiro, Kawasaki Asami, Ishikawa Yuya, Honda Atsuko, Okada Masayasu, Okuda Shujiro	4. 巻 339
2. 論文標題 Phosphoproteomic and bioinformatic methods for analyzing signaling in vertebrate axon growth and regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 108723 ~ 108723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2020.108723	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 Igarashi Michihiro, Honda Atsuko, Kawasaki Asami, Nozumi Motohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Neuronal Signaling Involved in Neuronal Polarization and Growth: Lipid Rafts and Phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2020.00150	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河崎 麻実、中津 史
2. 発表標題 小胞体-エンドソーム膜接触部位における脂質交換輸送の生理機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021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	五十嵐 道弘 (Igarashi Michihiro) (50193173)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	中津 史 (Nakatsu Fubito) (50360607)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	武内 恒成 (Takeuchi Kosei) (90206946)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

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