

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870020

研究課題名（和文）オルガネラノックダウン法の開発を契機としたオルガネラ量補償機構の解析

研究課題名（英文）Investigation of the homeostatic regulation for organelle abundance by invention of organelle knockdown-technology

研究代表者

柳谷 耕太 (YANAGITANI KOTA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：70614775

研究成果の概要（和文）：本研究では、任意のオルガネラの量を人為的に減少させるシステム、オルガネラノックダウン法を開発し、真核細胞に備わる未知のオルガネラ量補償機構の解析を目的とした。小胞体、ミトコンゴリア、ゴルジ体、ペルオキシソームに対するオルガネラノックダウンシステムを作製し、改良を重ねたところ、一部のオルガネラを若干減少させることに成功した。このシステムに更なる改良を加えることで、オルガネラ量補償機構の解析が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Organelle abundance in eukaryotic cells seems to be tightly regulated. These regulations, however, are poorly understood. The objective of this project was investigation of unknown homeostatic regulation of organelle abundance by invention of organelle-knockdown technology which reduces the amount of specific organelle. In this granted term, I could make a prototype of the organelle knockdown technology, although its efficiency was not high. This system will be applicable to investigation of the homeostatic regulation of organelle abundance by improvement of the system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞生物学, バイオテクノロジー, オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、好気呼吸によるエネルギーの産生や細胞外へのタンパク質分泌、脂質の代謝などの細胞の生命機能に必須な反応は、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソームなどの脂質膜で覆われた細胞内小器官(オルガネラ)で分担して遂行される。その

ため、動物の赤血球などの例外を除き、これらのオルガネラはほぼ全ての真核細胞に備わっている。それぞれのオルガネラの量は細胞分裂のたびに半減するが、その後、新規に合成され、元の細胞と同程度の量にまで増幅される。有性生殖によって増殖する生物では、たった一つの受精卵が細胞分裂を重ね、無数の細胞からなる生物個体を形成するが、その

分裂の度にそれぞれのオルガネラも倍化されることでその量的恒常性が保たれる。高等動物においては、それぞれ機能の異なる細胞種によって各オルガネラ量の多寡は異なるが、同一細胞種における各オルガネラ量は驚くほど類似している。例えば、膵臓外分泌細胞群ほどの細胞も同様に非常に発達した小胞体を備えており、肝細胞群や心筋細胞群では一様に大量に増殖したミトコンドリアが見て取れる。これらの事実は、細胞にはオルガネラ量の不足を感知してその合成を促す機構の存在すること、さらに、各細胞の要求に応じてオルガネラ量を調節する仕組みが存在することを示唆している。しかし、このようなオルガネラ量補償機構については、その存在が示唆されているにも関わらず、十分には研究されていない。

2. 研究の目的

本研究では、それぞれのオルガネラに対して存在すると想定される量的補償機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

もし、細胞にオルガネラ量補償機構が存在するのであれば、ある特定のオルガネラを選択的に減少させた場合、その機構が活性化されることが見込まれる。そのため、ある任意のタイミングで人為的に特定のオルガネラ量を減少させることさえできれば、オルガネラ量補償機構の解析が可能になると考えられる。しかしながら、現在利用できる技術には、特定のオルガネラを物理的に減少させる手段が存在しなかった。

近年、細胞内のほぼ全種類のオルガネラはオートファジーによる自食作用で消化されることが報告されている。特にミトコンドリアについては、傷害をおった異常なミトコンドリアが選択的にオートファジーによって消化されることが明らかとなっている。このような情報から、私はオルガネラを選択的に消化することが可能であると考える。そのような特異的オルガネラノックダウン法を開発することでオルガネラ量補償機構を解析する計画を立てた。

4. 研究成果

平成 23 年度においては、オルガネラノックダウン法を開発を行った。オートファジーを用いたオルガネラノックダウン法において、特定のオルガネラに局在化するオートファジー受容体の作製が必須となる。本研究では、オートファジー受容体の候補と

して p62 を用いることにした。p62 はサイト



図1 オートファジー受容体 p62のドメイン構造.
C末端のUBAドメインでポリユビキチンと結合し、PB1ドメインでホモ二量体化することでユビキチン化タンパク質を集合させる。さらに、LIR (LC3 interacting region) でオートファゴソーム膜上のLC3と結合することで、集合させたユビキチン化タンパク質のオートファジーによる消化を促進する。

ゾルに分布するタンパク質であることから、p62 をオルガネラのオートファゴソーム受容体として用いるためには p62 を目的のオルガネラ膜上に集積する必要がある。そこで、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの標的化シグナルをクロニングし、それらを利用することで p62 を各オルガネラ膜上に集積させるシステムを作製した。免疫染色法によって、それぞれのオルガネラに p62 を各オルガネラに標的化出来たことを確認している。

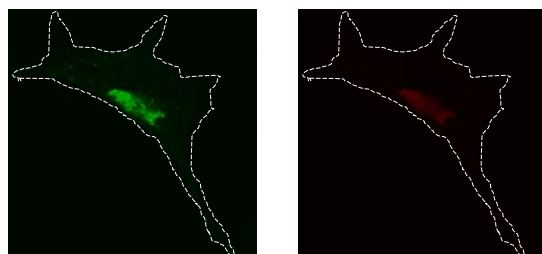
24 年度には、その効用を検証するために、p62 を小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームに標的化させたところ、それぞれのオルガネラに非常に効率的に局在化させられることを確認した。その際、オルガネラ量の減少が起こるかどうかを免疫染色法やウェスタン解析によって検証したが、有意な変化は見いだせなかった。

オートファゴソームは細胞がアミノ酸飢餓状態になった時にその合成が促進される。p62 をオルガネラ膜に標的化させた際にオルガネラの減少が起こらなかった原因は、細胞内で生じるオートファゴソームの数が少ないのではないかと私は考え、一般的にオートファジーを誘導するアミノ酸飢餓状態に変化を観察したが、この条件でも p62 をオルガネラに局在させた場合でも、そうでない場合と有意な差は見いだされなかった。

そこで発想を変え、オートファゴソーム膜の表面に局在する LC3 が、オルガネラ膜に親和性をもつようにしたシステムを構築した。このシステムを用いて、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームについてオルガネラノックダウンが機能するかを検証したところ、ゴルジ体とペルオキシソームについて、オルガネラが減少する傾向が見出された。現時点では、このオ

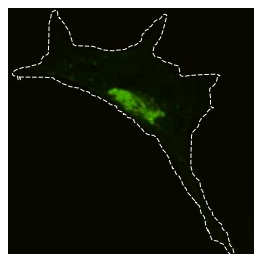
ルガネラの量が減少する傾向は細胞によって差があり、その程度も大きくはなかったが、プロトタイプとしてのオルガネラノックダウン法は確立できたものと考えている。

今後は、更なる改良を加え、オルガネラノックダウン法の効率を上げることで、オルガネラ量補償機構の解析が可能になるものと考えている。



オートファジー受容体

ゴルジ体マーカー



重ね合わせ像

図2 オートファジー受容体のオルガネラ膜への標的化. ゴルジ体への標的化シグナルを持つオートファジー受容体(緑)の細胞内局在を確認したところ、ゴルジ体マーカー(赤)と共局在していた。小胞体やミトコンドリア、ペルオキシソームへのオートファジー受容体の標的化も確認している。

本研究課題で構築しているオルガネラノックダウン法は、オルガネラ量補償機構の中でもオルガネラの不足を補う機構を活性化するための方法として利用することができる。オルガネラの量的恒常性を保つためには、増加だけではなく、反対に増加しすぎたオルガネラを適度に減少させることも重要になるはずである。この増えすぎたオルガネラを適度に減少させる未知の機構も今後の研究対象として取り組む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

①柳谷耕太, 河野憲二, 小胞体膜上で起こるスプライシングに秘められた巧妙な仕組み,

化学と生物, 50, 633-640, 2012 査読なし

②柳谷耕太, 河野憲二, 小胞体膜状で起こるスプライシングの巧妙な仕組み, 生化学, 84, 290-294, 2012 査読なし

③柳谷耕太, 河野憲二, 小胞体膜上で起こるスプライシングの洗練されたメカニズム, 実験医学, 29, 1772-1776, 2011, 査読なし

④Shinya, S., Kadokura, H., Imagawa, Y., Inoue, M., Yanagitani, K., and Kohno, K. Reconstitution and characterization of the unconventional slicing of XBP1u mRNA in vitro. Nuc. Acids Res. 39, 5245-5254, 2011, 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkr132

〔学会発表〕(計 3件)

①柳谷耕太, 小胞体膜上で起こるスプライシングの巧妙な仕組み, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」第6回セミナー(招待講演), 2012. 3. 8, 京都産業大学

②門井浩二, 柳谷耕太, 河野憲二, 哺乳動物細胞で機能する翻訳停止配列の開発と応用, 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.15, 横浜

③Kota Yanagitani, Yukiko Yokota, Yukio Kimata, Hiroshi Kadokura, Kenji Kohno, Ribosomal Stalling Promotes mRNA Splicing on the Endoplasmic Reticulum, 第34回日本分子生物学会年会(招待講演), 2011.12.15, 横浜

④柳谷耕太, 小胞体膜上で起こる mRNA スプライシングにおける翻訳停止反応の役割, 第63回日本細胞生物学会大会, 2011.12.15, 札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳谷 耕太 (YANAGITANI KOTA)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・特任助教
研究者番号：70614775

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし