

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02694

研究課題名（和文）細胞膜脂質オーガナイザーとしてのPI-4キナーゼ複合体の機能とその破綻

研究課題名（英文）The PI4-Kinase Complex and Its Role in Plasma Membrane Lipid Homeostasis

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） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞膜を構成する脂質は、バリア機能やシグナル伝達制御をはじめ多くの重要な役割を担う。しかしながら、その恒常性制御についての詳細は明らかになっていない。本研究では、主に脂質輸送制御機構およびシグナル伝達制御の観点からそのメカニズムの解明を目指し、新たな脂質輸送タンパク質の同定や、細胞膜脂質の新規プローブおよびバイオセンサーの開発によって、動的な細胞膜脂質制御機構の一旦が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜は、バリア機能や細胞内外のシグナル受容・伝達など、細胞の生命活動に必須な様々な役割を担う。その主要構成分子である脂質はそれら生理機能の制御の中心的役割を担っており、その制御破綻が種々の疾患に関与することからもその生理的重要性は明らかである。本研究により明らかになった知見は、細胞膜が担う様々な現象のさらなる理解や疾患機序解明、さらには新たな治療薬開発などに結びつく可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The lipids that form the plasma membrane fulfill many vital functions, including barrier functions and the regulation of signal transduction. Nonetheless, the details regarding their homeostasis regulation are not well understood. In this study, we aim to clarify these mechanisms, particularly from the standpoint of lipid transport control and signal transduction regulation. By identifying novel lipid transport proteins and developing new probes and biosensors for cell membrane lipids, we have shed light on part of the dynamic regulation mechanism of cell membrane lipids.

研究分野：細胞生物学

キーワード：plasma membrane PI4P

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質は、バリア機能やシグナル伝達制御をはじめ多くの重要な役割を担う。これは、多種多様な脂質種が適切なバランスで存在し、脂質恒常性が維持されてはじめて可能となる。事実、細胞膜脂質の異常は多くの疾患に繋がることから、その恒常性制御の理解は極めて重要な課題である。

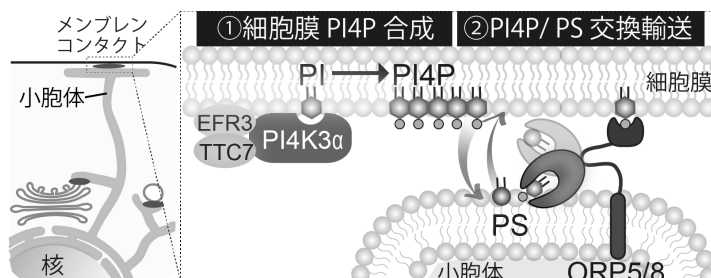


図1：小胞体—細胞膜コンタクトにおける脂質交換輸送

リン脂質の一つであるイノシトールリン脂質は、その親水基が可逆的にリン酸化されることで7種類の異なるイノシトールリン脂質種が存在する。そのうち細胞膜に多く存在するホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI(4)P)は、phosphatidylinositol 4-kinase type III alpha (PI4K3α)で構成される PI4K3α 複合体(PI4K3α/EFR3/TTC7)により PI から合成される(図1-①)。このPI(4)P合成が、細胞膜脂質をオーガナイズする機能を有することがわかってきた。申請者は、小胞体と細胞膜が 10-30nm で近接する領域 (メンブレンコンタクト) で2種類の異なる脂質が交換輸送される仕組みを見いだした (Chung et al., 2015)。この脂質交換輸送では、脂質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 ORP5 もしくは ORP8 によって、PI(4)P が細胞膜から小胞体へ輸送され、ホスファチジルセリン (PS) がその逆向きに対向輸送される(図1-②)。重要なことに、この脂質交換輸送は、細胞膜 PI(4)P 合成が駆動力を与えていた。PI(4)P は細胞膜で合成され、小胞体で分解 (脱リン酸化) されることから、細胞膜に多く、小胞体で少ない。PI(4)P はその濃度勾配に沿って細胞膜から小胞体へと輸送され、この力が PS の逆向き輸送を駆動していた。そして予備実験から、このPI(4)P 駆動による交換輸送によって、PS 以外の脂質も輸送されていることがわかりつつある。つまり PI(4)P は自身が細胞膜から小胞体へと流れることで、他の脂質の細胞膜への輸送を統括しているのである。

2. 研究の目的

そこで本研究では、PI4K3α 複合体が、“細胞膜脂質オーガナイザー”としてPI4P合成制御を通して細胞膜の脂質恒常性を制御する分子機構と生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

APEX2 を用いた網羅的近傍分子探索、およびその後の検証解析は、定法にしたがい先行研究で行った方法と同様に行った (Kawasaki et al., 2022; Lam et al., 2015)。新規プローブの開発および新規 FRET バイオセンサーの構築は、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング解析により行った。また画像解析は、Fiji ソフトウェアを用いて行った。

4. 研究成果

細胞膜脂質恒常性を支える脂質輸送機構の解明：

PI4K3α 複合体による細胞膜脂質恒常性制御機構の解明を目指し、細胞膜イノシトールリン脂質に依存して細胞膜の脂質輸送を制御する分子のスクリーニングを行った。APEX2 を細胞膜に局在させ、イノシトールリン脂質に依存して細胞膜に局在する分子群について質量分析を用いた網羅的な解析を定法にしたがって行った。得られた分子群のうち、脂質輸送タンパク質 (Lipid transfer protein: LTP) もしくはその類似機能を有すると予想されるタンパク質をアミノ酸配列の相同性により二次スクリーニングを行い、最終候補となる分子群を得た。これら最終候補分子群について GFP 融合タンパク質として培養細胞に一過性に発現させてその局在を解析したところ、小胞体と細胞膜間のメンブレンコンタクトに局在する分子を同定した。さらに、この局在の分子メカニズムを探るため、種々の変異体を作成しその局在を検討することで、小胞体—細胞膜コン

タクトへの局在に必須に領域の絞り込みを行った。次に、この新規小胞体—細胞膜コンタクト局在分子が輸送する脂質の同定に着手した。アミノ酸配列から脂質輸送に関与すると予想される機能ドメインを哺乳動物細胞に一過性に発現させ、アフィニティー精製を行った後にゲルろ過クロマトグラフィーにより単量体を精製した。この精製サンプルを質量分析により解析し、新規のリガンド候補脂質の同定に成功した。

PI4P 検出ツールの開発と細胞膜脂質恒常性制御機構の解析：

PI4K3a 複合体による細胞膜 PI4P 合成活性を鋭敏にモニター可能な細胞膜における PI4P の検出・定量方法の樹立を行った。これまでは、オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) ファミリーの OSBP の PH ドメインやバクテリア由来の P4M と呼ばれるタンパク質ドメインが PI4P プローブとして利用されてきた。しかし、OSBP-PH は PI4P だけでなく Arf1 への結合活性も有することによりゴルジ体への偏在性が強いこと、P4M はアフィニティーの問題によりサイトゾルシグナルが高いなど、PI4P プローブとして種々の問題があった。そこで我々は、これら従来用いられてきた PI4P プローブに比べ、膜結合力が強くサイトゾルへの局在性が低い PI4P 結合タンパク質を探索し、ORP9-PH ドメインがその候補となることを見出した。ORP9-PH ドメインを蛍光タンパク質との融合タンパク質として培養細胞に発現させ、その局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析したところ、細胞膜、ゴルジ体、エンドソームおよびリソソームに特異性高く局在した (図 2)。そこで、この新規プローブを用いて、生理的刺激に伴う PI4P 動態を詳細に解析した。ムスカリン性受容体を発現する HeLa 細胞をカルバコールにて刺激したところ、PI4P の顕著な減少が観察された。これらの結果から、ORP9-PH は G タンパク質共役型受容体刺激による PI4P の動態を解析可能な PI4P 特異的プローブとして有用であることが明らかになった。

次に、ORP9-PH の PI4P 特性に着目し、さらに詳細な定量解析を可能とする Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) バイオセンサーの開発を試みた。先行研究 (Nishioka et al., 2008) で報告されている FAPP1-PH ドメインをベースとしたバイオセンサー構築と同様な戦略により、当該ドメインを CFP と YFP の間に挿入し、このドメインによるリガンド脂質認識によって構造変化を誘導し、FRET 現象を誘発するバイオセンサーを開発した。このバイオセンサーを細胞膜に局在させ、細胞膜イノシトールリン脂質の挙動を定量できるかを検討した。開発した FRET センサーを恒常的に発現する細胞に、イノシトールリン脂質合成酵素阻害剤を処理して、その脂質の挙動を測定したところ、細胞膜におけるイノシトールリン脂質レベルの低下にともない FRET 値 (FRET/CFP にて算出) の顕著な減少が観察された。このことから、樹立した新規 FRET センサーは、細胞膜イノシトールリン脂質の動態を定

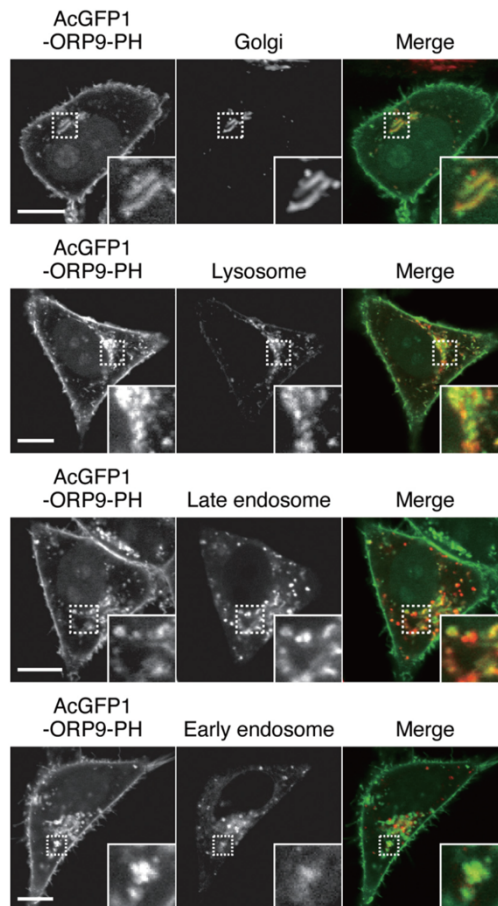


図 2 : 新規 PI4P プローブの樹立

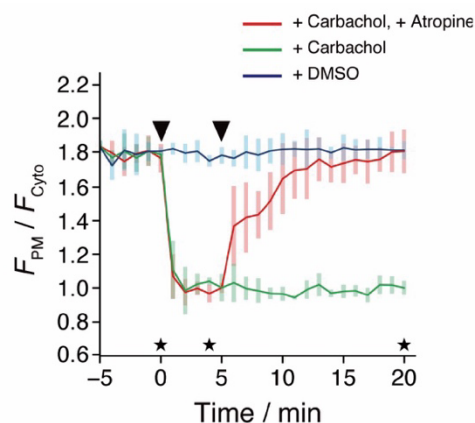


図 3 : GPCR 刺激に伴う PI4P 動態解析

量解析可能であることが判明した。そこで、ムスカリン性アセチルコリン受容体を発現している細胞を用いて、アセチルコリン刺激による細胞膜イノシトールリン脂質の動態を解析したところ、本 FRET センサーにより一過的なイノシトールリン脂質レベルの低下、およびその後のわずかな回復が観察された。PI4P 合成酵素を介した PI4P 合成は、メンブレンコンタクトを介した新規脂質輸送や受容体刺激に伴う細胞膜脂質環境変化に動的に対応することが明らかになった。

<引用文献>

Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czaplá 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. doi: 10.1126/science.aab1370. PMID: 26206935; PMCID: PMC4638224.

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. doi: 10.1083/jcb.202103141. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34817532; PMCID: PMC8624802.

Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods*. 2015 Jan;12(1):51-4. doi: 10.1038/nmeth.3179. Epub 2014 Nov 24. PMID: 25419960; PMCID: PMC4296904.

Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, Matsuda M. Rapid turnover rate of phosphoinositides at the front of migrating MDCK cells. *Mol Biol Cell*. 2008 Oct;19(10):4213-23. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0315. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18685081; PMCID: PMC2555955.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 河崎 麻実、中津 史	4. 巻 94
2. 論文標題 小胞体?エンドソーム間のメンブレンコンタクトにおけるPI4P駆動型脂質交換輸送	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 611~615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940611	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 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 1-18
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 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 1-19
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 223
2. 論文標題 Phosphatidylserine turns the gears of phospholipids in B cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202401047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202401047	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 Honda Atsuko, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Natsume Rie, Kawasaki Asami, Nakatsu Fubito, Abe Manabu, Uchino Haruki, Matsushita Natsuki, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto, Sakimura Kenji, Igarashi Michihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Very-long-chain fatty acids are crucial to neuronal polarity by providing sphingolipids to lipid rafts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113195 ~ 113195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113195	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 Nakatsu Fubito, Tsukiji Shinya	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 ~ 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中津 史	4. 巻 98 (2)
2. 論文標題 脂質交換輸送ゾーンの制御と機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 解剖学雑誌	6. 最初と最後の頁 50-53
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 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクト操作ツールを用いた脂質交換輸送の機能解明
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 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 中津 史
2. 発表標題 脂質交換輸送ゾーンの制御と機能
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会
4. 発表年 2023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によるメンブレンコンタクトを介した脂質交換輸送制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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が制御するオルガネラダイナミクス
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 脂質の代謝と交換輸送の接点としての脂質交換輸送ゾーン
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 Lipid countertransport at membrane contact sites
3. 学会等名 第75回細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nakatsu F, Kawasaki A	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 468
3. 書名 Plasma Membrane Shaping	

〔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
---------	---------