

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02078

研究課題名(和文) 生細胞内膜接触部位の可視化・操作ツールの開発

研究課題名(英文) Development of tools for visualizing and manipulating membrane contacts in living cells

研究代表者

築地 真也 (Tsukiji, Shinya)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40359659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生細胞内の膜-膜接触部位(膜接触部位)の生理機能を解明するための新たな汎用的ケミカルバイオロジーツールの開発に取り組んだ。さまざまな検討の結果、1) 膜接触部位の動態観察を可能にする可逆的蛍光プローブ、2) 膜接触部位の形成と解消を誘導できる化学遺伝学技術、3) ホスファチジルイノシトール 4-リン酸(PI4P)に対する新規蛍光レポーター、を開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜接触部位の生物学は、サイエンスとしても未開拓領域であるばかりでなく、神経再生や神経変性疾患、がん、ウイルス感染症など、多くの疾病との関連が示唆されつつある。本研究で開発したツール群は、膜接触部位の生理機能の解明に貢献し、診断や創薬などの幅広い生命科学・医学分野に新しいブレイクスルーと波及効果をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work was to develop new chemical biology tools for elucidating physiological functions of membrane-membrane contact sites in living cells. We successfully developed the following tools: (1) fluorescent probes that enable the visualization of membrane contact dynamics with reversibility, (2) chemogenetic techniques that can control the formation and deformation of membrane contacts, (3) novel genetically encoded fluorescent reporters for phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P).

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：膜接触部位 蛍光プローブ 局在性リガンド 分割型タンパク質 ホスファチジルイノシトール 4-リン酸

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、細胞内のオルガネラや細胞膜はそれぞれが物理的に離れて存在すると考えられてきた。しかし近年、さまざまなオルガネラや細胞膜が 10~30 nm ほどの距離に近接し、「membrane contact site」と呼ばれる膜-膜接触部位 (以下、メンブレンコンタクト) を形成することが明らかとなってきた。メンブレンコンタクトは脂質交換輸送などに関与していると考えられているが、メンブレンコンタクトがいつ、どこで、どのように形成されるのか、またどのような生命現象をどのように制御しているのかは未だ不明な点が多い。その大きな理由の一つは、メンブレンコンタクトを生理的条件下、生細胞の状態で解析することのできるツールの開発が遅れていることに起因する。現在、メンブレンコンタクトの観察は、電子顕微鏡や split-GFP を用いた手法に依存している。しかし、電子顕微鏡観察では細胞を固定化するため、固定した (死んだ) 細胞・組織でのスナップショットでの情報しか得られない。また、split-GFP 法では、GFP フラグメント同士の再構成が不可逆的であるため、メンブレンコンタクトの形成や消失といった動態解析には不向きである。したがって、メンブレンコンタクトの生命科学を加速するためには、生細胞におけるメンブレンコンタクトの動態を生理的条件下で可視化する技術が不可欠である。また、メンブレンコンタクトの機能を分子レベルで解析するためには、メンブレンコンタクトやコンタクト関連分子を人為的に操作する技術も必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ケミストリー、ケミカルバイオロジー、タンパク質工学を統合したツール開発を展開し、メンブレンコンタクト研究を加速する革新的で高汎用的なコンタクト可視化・操作技術を創出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 可逆的メンブレンコンタクト可視化プローブの開発

生細胞内のメンブレンコンタクトの時空間動態を特異的かつ可逆的に検出できる新規蛍光プローブの開発を目指した。その戦略として、発蛍光性ケモジェネティックレポーターである FAST を 2 つのフラグメント (N-FAST と C-FAST) に分割した「splitFAST」に着目した (Tebo & Gautier, Nat. Comm. 2019)。このシステムでは、N-FAST と C-FAST が近接した際に FAST の再構成が起こり、HBR という発蛍光性化合物と結合することで蛍光を発する。また、N-FAST と C-FAST の再構成は可逆的であると報告されている。本研究では、この splitFAST システムを利用したメンブレンコンタクト可視化プローブの開発を展開した。

#### (2) 化学遺伝学メンブレンコンタクト操作ツールの開発

我々はこれまでに、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) と小分子トリメトプリム (TMP) のペアを利用した化学遺伝学タンパク質局在操作技術 (SLIPT) を開発している。細胞膜内膜局在性リガンド  $m^Dc$ TMP を用いると、 $^{16}K$ DHFR タグ (eDHFR のループ領域に Lys 残基の 6 回繰り返し配列を挿入したもの) を細胞質から細胞膜インナーリーフレットへ移行させることができる (SLIPT-PM : Suzuki et al. Cell Chem. Biol. 2022)。また、ゴルジ体局在性リガンド  $mgc^{3Me}$ TMP を用いると、eDHFR タグ (天然型) を細胞質からゴルジ体表面へ移行させることができる (SLIPT-Golgi : Sawada et al. Chem. Commun. 2020)。本研究では、これらの化学遺伝学システムを利用したメンブレンコンタクト操作ツールの開発に取り組んだ。

#### (3) 新規蛍光 PI4P レポーターの開発

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) は細胞膜 (PM)、ゴルジ体膜、エンドソーム膜、リソソーム膜などに存在し、これらの細胞膜・オルガネラ膜が小胞体 (ER) 膜とメンブレンコンタクトを形成する際の足場となっている。したがって、生細胞中の PI4P の局在分布やその動的変化を可視化する蛍光レポーターはメンブレンコンタクト研究における重要なツールとなる。しかし、既存の PI4P レポーターは、ゴルジ体 PI4P に優先的に結合する、細胞質とのコントラストが低い、などの問題があった。本研究では、オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) 関連タンパク質 ORP9 が有する PH ドメイン (ORP9-PH) を PI4P 結合ドメインとして利用した新規蛍光 PI4P レポーターの開発を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 可逆的メンブレンコンタクト可視化プローブの開発

分割型タンパク質を利用した発蛍光レポーターシステムである「splitFAST」に着目し、可逆的かつ時空間的なメンブレンコンタクト検出が可能な蛍光プローブの開発に取り組んだ。

splitFAST は、FAST と呼ばれるタンパク質を 2 つのフラグメント (N-FAST および C-FAST) に分割したもので、それぞれのフラグメント同士が近接すると FAST が再構成され、発蛍光性化合物 HBR と結合して蛍光を発する。今回我々は、膜コンタクト形成による膜と膜の近接を splitFAST の再構成に利用できれば、コンタクト領域を特異的に蛍光検出できると考えた。概念実証として、ORP5 タンパク質が形成する ER-PM コンタクトに着目し、N-FAST を PM 上に、C-FAST を ORP5 に連結して ER 上に発現させたところ、ORP5 を介した ER-PM コンタクト形成部位を HBR 蛍光で可視化することができた。また、薬剤処理によるコンタクト解消後には蛍光が減弱する様子が見られ、コンタクト動態を可逆的に検出できる可能性も示された。一方、論文に報告されている splitFAST をそのまま用いた場合、N-FAST と C-FAST の再構成の可逆性が十分ではない (薬剤処理後も ORP5 が形成するコンタクトが完全には解消しない) ことが明らかとなった。そこで変異導入によるエンジニアリングを行い、可逆性に優れた改変型 splitFAST を開発することに成功した。これら一連の成果については、現在、論文投稿準備中である。

## (2) 化学遺伝学膜コンタクト操作ツールの開発

我々が以前に開発した SLIPT-PM および SLIPT-Golgi システムを利用した化学遺伝学膜コンタクト操作ツールの開発に取り組んだ。概念実証としてまず、ORP5 の PH ドメインを <sup>k6</sup>DHFR に置換したコンストラクト (<sup>k6</sup>DHFR-ORP5<sub>APH</sub>) を創製し、ER 上に発現させた。そこへ局在性リガンドを添加すると、<sup>k6</sup>DHFR-ORP5<sub>APH</sub> が PM 内膜にテザリングされることで、ER-PM コンタクトが形成された。また、このコンタクト形成によって細胞膜 PI4P が (ER へのトランスファーによって) 枯渇することも示された。さらに、局在性リガンドに続いてフリーの TMP を添加すると、<sup>k6</sup>DHFR-ORP5<sub>APH</sub> を介した ER-PM コンタクトが外れ、細胞膜 PI4P が再補充される様子を確認することができた。すなわち、可逆的な ER-PM コンタクト操作ツールの開発に成功した。また、SLIPT-Golgi システムを用いることで、OSBP を介した ER-Golgi コンタクト形成と脂質交換輸送の可逆的操作も可能であった。これら一連の成果については、現在、論文投稿準備中である。

## (3) 新規蛍光 PI4P レポーターの開発

ORP9-PH を PI4P 結合ドメインとして用いた新規蛍光 PI4P レポーターの開発を行なった。ORP9-PH に蛍光タンパク質を融合し、細胞に発現させたところ、細胞膜、ゴルジ体膜、エンドソーム膜、リソソーム膜に存在する PI4P を高効率かつ高いコントラストで検出できることが示された。特に、既存の PI4P レポーター (OSBP-PH ドメインと P4M ドメインを用いたもの) では検出が困難であった細胞膜 PI4P の検出に適していることも明らかとなった。また、蛍光タンパク質を変更する過程で、ORP9-PH に融合する蛍光タンパク質としては二量化傾向を持つものが適していることを見出した。この指針の元、青色、緑色、赤色、近赤外色蛍光の計 4 種類の ORP9-PH 型蛍光 PI4P レポーターを創製した。一連の成果は「RSC Chemical Biology」誌に掲載された。

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 1件）

1. 著者名 Moeka Ajiki, Masaru Yoshikawa, Tomoki Miyazaki, Asami Kawasaki, Kazuhiro Aoki, Fubito Nakatsu, Shinya Tsukiji	4. 巻 5
2. 論文標題 ORP9-PH domain-based fluorescent reporters for visualizing phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 544-555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3CB00232B	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 Fubito Nakatsu, Shinya Tsukiji	4. 巻 73
2. 論文標題 Chemo- and opto-genetic tools for dissecting the role of membrane contact sites in living cells: recent advances and limitations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 102262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2022.102262	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 吉川 優, 阿喰 萌香, 中津 史, 築地 真也	4. 巻 36
2. 論文標題 メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 30-31
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿喰萌香、吉川優、宮崎友輝、中津史、築地真也
2. 発表標題 生細胞内ホスファチジルイノシトール4-リン酸を可視化するORP9-PH型蛍光バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第87回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿嶋萌香、吉川優、宮崎友輝、中津史、築地真也
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール 4-リン酸の細胞内動態を可視化する新規蛍光プローブ
3. 学会等名 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会第34回サマースクール
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿嶋萌香、吉川優、筒井啓太、中津史、築地真也
2. 発表標題 分割型ケモジェネティック蛍光プローブを用いた膜-膜接触部位の可視化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿嶋萌香、吉川優、筒井啓太、中津史、築地真也
2. 発表標題 メンブレンコンタクト動態を可視化する分割型プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿嶋萌香、吉川優、筒井啓太、中津史、築地真也
2. 発表標題 生細胞内メンブレンコンタクトの特異的かつ可逆的な蛍光検出法の開発
3. 学会等名 第86回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿喰萌香、吉川優、中津史、築地真也
2. 発表標題 細胞膜ホスファチジルイノシトール 4-リン酸を可視化する蛍光バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿喰萌香、吉川優、中津史、築地真也
2. 発表標題 新規蛍光プローブによる細胞膜ホスファチジルイノシトール 4-リン酸の可視化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿喰萌香、吉川優、中津史、築地真也
2. 発表標題 細胞内ホスファチジルイノシトール4-リン酸を可視化する新規遺伝子コード型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川優、阿喰萌香、中津史、築地真也
2. 発表標題 メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川優、阿喰萌香、中津史、築地真也
2. 発表標題 脂質交換輸送を操作するメンブレンコンタクト誘導技術の開発
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿喰萌香、吉川優、筒井啓太、中津史、築地真也
2. 発表標題 生細胞内メンブレンコンタクトを可視化する蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川優、阿喰萌香、筒井啓太、中津史、築地真也
2. 発表標題 生細胞内メンブレンコンタクトを操作する化学ツールの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022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
連携研究者	中津 史  (Nakatsu Fubito)  (50360607)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	

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