

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650060

研究課題名(和文)ペルオキシソーム - 小胞体間の膜接触部位の構成蛋白質の同定

研究課題名(英文)Identification of proteins involved in membrane contact sites between peroxisome and ER

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

研究成果の概要(和文)：哺乳類細胞のペルオキシソーム - 小胞体間に近接部位が存在することを、Proximity Ligation Assayという方法を用いて証明した。次に、ペルオキシソーム - 小胞体間の膜接触部位の変異細胞が薬剤により濃縮できるかを検定したが最適薬剤濃度をHAP1において得ることができなかったため細胞をHAP1からMEF細胞に変更し最適薬剤濃度を得た。更に分割タンパク質を用いた膜接触部位を定量化する新しい方法を樹立した。また、新たな変異細胞の樹立方法として、ゲノムワイドなCas9/CRISPR gRNA libraryを使用した。現在それらの方法を組み合わせ、膜接触部位の変異細胞を樹立中である。

研究成果の概要(英文)：We proved the presence of local area in mammalian cells, where peroxisome and endoplasmic reticulum membranes are closely positioned, by Proximity Ligation Assay method. Next, we tried to obtain optimal drug concentration to enrich mutant cells in which membrane contact sites (MCS) between these organelles are impaired, and the concentration was decided in MEF but not HAP1 cells. To use MEF cells, we established a new method that can directly quantify the amount of MCS in living cells by FACS using split proteins. Moreover, we used genome-wide Cas9/CRISPR gRNA library in addition to exon-trapping system. We are currently establishing new MCS mutant cells by various combination of these methods.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ形成・動態 膜接触場 ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

- 膜接触部位 (Membrane contact site; 以下 MCS と記すこととする) は、2つの異なったオルガネラ (通常一方は小胞体でありもう一方は残りの様々なオルガネラである) の膜が非常に接近し (10nm から 30nm)、脂質やイオンの小胞非依存的・ATP 非依存的輸送を行なう特殊な膜ドメインであると提唱されているが、哺乳類細胞においてその実体 (構成タンパク質など) はほとんど解明されていない。
- ペルオキシソームはアルキル(アシル)リン脂質生合成に於いてアルコール型脂肪鎖を取り込みアルキルリン脂質中間体を生成する唯一のオルガネラであるが、中間体 1-アルキルジヒドロキシアセトンリン酸までであり、完成型アルキル(アシル)リン脂質になるためには小胞体に輸送されジアシルリン脂質同様の修飾を受ける必要がある。この脂質中間体がペルオキシソームから小胞体へ輸送される機序は判っていないが、他の脂質のオルガネラ間輸送から類推して 1-アルキルジヒドロキシアセトンリン酸の小胞体への輸送は、ペルオキシソーム-小胞体間の MCS を介して行われているという推測をたてた。
- 哺乳類細胞のペルオキシソーム-小胞体間の MCS に関する報告はほとんどないが、リン脂質が小胞非依存的・ATP 非依存的にペルオキシソーム-小胞体間で輸送され得るという報告があり (PNAS., 2008, 105, 15785) MCS の存在を示唆していると考えられる。
- アルキルリン脂質の生合成異常が肢根型点状軟骨異形成症 (rhizomelic chondrodysplasia punctata; RCDP) の病因であることは知られているが、肢根型点状軟骨異形成を示す疾患の中にはまだ原因遺伝子が同定されていないものが多数存在している。小胞体とペルオキシソーム間の MCS の機能の一つがアルキルリン脂質の生合成に必須な 1-アルキル DHAP の輸送であるというアイデアが正しければ、MCS の構成蛋白質の異常が肢根型点状軟骨異形成症の原因の一つである可能性が高く、この疾患の病態解明につながり、医学的見地からも非常に卓越した成果が期待できる。
- 小胞体とペルオキシソーム間の MCS の存在を証明することは、前述のように「膜接触部位を介した ATP 非依存的脂質輸送は酵母から高等生物における小胞体と他のオルガネラ間に普遍的かつ合理的に存在するメカニズムである」という新しい重要なドグマの証明の一段階となる。

2. 研究の目的

ペルオキシソームの主な機能の一つはアルキル(アシル)リン脂質の初期段階の生合

成であり、その異常により疾患が引き起される。この中間体が完成型になるためには小胞体に輸送される必要があり、その輸送はペルオキシソーム-小胞体間の膜接触部位を介して行なわれていると推測している。オルガネラ間膜接触部位は脂質やイオンの小胞非依存的・ATP 非依存的輸送を担う特殊な膜ドメインであると提唱されているが、哺乳類細胞においてはその構成蛋白質や基質の輸送機序などはほとんど解明されておらず、その存在自体も不確実である。当応募課題の研究目的は、ペルオキシソーム-小胞体間の膜接触部位の構成蛋白質を同定し、膜接触部位がペルオキシソーム-小胞体間に存在することを証明することである。

3. 研究の方法

当応募課題遂行のために、2つの方法を組み合わせた研究計画を試みた。即ち、(1) ペルオキシソーム-小胞体膜接触部位の機能異常をもつ変異細胞の樹立と濃縮、と(2) 次世代シーケンサーによる変異細胞の原因遺伝子の網羅的同定、である。具体的には、

- STEP 1. 薬剤誘導性オルガネラ膜間人工リンカーを組み込んだ一倍体ヒト細胞 HAP1 の樹立
- STEP 2. 遺伝子 (エクソン) トラップ法を用いて上記 HAP1 の変異細胞ライブラリーの作製
- STEP 3. P90H/UV 法によるアルキルリン脂質合成欠損細胞の濃縮
- STEP 4. ラパマイシン添加によるペルオキシソーム-小胞体膜接触部位の回復 (強制誘導)
- STEP 5. P12/UV 法によるアルキルリン脂質合成正常化株の濃縮
- STEP 6. ステップ 3-5 の反復による膜接触部位機能異常細胞の濃縮
- STEP 7. 次世代シーケンサーによるトラップされた遺伝子の網羅的同定
- STEP 8. STEP 7 で同定された候補遺伝子を siRNA または CRISPR/Cas9 の系を用いて野生株で遺伝子操作し表現型の解析により MCS の構成蛋白質であることの確認

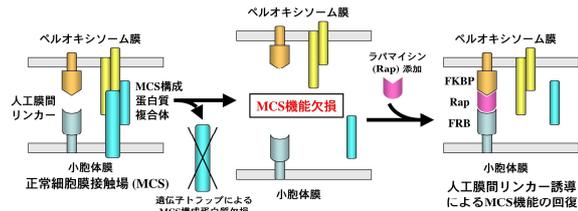
これまで哺乳類細胞で変異細胞株を作製するのは容易ではなかったが、最近作製された一倍体ヒト細胞は、一倍体が故に、遺伝子トラップ法で酵母なみに容易に変異細胞のライブラリーを作製することが可能となった。更に、遺伝子トラップ法として、レトロウイルスベクターの染色体挿入部位の偏りという問題を解消するために、偏りが少なくレトロウイルスベクターでは困難であった遺伝子をトラップできることが報告されているトランスポゾンベクターを併用する。

目的変異細胞の濃縮には2種類の薬剤選択法と膜接触部位の人工的な構築法を組み合わせる。STEP 3 の P90H/UV 法は、細胞に 9-(1'-Pyrine)nonanol (P90H) を取り込ませ後 UV 照射をすることで、ペルオキシソーム機能欠損細胞を濃縮する方法であり、多くの Zellweger 症候群や RCDP のモデル変異細胞の樹立に用いられてきた方法である。P90H はア

ルキルリン脂質の材料としてペルオキシソームでリン脂質中間体に組み込まれ(1-アルキル DHAP の生成)小胞体に輸送された後、完成型アルキルリン脂質になるが、UV 照射により取り込まれた P90H のピリン部分から発生するラジカルによって細胞が殺傷されるという原理に基づく。STEP 5 の 12-(1'-Pyrene)dodecanoic acid (P12)と UV 照射の組み合わせは、正確な原理は判っていないが、P90H とは逆にペルオキシソーム機能欠損細胞を特異的に殺傷するのに用いられる。プラズマローゲンを含むアルキルリン脂質の合成のためにはペルオキシソームで合成された 1-アルキル DHAP 中間体が小胞体へ輸送されなければならず、それが MCS の機能に依存しているというアイデアが正しいければ、MCS 機能欠損細胞は、ペルオキシソーム機能欠損細胞と同様、P90H/UV に抵抗性で P12/UV に対し感受性であることが期待できる。つまり、P90H/UV 処理で MCS 機能欠損細胞とペルオキシソーム機能欠損細胞の両方を正常細胞から特異的に濃縮することができる。しかしながら次に MCS 機能欠損細胞を選択的にペルオキシソーム機能欠損細胞から分離濃縮する必要が生じてくる。そのために、薬剤(ラパマイシン)誘導性オルガネラ膜間リンカーを用い、ラパマイシン添加によるペルオキシソーム-小胞体膜接触部位の人工的回復によって一時的に MCS 機能欠損細胞を正常細胞化し、P12/UV 法でペルオキシソーム機能欠損細胞のみを殺傷し MCS 機能欠損細胞を特異的に濃縮する方法を用いる(下図参照)。薬剤誘導性オルガネラ膜間リンカーはラパマイシンと同時に結合できる 2 つの蛋白質 FKBP と FRB をそれぞれペルオキシソーム(PMP22)と小胞体(SAC1)蛋白質の全長またはオルガネラ局在標的シグナルと融合したものを作製使用する。つまりラパマイシン添加(STEP4)後 P12/UV で処理する(STEP5)ことでペルオキシソーム機能欠損細胞のみを殺傷し MCS 機能欠損細胞を選択的に濃縮することができる。まとめると、STEP 3 から STEP 5 を反復することで MCS 機能欠損細胞のみを濃縮することができると予想される。

STEP 7 で、濃縮された細胞プールと濃縮前の細胞プールのゲノム DNA を開始材料として、遺伝子トラップベクターの隣接部位配列を Splinkerette と呼ばれる PCR 法で増幅し次世代シーケンサーで網羅的に解析し、濃縮していない STEP 2 の変異細胞プールの解析結果と比較する。これにより、個々の変異細胞株を限界希釈法で単離・解析することなく、濃縮変異細胞プールでトラップされている頻度の高い遺伝子を MCS 候補遺伝子として、一度のスクリーニングで多くの候補遺伝子を網羅的に同定できる。濃縮されたプールの中でも出現頻度が少なく変異細胞株の限界希釈法では検出が困難であった変異遺伝子も、次世代シーケンサーという大量の変異細胞・遺伝子を一度に解析できるシステムに

よって非常に鋭敏にその出現頻度の増加を検出でき、MCS 機能欠損の候補原因遺伝子を網羅的に同定できる。最終的に、それらの候補遺伝子が本当に MCS の構成蛋白質であるかどうかを野生株においてその遺伝子を siRNA または CRISPR/Cas9 の系を用いて遺伝子操作し表現型を解析し、またその蛋白質の発現部位を調べることで確認する。

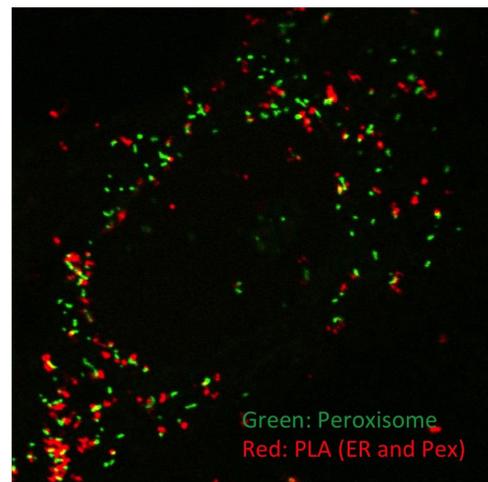


	正常細胞	ペルオキシソーム機能欠損細胞	MCS機能欠損細胞
STEP 3: P90H/UV	X	O	O
STEP 4+5: Rap + P12/UV	O	X	O

STEP 3-5の反復によってMCS機能欠損細胞のみ選択的に濃縮できる

4. 研究成果

まず、哺乳類細胞のペルオキシソーム-小胞体間に MCS が存在するという直接証明した報告がないので、その存在の可能性を物理的的近接タンパク質を検出する Proximity Ligation Assay (PLA) という方法を用いて検定した。PLA は近接した 2 つのオルガネラのマーカートンパク質に対する抗体を用いてもし両者の抗体が近接するときのみ、抗体に結合した核酸のアニールに基づく PCR 反応で高感度に近接部位を検出する優れた方法であるが、最大の欠点として固定細胞にしか用いることができない問題があるが、PLA によって実際にペルオキシソーム-小胞体間で膜近接部位を検出することができた(下図参照)。

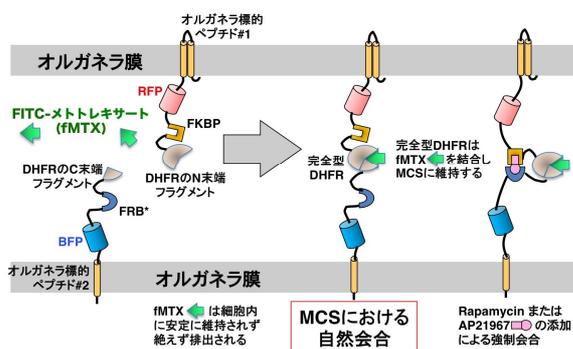


次に、研究方法で述べたように、P90H/UV 法で HAP1 細胞の変異細胞が濃縮できるかを検定した。ポジティブコントロールとして、まず PEX7 を CRISPR/Cas9 の系で遺伝子破壊してペルオキシソーム機能欠損細胞を作製した。ハムスター CHO 細胞を材料とした以前の論文では、PEX7 遺伝子欠損株を用いてこの濃縮法における最適薬剤濃度が決定された。HAP1 で同様にこの濃縮法における最適薬剤

濃度を決定する予備実験を行ったところ、確かに P90H の濃度増加や UV 照射時間の増加によって細胞を死滅させることが可能であったが、野生株を効率よく死滅させるが PEX7 欠損株を残存させることのできる至適条件を HAP1 において得ることができなかった。この結果によって、変異細胞の濃縮方法の変更を余儀なく迫られた。そこで MCS を直接可視化・定量化する新しい方法を考案した。つまり、「オルガネラ膜が接近しているところが機能的 MCS である」という発想に立脚して split-protein (分割タンパク質; または fragment complementation) を用いたシステムを構築した(図 1 参照)。

分割タンパク質としてジヒドロ葉酸還元

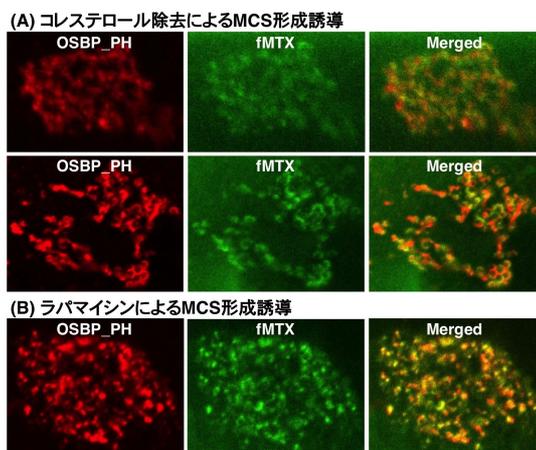
図 1: Split-Proteinシステムを用いたMCS可視化法



酵素(DHFR: dihydrofolate reductase)を用いている。DHFR の N 末端フラグメントには FKBP、RFP (赤色蛍光タンパク質) およびオルガネラ標的ペプチドが融合しており、C 末端フラグメントには FRB、BFP (青色蛍光タンパク質) および小胞体標的ペプチドが融合してある。オルガネラ標的ペプチドによって各々のタンパク質は小胞体と標的オルガネラに局在 (BFP と RFP で観察可能) するが、両者のオルガネラ膜が非常に近接する MCS では DHFR の N、C 末端が自然会合し完全型 (活性型) DHFR が形成される。また AP21967 またはラパマイシンを添加することで FKBP、FRB との複合体を強制的に形成し完全型 DHFR を生成できる。これは MCS の機能面からアプローチする時の偽陽性遺伝子の排除に非常に有効な手段として用い得ることが期待された。DHFR は、完全型特異的に、基質の葉酸のアナログであり DHFR の阻害剤であるメトトレキサート (MTX) を安定に結合する。MTX の代わりに蛍光色素 FITC が結合した MTX (fMTX) を用いることで、2 つのオルガネラの近接した部位を生細胞でリアルタイムに検出できる。実際パイロット実験として行ったゴルジ装置-小胞体間で、ゴルジ装置と共局在する MCS 像 (fMTX) をラパマイシン存在下、または非存在下で焦点レーザー顕微鏡で観察することができた(図 2 参照)。更に重要なことには、フローサイトメトリーを用いることで、MCS 形成量の定量的測定が可能であった。ペルオキシソーム-小胞体膜接触部位の定量的測定もやや改善の余地が残るものの可能で

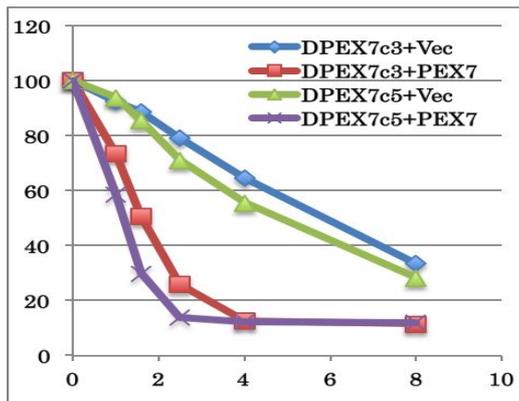
あるという結果を得た。

図 2: 小胞体-ゴルジ装置間のMCS可視化



また、もう一つの実験方法の変更点として、変異細胞の樹立方法として、最新の遺伝学的手法である genome-wide Cas9/CRISPR gRNA library を使用した。これを用いることで 2 倍体になりやすい HAP1 細胞を使う必要がなくなり、現在、HEK293 細胞と MEF 細胞を使っている。また、HAP1 細胞から HEK293 細胞と MEF 細胞への変更によって、最初の計画であった P90H/UV の濃縮法が使える可能性が生じ、事実、MEF 細胞では薬剤の至適濃度が得られた (下図参照)。

(縦軸は生存率、横軸は薬剤濃度を示す)



今後、当初の予定の HAP1 細胞を MEF 細胞に、エクソントラップを genome-wide Cas9/CRISPR gRNA library に変更する方法と、新たに split-protein を組み込んだ HEK293 細胞と genome-wide Cas9/CRISPR gRNA library の組み合わせで当初の目的であるペルオキシソーム-小胞体間の膜接触部位の構成蛋白質を同定し、膜接触部位がペルオキシソーム-小胞体間に存在することを証明する予定である。

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 1 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、第 87 回日本生化学会大会 シンポジウ
ム、2014 年 10 月 15 日、国立京都国際会館

〔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/men-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