

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291029

研究課題名(和文) 小胞体MAMの形成および機能におけるsyntaxin17の役割

研究課題名(英文) Roles of syntaxin 17 in the formation and function of the mitochondria-associated ER membrane

研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, MITSUO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：MAM (mitochondria-associated membrane) は小胞体サブドメインの一つであり、様々な細胞内現象に關与する。申請者らはsyntaxin 17 (Syn17) が以下の機能を持つことを明らかにした。(1) Syn17はミトコンドリア分裂因子Drp1の局在と活性を調節し、ミトコンドリアの分裂を促す。(2) Syn17は小胞体Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスを制御する。(3) Syn17はDrp1を脱リン酸化するホスファターゼPGAM5の局在を調節する。(4) Syn17と微小管およびDrp1の結合はMAP1B-LC1によって仲介されている。(5) レジオネラは感染時にSyn17を分解する。

研究成果の概要(英文)：The MAM (mitochondria-associated membrane) is one of the subdomains of the ER and participates in various cellular phenomena. We found that syntaxin 17 (Syn17) is localized in the MAM and plays the following functions: (1) Syn17 promotes mitochondrial fission by defining the localization and activity of the mitochondrial fission factor Drp1. (2) Syn17 regulates Ca<sup>2+</sup> homeostasis of the ER. (3) Syn17 regulates the localization of PGAM5, a protein phosphatase for Drp1. (4) MAP1B-LC1 mediates the link of Syn17 with microtubules and Drp1. (5) Upon infection, Legionella degrades Syn17, and one of its effectors is responsible for this degradation.

研究分野：機能生物化学

キーワード：小胞体 ミトコンドリア syntaxin17 レジオネラ 神経変性疾患

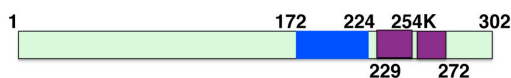
## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞全体に広がる膜構造であり、いくつものサブドメインをもち、種々のオルガネラと接している。MAM (mitochondria-associated membrane) も小胞体サブドメインの一つであり、脂質の合成とミトコンドリアへの輸送、小胞体からミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>の移動などに関与する。

申請者らは、小胞体の膜融合装置 (SNAREタンパク質) の研究を進めてきた (多賀谷 (2010) 生体の科学, 61, 209)。SNAREにおいて中心的役割を担う分子種はsyntaxin (Syn) であるが、小胞体にはSyn18、5L、17の三種が存在する。これらのタンパク質は膜融合以外に、サブドメインの構築にも関与すると考えられ、Syn18は滑面小胞体の構造維持 (Iinuma et al. (2009) J. Cell Sci. 122, 1680)、Syn5L (42-kDa form) は微小管と小胞体の連結 (Miyazaki et al. (2012) J. Cell Sci. 125, 5658) に関与する。Syn17については、最近研究をスタートさせ、Syn17がMAMに局在していること、さらにSyn17の過剰発現によって、管状の膜構造の形成が誘起されることを見出した。

ミトコンドリアの形態は融合と分裂によってダイナミックに変化するが、その形態と機能は密接に関連している。分裂はDrp1と呼ばれるダイナミンに類似したGTPaseによって行われているが、2011年に、米国コロラド大学のVoeltzらは高分解能の顕微鏡画像の解析から、MAMがミトコンドリアの分裂部位を決定しているという仮説を提唱した (Friedman et al. (2011) Science 334, 358)。

申請者らは、siRNAによるSyn17の発現抑制によって分裂が抑制され、ミトコンドリアが伸張することを見出した。Syn17は膜融合を司るSNAREドメインの後に、中央部分がLysによって分断された44アミノ酸の疎水性膜ドメイン (HMD) を持つ (下図: 青がSNAREドメイン、紫色はHMD)。通常のSNAREのTMDは18~25



個の疎水性アミノ酸であり、この点でSyn17は他のSynとは大きく異なる。ミトコンドリアの分裂は、SNAREドメインを欠いた変異体 (229-302アミノ酸断片) においても促進されることから、Syn17のミトコンドリア分裂活性は膜融合活性とは別の働きによるものと考えられる。

近年、MAM は様々な細胞内現象に関与していることが判明しつつある。飢餓時において形成されるオートファゴソームはMAMにおいて形成され、この形成にはSyn17が関与する。また、MAMにはγ-secretaseが存在し、MAMにおけるγ-secretaseの活性変化がアルツハイマー病発症の主因という仮説が提唱されている。さらにMAMはサイトメガロウイルスやC型肝炎ウイルスの感染とも関連している。申請者らは、ごく最近、レジオネラ菌が

感染後にSyn17を分解することを見出ししている。それゆえMAMの研究は、神経変性疾患や感染等の医学的見地からも極めて重要な研究である。

## 2. 研究の目的

MAMは、ミトコンドリアに近接 (間隙10-25nm) する小胞体サブドメインであり、ミトコンドリアと連携して脂質合成やCa<sup>2+</sup>シグナリングを司る以外に様々な細胞内現象に関与する。申請者らは、Syn17がMAMに存在し、MAM構造の形成およびミトコンドリアの分裂を制御する決定的な因子であることを示唆する結果を得た。本申請研究では、Syn17によるミトコンドリア分裂の制御機構を解明し、またSyn17を足がかりとし、MAMの構築機構、MAMによるミトコンドリアの分裂制御機構を明らかにする。さらにレジオネラ菌感染におけるMAM (Syn17) の役割についても解析を進め、MAMの構造と機能を支える分子基盤を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体とプラスミド

Syn17抗体作製のための抗原は、HMD以降を欠失させたSyn17断片にGSTタグを付加し、大腸菌で発現させた。他の抗体は市販品を用いた。動物細胞発現プラスミドは、GFPまたはFLAGタグが付くものを主に用いた。ミトコンドリアのダイナミクス測定には、Case Western Reserve大学のXiongwei Zhu博士から分与されたMito-Dendra2を用いた。

### (2) 細胞培養

培養細胞は多くの場合、HeLa細胞を用いたが、結合実験には293T細胞を用いた。RNAiは合成オリゴRNAを用いて行った。複数のオリゴRNAを用いるか、あるいはオリゴRNA耐性のcDNAを発現させて、発現抑制の効果が特異的であることを検証した。

### (3) 顕微鏡による解析

蛍光顕微鏡解析にはオリンパスfluoview 300あるいは1000を用いた。電子顕微鏡解析は名古屋大学医学研究科の藤本豊士博士、程晶磊博士と工学院大学の馬場美鈴博士に行っていた。

### (4) レジオネラ変異株

Yale大学のCraig Roy博士から分与されたものを用いた。

### (5) 定量

蛍光画像の定量はImageJ (NIH) を利用した。実験結果で得られた数値を平均し、平均値±SEMで表示した。

## 4. 研究成果

### (1) Syn17によるミトコンドリア分裂の調節

Syn17は主に2つの機構でミトコンドリア分裂因子Drp1の局在と活性を調節していることが明らかとなった。第一の機構はSyn17とDrp1の直接の結合であり、この結合にはDrp1がGTP型である必要があり、また微小管およびMAM

とミトコンドリアの繫留が必須である。Drp1は重合してミトコンドリア外膜に巻き付き、GTPの加水分解に伴ってミトコンドリアの分裂を引き起こすが、Syn17はこの巻き付き（重合過程）を補助していると考えられる。第二の機構は、プロテインキナーゼAによるDrp1の阻害的リン酸化の抑制である。Syn17は、プロテインキナーゼAをミトコンドリア膜にアンカーする働きを持つRab32と競合し、Drp1のリン酸化を抑制する。

Syn17は、オートファジーに関与することが報告されているが、飢餓誘導に伴い、Syn17はDrp1から解離し、ATG14（オートファゴソーム形成因子）と結合することが判明した。後述するように、Syn17がDrp1と結合するか、ATG14と結合するかはMAP1B-LC1が調節している。

(2) Syn17による小胞体Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの調節

小胞体貯蔵Ca<sup>2+</sup>はMAMから放出され、放出されたCa<sup>2+</sup>はミトコンドリアに取り込まれてTCAサイクルの活性化やアポトーシスを引き起こす。Syn17を発現抑制した細胞では小胞体内のCa<sup>2+</sup>濃度が低下し、一方、過剰発現した細胞ではCa<sup>2+</sup>濃度が上昇していた。これらの結果はSyn17が小胞体内のカルシウムホメオスタシスを調節していることを示唆する。

(3) Syn17複合体の同定

FLAG-Syn17の安定発現細胞を構築し、免疫沈降によってSyn17結合タンパク質を多数同定した。その多くは、小胞体およびミトコンドリアに存在するタンパク質であり、またラフトに局在することが報告されているタンパク質も含まれていた。さらに、神経変性疾患に関与することが報告されているタンパク質も含まれていた。それらの中からPGAM5とMAP1B-LC1について解析した。

①PGAM5

PGAM5はミトコンドリアに存在するタンパク質ホスファターゼであり、Ask1の脱リン酸化を通してアポトーシスを調節する以外に、Drp1の脱リン酸化を介してネクロトーシスに関与することが報告されている。Syn17の発現を抑制するとミトコンドリアに均一に分布していたPGAM5が凝集した。またPGAM5とDrp1の結合もSyn17の発現抑制によって消失した。以上の結果は、Syn17がPGAM5の局在を調節していることを示唆している。それゆえ、Syn17はRab32と競合することによってDrp1のリン酸化を抑制し、またPGAM5をDrp1に近接させることで脱リン酸化を促進していると考えられる。

②MAP1B-LC1

MAP1B-LC1 (microtubule-associated protein 1B-light chain 1) は、MAP1Bのタンパク質分解で重鎖とともに生成する分子であ

り、微小管の安定化に働くと共に、アクチンとも相互作用する。MAP1B-LC1は神経系細胞において高発現していることが報告されていたが、発現を調べたところ、HeLa細胞を含む培養細胞一般に広く発現していることが判明した。Syn17とDrp1の結合およびSyn17と微小管の結合はMAP1B-LC1に依存しており、MAP1B-LC1の発現を抑制すると、富栄養状態であるにもかかわらずSyn17はDrp1および微小管から遊離し、ATG14と結合してオートファゴソームを蓄積させた。一方、MAP1B-LC1を過剰発現させると栄養飢餓においてもオートファゴソームは形成されなかった。これらの結果は、富栄養状態においてMAP1B-LC1はSyn17とDrp1の結合を仲介し、Syn17がATG14と結合することを抑制していることを示唆している。栄養飢餓状態にするとMAP1B-LC1はSyn17から解離したので、この解離によってSyn17がATG14と結合できるようになったと考えられる。栄養飢餓時にはMAP1B-LC1は脱リン酸化され、脱リン酸化型を模倣したMAP1B-LC1変異体はSyn17との結合が弱まり、また過剰発現しても栄養飢餓に伴うオートファゴソームの形成を阻害しなかった。

(4) レジオネラ菌感染におけるSyn17の分解

レジオネラ菌は細胞内に侵入後、小胞体由来輸送小胞（本来はゴルジ体へ輸送される）を引き寄せ、LCV (Legionella-containing vacuole) を形成し、さらに小胞体内に侵入して増殖する。レジオネラ感染に伴い、Syn17が分解されるという現象を見出した。一群の遺伝子領域を欠損しているレジオネラ変異体を利用してSyn17の分解に関与する遺伝子領域を同定した。その領域には複数の遺伝子が存在していたので、各遺伝子を細胞に発現させSyn17の分解を司る遺伝子の同定に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Inoue, H., Matsuzaki, Y., Tanaka, A., Hosoi, K., Ichimura, K., Arasaki, K., Wakana, Y., Asano, K., Tanaka, M., Okuzaki, D., Yamamoto, A., Tani, K., and Tagaya, M. (2015)  $\gamma$ -SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. *J. Cell Sci.* **128**, 2781-2794 (2015). 査読有
- ② Arasaki, K., Shimizu, H., Mogari, H., Nishida, N., Hirota, N., Furuno, A., Kudo, Y., Baba, M., Baba, N., Cheng, J., Fujimoto, T., Ishihara, N.,

- Ortiz-Sandoval, C., Barlow, L. D., Raturi, A., Dohmae, N., Wakana, Y., Inoue, H., Tani, K., Dacks, J. B., Simmen, T., and Tagaya, M. Role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev. Cell* **32**, 304-317 (2015). 査読有
- ③ 多賀谷光男、変わりゆくオルガネラ間コミュニケーションの概念、*実験医学*、33、羊土社、2546-2552 (2015). 査読無
- ④ 多賀谷光男、新崎恒平、谷佳津子 (2015) MAM-ミトコンドリア機能を制御する小胞体サブドメイン、*実験医学*、33、羊土社、2553-2559 (2015). 査読無
- ⑤ Tagaya, M., Arakaki, K., Inoue, H., and Kimura, H. Moonlighting functions of the NRZ (mammalian Dsl1) complex. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 25 (2014). 査読有
- ⑥ Noda, C., Kimura, H., Arasaki, K., Matsushita, M., Yamamoto, A., Wakana, Y., Inoue, H., and Tagaya, M. Valosin-containing protein-interacting membrane protein (VIMP) links the endoplasmic reticulum with microtubules in concert with cytoskeleton-linking membrane protein (CLIMP)-63. *J. Biol. Chem.* **289**, 24304-24313 (2014). 査読有
- ⑦ Arasaki, K., Takagi, D., Furuno, A., Sohda, M., Misumi, Y., Wakana, Y., Inoue, H., and Tagaya, M. A new role for RINT-1 in SNARE complex assembly at the trans-Golgi network in coordination with the COG complex. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 2907-2917 (2013). 査読有
- ⑧ He, S., Ni, D., Ma, B., Lee, J. H., Zhang, T., Ghozalli, I., Pirooz, S. D., Zhao, Z., Bharatham, N., Li, B., Oh, S., Lee, W. H., Takahashi, Y., Wang, H. G., Minassian, A., Feng, P., Deretic, V., Pepperkok, R., Tagaya, M., Yoon, H. S., and Liang, C. PtdIns(3)P-bound UVRAG coordinates Golgi-ER retrograde and Atg9 transport by differential interactions with the ER tether and the beclin 1 complex. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1206-1219 (2013). 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
- ① Kohei Arasaki, Masashi Sugo, Naohiko Hirota, Naoshi Dohmae, Carolina Ortiz-Sandoval, Thomas Simmen, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori, and Mitsuo Tagaya, Regulation of mitochondrial division and mitophagy by syntaxin 17, *Multifaceted Mitochondria*, July 2015, Chicago
- ② 須合真士、新崎恒平、堂前直、多賀谷光男、Syntaxin17 は Drp1 の脱リン酸化酵素である PGAM5 の局在を調節する、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015/6-7、東京
- ③ 三上優美、ハーベイ ジェームス、ロイクレイグ、多賀谷光男、新崎恒平、Syntaxin17 の分解に関わるレジオネラエフェクターの探索、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015/6-7、東京
- ④ 長島晴輝、新崎恒平、黒澤優里、堂前直、多賀谷光男、MAP1B-LC1 は syntaxin17 との相互作用を介してオートファジーを制御する、第 38 回日本分子生物学会年会-第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015/12、神戸
- ⑤ 新崎恒平、川端美緒、野内優、多賀谷光男、レジオネラ菌の宿主小胞体への移行及び定着化の機構、第 87 回日本生化学会大会、2014/10、京都 (招待講演)
- ⑥ 須合真士、新崎恒平、堂前直、多賀谷光男、PGAM5 による Drp1 の脱リン酸化への Syntaxin17 の関与、第 87 回日本生化学会大会、2014/10、京都
- ⑦ 新崎恒平、川端美緒、加藤郁子、多賀谷光男、レジオネラ感染に関わる Rab タンパク質の同定及びレジオネラ菌の小胞体定着化機構、第 88 回日本細菌学会総会、2015/3、岐阜 (招待講演)
- ⑧ 川端美緒、加藤郁子、多賀谷光男、新崎恒平、レジオネラ菌による Rab5 コピキチン化機構の解明、第 88 回日本細菌学会総会、2015/3、岐阜
- ⑨ 加藤郁子、川端美緒、新崎恒平、多賀谷光男、レジオネラ菌は小胞体内での移行に Rab4 及び Rab10 を利用する、第 88 回日本細菌学会総会、2015/3、岐阜
- ⑩ 新崎恒平、高木大地、古野暁子、相田美和、三角佳生、多賀谷光男、RINT-1 の新たな役割: COG 複合体との協調による TGN 局在 SNARE 複合体の会合の調節、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013/6、名古屋
- ⑪ 多賀谷光男、新崎恒平、小胞体とミトコンドリアの接触部位における syntaxin17 の役割、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜 (招待講演)
- ⑫ 青木瑤子、渡邊卓也、多賀谷光男、井上弘樹、浸潤突起形成に関わる SNARE タンパク質の探索、第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12、神戸
- ⑬ 川端美緒、加藤郁子、新崎恒平、レジオネラ菌の小胞体への侵入には Rab6 が機能する、第 87 回日本細菌学会総会、2014/3、東京
- ⑭ 加藤郁子、川端美緒、新崎恒平、Rab4 及び Rab10 のレジオネラ感染における機能解析、第 87 回日本細菌学会総会、2014/3、東京
- [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pathos.ls.toyaku.ac.jp/> 分子細胞  
生物学-1/

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, Mitsuo)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：30179569

### (2) 研究分担者

井上 弘樹 (INOUE, Hiroki)  
東京薬科大学・生命科学部・講師  
研究者番号：10294448

橋本 吉民 (HASHIMOTO, Yoshitami)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：50616761

新崎 恒平 (ARASAKI, Kohei)  
東京薬科大学・生命科学部・講師  
研究者番号：70609990