

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650034

研究課題名(和文)小胞体・ゴルジ装置間のコンタクト部位の可視化と動態解析

研究課題名(英文) Visualizing membrane contact site between the ER and Golgi to analyze the functional kinetics

研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA, YUSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：00294124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞での小胞体・ゴルジ装置間の膜コンタクト部位の可視化を行なうために、コンタクト部位では小胞体膜とゴルジ装置膜がごく近傍に存在するという点に着眼し、物理的な近接性をProximity Ligation Assay法にて証明した。さらにsplit-DHFRを用いた独創的なシステムを構築しリアルタイムに生細胞で膜コンタクト部位の可視化に試みた。その結果、可視化にあと一步に迫る成果を現在得ている。感度を改善することで、可視化されたコンタクト部位の経時的定量的観察が可能になり、様々な刺激に対する動態を経時的定量的に観察することでコレステロールなどの輸送動態・調節機構を明らかに出来ることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：As a first step to visualize speculated membrane contact sites (MCS) between intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, I proved the presence of the sites where these organelles membranes are closely apposed by Proximity Ligation Assay. Next, I tried to establish a split-DHFR system for real-time monitoring of MCS in vivo. At present, fairly good results are obtained and it is expected in near future to achieve the original goal of visualizing MCS in vivo by increasing the sensitivities and to clarify the mechanisms by which the transport of cholesterol is regulated.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜コンタクト部位 ゴルジ装置 コレステロール スプリットタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 応募者は以前、ゴルジ装置に局在する新規イオンチャネル GPHR を同定し、その異常でゴルジ装置内腔の酸性化障害とその2次的にタンパク質輸送遅滞と糖鎖修飾異常が起こることを報告した (*Nat. Cell Biol.*, (2008) 10, 1135-1145)。その後の詳細な解析により、GPHR の欠損細胞で細胞内コレステロール量の低下が起こることを見いだした。これは、コレステロールの生合成低下のためではなくコレステロール輸送に障害を生じ、その結果、その分布異常がおこりコレステロール量の低下が生じた可能性を示唆する結果を得た。

(2) 小胞体膜と他のオルガネラ膜の非常に近接した(10-30nm)部分は膜コンタクト部位と呼ばれ、脂質やイオンの小胞非依存的輸送に重要な役割を果たし、コレステロールは小胞体とゴルジ装置間の膜コンタクト部位を介して小胞体からゴルジ装置を経て細胞膜に輸送されていると考えられている。これは小胞体・ゴルジ装置間の小胞輸送を阻害しても細胞膜への輸送はほとんど阻害されないことから小胞非依存的輸送が主要な輸送経路であることに拠る。また、膜コンタクト部位が存在する根拠は OSBP や CERT 等の多くの脂質輸送関連タンパク質が小胞体結合モチーフ (FFAT) とゴルジ装置結合ドメイン (PH) の両方を持ち、近接した膜間で脂質を輸送する方が効率的であると考えられる、電顕トモグラフィーで実際に小胞体とゴルジ装置が近接している部位がある、ことなどに拠るが、膜コンタクト部位の構造や形成原理は、コンタクト部位特異的マーカータンパク質の欠如によりほとんど解明されていない。よって独自のアイデアでコンタクト部位を可視化し、膜コンタクト部位の動態を解析することは、ゴルジ装置の酸性化障害によるコレステロール量・分布異常のメカニズム解明に繋がると同時に、脂質一般に共通な輸送調節機構の解明におおいに貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

コンタクト部位と呼ばれる、2つの異なるオルガネラの膜が非常に接近すること

で物質の効率的な小胞非依存的輸送を行なう特殊な膜ドメインが存在すると提唱されている。合成の場合である小胞体とゴルジ装置間のコンタクト部位は、コレステロールやセラミドの輸送において重要な役割を果たしていると考えられているが、その実体は未だ全く不明である。当応募課題の"野心的"な研究目的は、独創的なアイデアを用いて、このコンタクト部位を可視化することでその実体を明らかにし、コレステロールの輸送機構を解明することである。

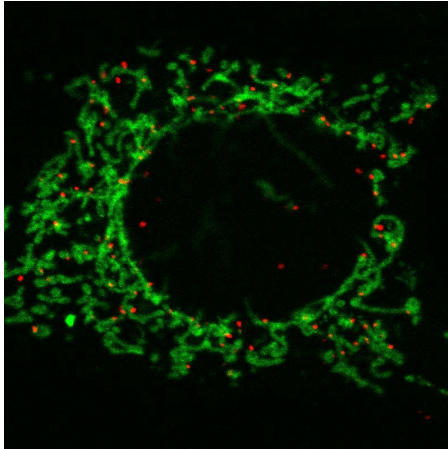
3. 研究の方法

主たる研究目的である「生細胞での小胞体・ゴルジ装置間のコンタクト部位の可視化」を行なうために、「コンタクト部位では小胞体膜とゴルジ装置膜がごく近傍に存在する」という点に着眼し、物理的な近接性を検出する split-protein システムの作製を試み、会合状態をリアルタイムに観察できることを最終目的とする。まず、その前段階として異なるオルガネラ間が接近している場所が細胞内に存在するかどうか確認するために Proximity Ligation Assay (PLA) 法を用いる。PLA 法で確認できれば、split-protein システムを構築する。次に可視化されたコンタクト部位や OSBP の様々な刺激に対する動態キネティクスを、FRAP などを用いて、経時的定量的に観察することでコレステロールの輸送動態・調節機構を明らかにする。更にこのシステムで検出されたコンタクト部位を電顕での観察に応用することで、コンタクト部位の形態・構造の解析を行ない、コンタクト部位の理解を一層深める。

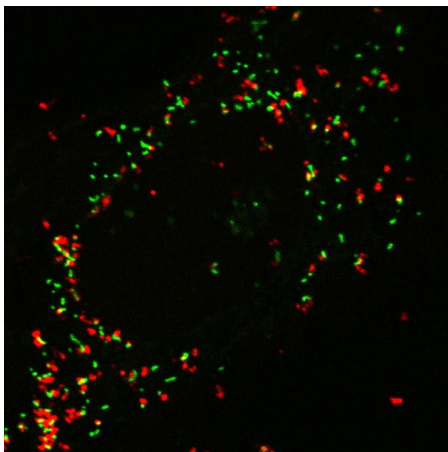
4. 研究成果

まず、PLA 法を用いて膜コンタクト部位の存在を確認した。そのために、それぞれのオルガネラに特異的に発現する split タンパク質を構築した。小胞体には DPM3、VAPA、SAC1、ゴルジ装置には SMS1、ペルオキシソームには PMP22、ミトコンドリアには mitAKAP1 タンパク質の全長または一部分とタグペプチドまたは GFP タンパク質の融合タンパク質を作製した。タグペプチドまたは GFP タンパク質に対する抗体を用いて PLA アッセイを施行した(次頁)。

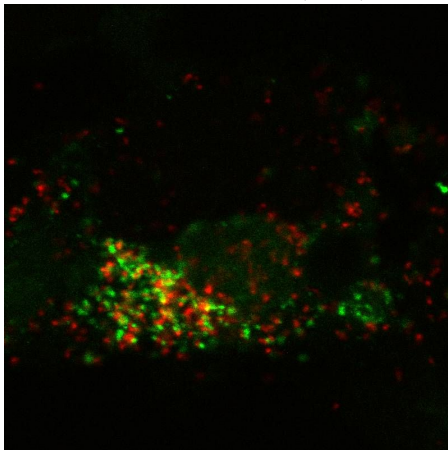
緑：ミトコンドリア
赤：小胞体との近接部位 (PLA)



緑：ペルオキシソーム
赤：小胞体との近接部位 (PLA)



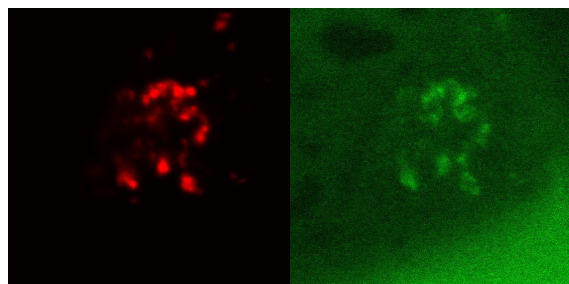
緑：ゴルジ装置
赤：小胞体との近接部位 (PLA)



PLA 法によりこれらの split-protein を用いることで膜コンタクトサイトが検出できることが確認できたので、次は生細胞のリアルタイムな検出のためのシステム構築を行った。申請時には、split-GFP または split-luciferase を用いることを想定して

いたが、その後、その領域の専門家と相談したところ、split-GFP は感度が高いがタンパク片が結合した後蛍光性を持つためのフォールディングに数十分～時間を要しリアルタイムの観察には向いていない、split-luciferase はリアルタイムには適応するが感度的に現時点のマテリアルでは難しい、との指摘を受け、split-DHFR (dehydrofolate receptor) のシステムを採用することにした。2つの分割された DHFR ペプチド片が近接し正常な DHFR として機能するとそのアンタゴニストリガンドのメトトレキサートを結合できるようになる。メトトレキサートには蛍光物質が付加してある (蛍光メトトレキサート: fMTX) ので split-peptides の結合をリアルタイムに検出できることになる。

PLA 法の時に用いたノウハウを使って様々なコンストラクトを構築しその機能を検討した。それらの分割片に rapamycin に結合できる FKBP と FRB ドメインを挿入することで近接に存在する分割片において rapamycin で FKBP-FRB-Rapamycin 複合体を強制的に形成させ fMTX の結合ならびに膜コンタクト部位形成の確認コントロールとして用いた。その結果、rapamycin 添加によって生細胞において fMTX の膜コンタクト部位への結合が確認された。



赤：ゴルジ装置
緑：fMTX 染色

同様の fMTX 染色の膜コンタクト部位への局在はミトコンドリア、ペルオキシソームにおいて確認できた。

現在の問題点としては、内因性の膜コンタクト部位の可視化にはまだ成功していないということである。このための改善点として、fMTX の蛍光輝度の改善と内因性 DHFR の除去による fMTX の感度の改善である。現在の fMTX は fluorescein が使われているが、光子量率、光褪色に対する安定

性とも十分ではなく、以前入手可能であった alexa488 色素への変更が可能になればかなり感度を改善できると思われる。また、最近内因性 DHFR を遺伝子破壊することにより fMTX に対する感度を大幅に改善できることがわかった。このシステムでは flow cytometry を用いればコレステロール除去により膜コンタクト部位の増強形成を確認することが出来た。現在、蛍光顕微鏡でこの条件化で実際に膜コンタクト部位が可視か出来るか検討中である。

以上の改善によりリアルタイムにコンタクト部位を可視化出来れば様々な刺激に対する動態を、経時的定量的に観察することでコレステロールなどの輸送動態・調節機構を明らかに出来ることが期待できる。

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)

[学会発表](計 3件)

前田 裕輔、奥崎 大介、木下 タロウ：
膜コンタクト部位の可視化および定量化による細胞内コレステロール輸送の調節機構の解明(仮タイトル)、第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 15 日 (京都)(発表確定)
前田 裕輔：ゴルジ装置の酸性環境によるコレステロール代謝の調節機構の解明 第25回小野医学研究財団研究成果発表会、2014年6月7日 (大阪)
前田 裕輔、奥崎 大介、木下 タロウ：
ゴルジ装置の酸性環境による細胞内コレステロールの生合成・輸送の調節 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3～5日 (神戸)

[その他]

ホームページ等

免疫不全疾患研究分野へようこそ!

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/en-eki-huzen/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 裕輔 (MAEDA YUSUKE)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：00294124