

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09658

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機能

研究課題名（英文）Function of MLN64, an endosomal membrane protein working in placental cells, in cholesterol transport

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト胎盤細胞のミトコンドリアで大量に産生されるプロゲステロンは、妊娠維持に働く極めて重要なステロイドホルモンである。プロゲステロンの大量産生には、原料となるコレステロールを大規模かつ効率よくミトコンドリアへ輸送する必要があるものの、その輸送分子機構については謎が多い。研究代表者は、2Dおよび3D免疫電子顕微鏡解析から、エンドソームとミトコンドリアとの間の詳細構造を明らかにした。この研究によって、プロゲステロンが如何に産生されているのかの分子機構の一端を明らかにできた。また、産生されたプロゲステロンがどう細胞外へ分泌されるのかといった謎にも今後迫ることができる点で、のびしろのある研究となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって輸送経路の微細構造やそこに局在する分子が判明すれば、本研究分野における大きな理解に繋がる。特に、謎の多い他の異種オルガネラ間が生む微細領域の詳細解明のための研究ツールとなり、波及効果が期待される。異種オルガネラ接近面の未知の微細構造を提示することで、我々に新鮮な疑問を投げかけ、接近面の新規の物質輸送機能の発見・解明へと推進する。本研究による胎盤細胞を用いたコレステロール輸送機構の解明は、妊娠の維持による胎児の安定的成長と体重確保や、出産後の健康保育などの課題の改善に繋がることが期待され、科学技術のみならず幅広い意味で社会に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Progesterone, which is produced in large quantities in the mitochondria of human placental cells, is an extremely important steroid hormone for the maintenance of pregnancy. Although the massive production of progesterone requires large-scale and efficient transport of cholesterol to the mitochondria, the molecular mechanism of this transport is still a puzzle. The principal investigators used 2D and 3D immunoelectron microscopy analyses to reveal the detailed structure between endosomes and mitochondria. This study has revealed part of the molecular mechanism of how progesterone is produced. This research also has the potential to shed light on how progesterone is secreted out of the cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ構造 コレステロール エンドソーム プロゲステロン 胎盤細胞 電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

胎盤は、子宮内での胎児の成長を支えるための栄養素や、妊娠維持ホルモンであるプロゲステロンなどを送り届ける極めて重要な役割を果たす臓器である。しかし胎盤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して妊娠維持に貢献するのかなどの分子機構について、未解明の部分が多い。

プロゲステロンの原料となるコレステロールの多くは、低密度リポタンパク質(LDL)として細胞外から受容体を介して取り込まれる。細胞内に入った LDL は、エンドサイトーシス経路を経てリソソームまで運ばれ、加水分解の後にコレステロールとなる。コレステロールからプロゲステロンへと代謝されるのに必要な酵素はミトコンドリアに存在するので、リソソームに存在するコレステロールはミトコンドリアへ運ばなければならない。しかし、ミトコンドリアへのコレステロール輸送に如何なる分子が関与し、どのような輸送形態を経るのかといったことは、ほとんど分かっていない。

研究代表者は、ヒト胎盤 trophoblast 培養細胞において、脂質結合能を持つエンドソーム膜タンパク質 MLN64 とエンドソームマーカーとで共標識された膜区画と、ミトコンドリアとが近接していることを免疫電顕解析により明らかにした。更に、RNA 干渉法により MLN64 を発現抑制すると接近できず、プロゲステロン前駆体の産生量もほぼ抑えられることも突き止めた。また、ライブ解析により、エンドソームとミトコンドリアは接近と離脱を繰り返していることを発見した。以上のことから研究代表者は、エンドソームとミトコンドリアとの膜接触を介してコレステロールが直接輸送される可能性もありうると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミトコンドリアでのステロイドホルモン産生に必要なコレステロールのエンドソームから出発する、輸送機構を明らかにする、妊娠維持ホルモンをモデルとして微細構造学的、及び細胞遺伝学的な解析方法からコレステロール輸送機構を明らかにすることである。具体的には、近接したオルガネラ間の距離や構造を明らかにした上で、MLN64 がオルガネラ間膜近接にどう貢献しているのかを解明する。

## 3. 研究の方法

上記目的を達成するための方法として、①3D 電子線トモグラフィ法による三次元解析を行い、オルガネラ間の近接領域を明らかにする。②エンドソーム膜タンパク質 MLN64 の発現抑制細胞を用いた細胞生物学的解析を行う。③免疫電子顕微鏡法を駆使し、近接領域に集積する分子を明らかにすることで、エンドソームとミトコンドリアとの近接領域での物質輸送の役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

**計画① エンドソーム-ミトコンドリア間の近接領域について、その距離や領域範囲などの詳細がどのようなものであるのか？**

後期エンドソームとミトコンドリアの膜接触部位を可視化するために、JEG3 細胞における後期エンドソームとミトコンドリアの局在を透過型電子顕微鏡 (TEM) により形態学的に検討した。後期エンドソームは、洞窟状、管状、多小胞状の領域を持つ非常に多形的な特徴を持つ (Gruenberg and Stenmark, 2004)。よって、後期エンドソームを超薄切片で容易に判別できるように、プラスチックカバースリップ上で増殖した細胞を固定後、後期エンドソームマーカー Lamp1 (リソソーム関連膜タンパク質 1) または NPC2 (ニーマン・ピックタイプ C2) に対する抗体で標識した。Lamp1 標識の金粒子は、主に後期エンドソームの限界膜に沿って観察された。観察された後期エンドソームにミトコンドリアが接近している像をいくつも発見し、その接近領域にはお互いの膜間を繋ぐ細いフィラメント様の構造体 (テザー, tether) を認めることができた。

これまでの研究で、ER とミトコンドリア間 (Csordás et al., 2006) や ER と細胞膜間 (Fernández-Busnadiego et al., 2015) には、線維性ブリッジや近接部に電子密度の濃いテザーの存在が報告されている。今回の研究によって、テザーは平均  $19.1 \pm 2.7$  nm ( $n=33$ ) の長さで、先に報告されたメラノソームとミトコンドリアの接触の長さと同様であることがわかった (Daniele et al., 2014)。また、後期エンドソームとミトコンドリアとの接触面の長さはおよそ 150 nm であり、小胞体とミトコンドリアとの接触面の長さが 302 nm であったことから、接触に関わる分子の特異性や脂質の構成成分等で接触の特異性が決定され

ることが示唆された。

後期エンドソームとミトコンドリアの密着面をさらに詳しく解析することを目的に、3D 電子線トモグラフィー法による三次元構造解析を行った。200 nm の超薄切片を作製し、水平から+70° ~ -50° の範囲で 1° ずつ傾け連続して TEM 画像を取得した(図 1A)。得られた 120 枚程度の連続傾斜角 TEM 像を、IMOD ソフトウェアで 3D 再構成した。JEG3 細胞では、Lamp1 標識の後期エンドソームとミトコンドリアの接触が確認され、深さ 200 nm の範囲では互いの膜が融合することはなかった(図 1B-F)。再構成された 3 次元顕微鏡写真の z 軸の異なる部分でも 2 つの膜の間に多くの電子密度の高いテザーが存在した(図 1C-E, G)。興味深いことに、これらのテザーは多くの切片で観察され、テザー間の距離は  $17.3 \pm 1.4$  nm (n=29) であった(図 1H)。以上の結果から、本研究の目的は達成され、エンドソームとミトコンドリアとの間の近接領域の構造を明らかにできた。

### 計画② オルガネラ間膜近接に MLN64 がどう貢献しているのか？

STARD3/MLN64 は、エンドソーム-ミトコンドリアだけでなく、ER-エンドソームの接触にも関与していることが示された(Höglinger et al., 2019)。そこで、STARD3-knockdown 細胞を用いて、エンドソームとミトコンドリアが密着した詳細な構造を解析した。MLN64 RNAi 配列(Hölttä-Vuori et al., 2005)を用いて、2 つの安定な STARD3 ノックダウン JEG3 細胞株(図 3A)を作製した。得られたノックダウン細胞を用いて、後期エンドソームとミトコンドリアの接点をより詳細に可視化するために、超微細構造研究を行った。Lamp1 に対する抗体で染色した後、TEM 観察したところ、コントロール細胞では、ミトコンドリアに隣接して Lamp1 標識の後期エンドソームがいくつか観察された。観察された細胞領域における標識後期エンドソーム(n=497)の  $15.8 \pm 2.8$  % がミトコンドリアと接触した。一方、STARD3/MLN64 ノックダウン細胞では、標識された後期エンドソームはミトコンドリアから離れていた。後期エンドソームとミトコンドリアの接触は U18666A 処理の効果と同様に  $4.1 \pm 1.1$  % (n=372; p<0.01) に減少した。

次に、様々なマーカーを用いて異種オルガネラの間隙距離を TEM で解析した。コントロール細胞では後期エンドソームとミトコンドリアとの距離は 11-40 nm (n=38) であった(図 2A, F) が、STARD3 ノックダウン細胞では 38-154 nm (n=54) と約 5 倍に距離が伸びた(図 2B, F)。しかしながら、U18666A で処理した場合は 250-550 nm (n=77) で、STARD3 ノックダウン細胞の時よりもはるかに長かった(図 2D, F)。

STARD3 ノックダウン細胞ではなぜ十分に後期エンドソームとミトコンドリアは離れないのであろうか？本研究ではさらにこの問いに答える目的で、ノックダウン細胞を用いて 3D 電子線トモグラフィー法による三次元構造解析を行った。約 200 nm の超薄切片を TEM 解析し、水平から +62° から -62° までの 125 枚の連続した角度の TEM 画像を用いて 3D 再構成を行った。すると、NPC2 標識の後期エンドソームとミトコンドリアをつなぐテザーはほとんど観察されず(図 2G-J)、一方で ER とミトコンドリアの間のテザーは一貫して観察された(図 2I, J)。以上の結果から、MLN64 は後期エンドソームとミトコンドリアをつなぐテザー形成に特異的に関与することが示唆され、本研究の目的は達成された。

### 計画③ エンドソーム-ミトコンドリアの近接領域に如何なる分子が集積するのか？

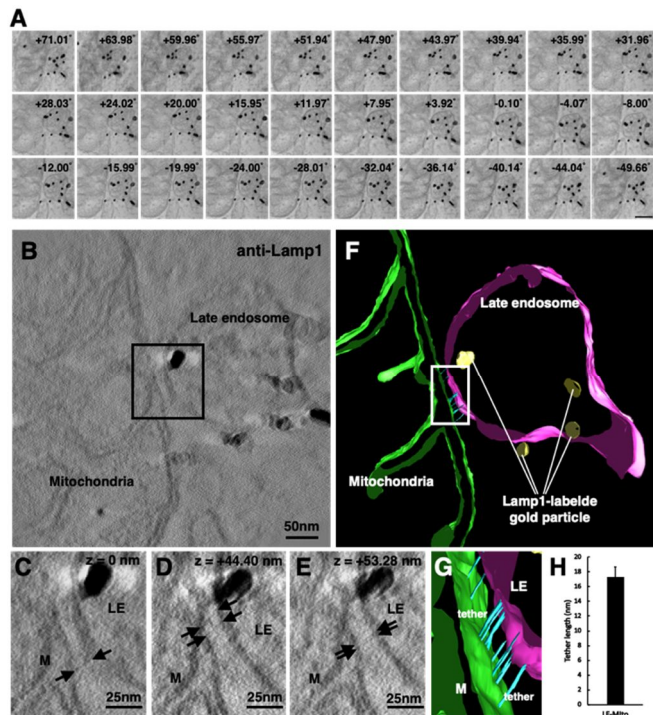


図 1. 3D 電子線トモグラフィーによる解析

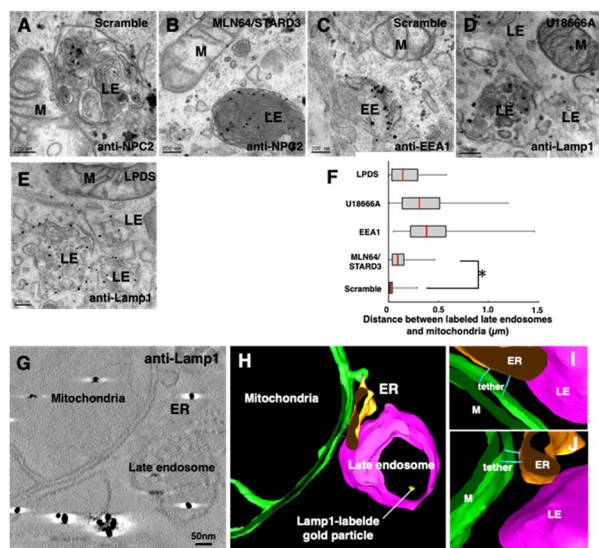


図 2. STARD3ノックダウン細胞を用いた免疫電子顕微鏡解析

上記実験結果より、エンドソームとミトコンドリアとの間で局所的な異種オルガネラコミュニケーションが行われていることが示唆された。このコミュニケーションを何に利用しているのだろうか？MLN64 が両オルガネラを支えるテザー構造を形成するのに必要であることはわかった。MLN64 はコレステロールと結合する能力があることから、局所接近構造がコレステロールの送付を橋渡ししている可能性が示唆され、内外の多くの研究が行われている。本研究では、逆にミトコンドリアからエンドソームへ物質が運ばれる際にもこの近接構造を利用するのではという、さらに踏み込んだ考えで研究を進めた。すると、ミトコンドリアで合成されたプロゲステロンがこの近接領域付近に存在することを免疫電子顕微鏡解析によって明らかにした。現在、この知見の生化学的解析による裏付けを進めており、胎盤細胞におけるエンドソームとミトコンドリアとの近接領域の役割を提案できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tabata K; Arakawa M; Ishida K; Kobayashi M; Nara A; Sugimoto T; Okada T; Mori K; Morita E	4. 巻 95
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Controls Virus Protein Homeostasis, Which Is Required for Flavivirus Propagation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02234-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.02234-20	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 奈良篤樹	4. 巻 82
2. 論文標題 胎盤細胞を用いたエンドソームタンパク質MLN64が機能する後期エンドソームとミトコンドリアとの近接領域の微細構造解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 184-189
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 Atsuki Nara, Akimi Inoue, Yoshitaka Aoyama, Takashi Yazawa	4. 巻 429
2. 論文標題 The ultrastructural function of MLN64 in the late endosome-mitochondria membrane contact sites in placental cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2023.113668	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3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 胎盤細胞を用いたエンドソームタンパク質MLN64が機能する 後期エンドソームとミトコンドリアとの近接領域の微細構造
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良篤樹, 矢澤隆志
2. 発表標題 胎盤細胞を用いたエンドソームタンパク質MLN64が機能する後期エンドソームとミトコンドリアとの近接領域の微細構造解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良篤樹
2. 発表標題 胎盤細胞におけるエンドソーム-ミトコンドリア接近領域の3D構築
3. 学会等名 ペプチド・ホルモン研究会
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

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