

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893149

研究課題名(和文) SH3YL1によるトランスサイトシスの分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of transcytosis by SH3YL1

研究代表者

山本 光 (Yamamoto, Hikaru)

神戸大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：70737337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：SH3YL1が関与する細胞内小胞輸送の実体を明らかにするため、GFPタグを付加したSH3YL1を用いて、アフリカミドリザル腎上皮由来COS-1細胞におけるライブイメージングを行った。その結果、SH3YL1はSYLFドメインの脂質結合部位を介し、細胞死の直前にミトコンドリアへ局在変化することが分かった。また、その局在変化とともに、ミトコンドリア膜電位が消失することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：SH3YL1 is an evolutionarily conserved protein which contains a lipid-binding region called the SYLF (SH3yl1, Ysc84, Lsb3 and plant FYVE) domain. This study is aimed to identify an intracellular organelle whose trafficking is mediated by SH3YL1. Using COS-1 cell derived from an African green monkey kidney epithelium, we performed a live imaging of GFP-tagged human SH3YL1. It was revealed that SH3YL1 was located to mitochondria just before cell death. The lipid binding site of the SYLF domain influenced the mitochondrial localization of SH3YL1. Further, the recruitment of SH3YL1 occurred prior to the loss of membrane potential in mitochondria, indicating its role in apoptosis caused by mitochondrial dysfunction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質結合タンパク質 細胞死 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

トランスサイトーシスは上皮細胞をはじめとする極性細胞において、受容体に結合したリガンド分子が細胞膜の別の部位に輸送される過程であり、個体レベルでの物質輸送において重要な役割を担っている。例えば、乳腺上皮細胞におけるポリ Ig 受容体を介した IgA の乳汁中への分泌や、腸管上皮細胞および胎盤上皮細胞での neonatal Fc receptor による IgG の輸送などはトランスサイトーシスを介して行われ、これらの免疫機構と密接に関連している。

これらの上皮細胞におけるトランスサイトーシスは、頂端部側細胞膜と基底部側細胞膜との間を結ぶ方向性を持った物質輸送過程であり、輸送小胞の「形成」、「輸送」および「融合」が高度な特異性と効率性を保ちながら行われている。その関連因子としてこれまで、アダプター複合体 AP-1B (Folsch et al. Cell 1999) や低分子量 G タンパク質 Rab11a および Rab25 (Wang et al. J. Biol. Chem. 2000) などの関与が報告されているものの、その詳細な作用機序は必ずしも明らかになっていない。

一方で、上皮細胞の頂端部と基底部を規定する膜脂質として、イノシトールリン脂質の役割が知られている (Martin-Belmonte et al. Cell 2007)。すなわち、イノシトールリン脂質の一種 PI(4,5)P₂ が頂端部側細胞膜に濃縮しているのに対し、PI(3,4,5)P₃ は基底部側細胞膜に局在することから、これらのリン脂質と特異的に相互作用する因子が上皮細胞内のトランスサイトーシスにおける極性輸送に深く関与することが予想されている。

2. 研究の目的

SH3YL1 が関与する細胞内小胞輸送の実体を明らかにするため、GFP タグを付加した SH3YL1 分子を用いて、アフリカミドリザル腎上皮由来 COS-1 細胞におけるライブイメージングを行った。その結果、細胞死の直前に細胞質に分布していた SH3YL1 が、膜小胞様のオルガネラに急速に移行する興味深い現象が観察された。

そこで、この局在変化の分子機構を解明することを研究の主な目的とした。

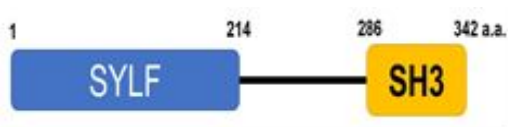


図 1. human SH3YL1

3. 研究の方法

(1) SH3YL1 局在変化の責任部位の同定

まず初めに、細胞死の直前に観察される SH3YL1 の局在変化の標的オルガネラを特定するため、SH3YL1-GFP、ミトコンドリアのマーカーとしてミトコンドリア外膜に局在することが知られる MAO (Monoamine

Oxidase) - mCherry を COS-1 細胞に共発現させ、アポトーシス誘導因子である etoposide (500μM)、mitomycin C (25μg/ml)、staurosporine (1μM) をそれぞれ処置し、タイムラプス観察を行い細胞内の SH3YL1 の局在変化を観察した。また、SH3YL1 のどの部位がこの局在変化に関わっているのか調べるため、SH3YL1 の部分コンストラクト (SYLF、SH3、SYLF、SH3) - GFP を用い、上記と同じ実験を行った。さらに、イノシトールリン脂質との結合能の低下がみられる SH3YL1 の変異体 (Hasegawa et al. J. Cell Biol. 2011) である SH3YL1 (K14,15A) - GFP も同様に実験を行った。

(2) リポソーム結合実験

(1) の実験により、SH3YL1 のミトコンドリアへの移行には SH3YL1 の脂質結合が関係している可能性が示唆された。そこで、ミトコンドリアの主要なリン脂質として知られるカルジオリピンを含むリポソームを作製し、SH3YL1 とカルジオリピンとの結合能を調べた (カルジオリピン (CL)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) は Sigma 社から購入し、CL 濃度を 10 - 50% としたリポソームを作製し実験に用いた)。

(3) アポトーシス過程における SH3YL1 の局在変化

SH3YL1-GFP 発現 COS-1 細胞のミトコンドリアを TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) で標識、Staurosporine (1μM) を処置し、タイムラプス観察を行い、アポトーシスの初期過程として知られるミトコンドリアの膜電位の低下と SH3YL1 のミトコンドリアの移行の前後関係を調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞死の直前、細胞質に分布していた SH3YL1 - GFP は MAO - mCherry と共局在した。このことにより、SH3YL1 は細胞死の直前、ミトコンドリアに局在することが明らかになった (図 2)。また、それぞれ作用機序の異なるアポトーシス誘導因子である Etoposide (500μM)、Mitomycin C (25μg/ml)、Staurosporine (1μM) を処置した結果は同様であった。

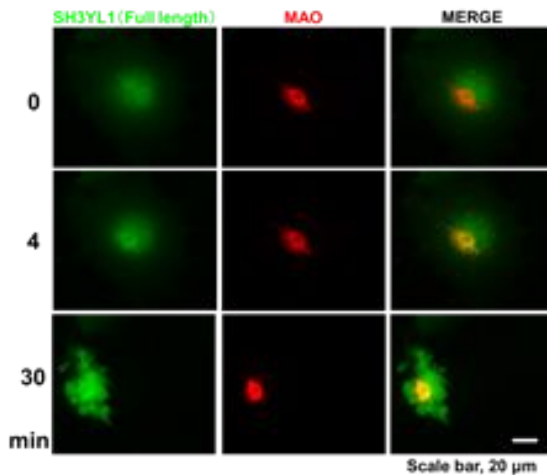


図 2 : 細胞死における SH3YL1 の局在変化

(2) SH3YL1 の部分コンストラクトを用いた実験の結果、細胞死の直前、SYLF、SH3 - GFP の局在変化は見られなかったが、SYLF、SH3 - GFP は MAO - mCherry と共局在した。このことにより、ミトコンドリアへの局在変化には SYLF domain が必要であることが分かった (図 3)。

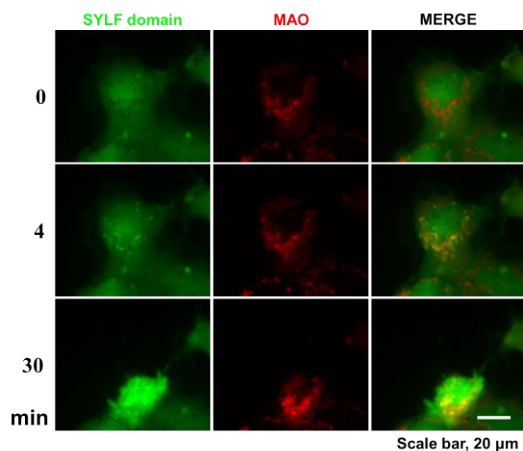
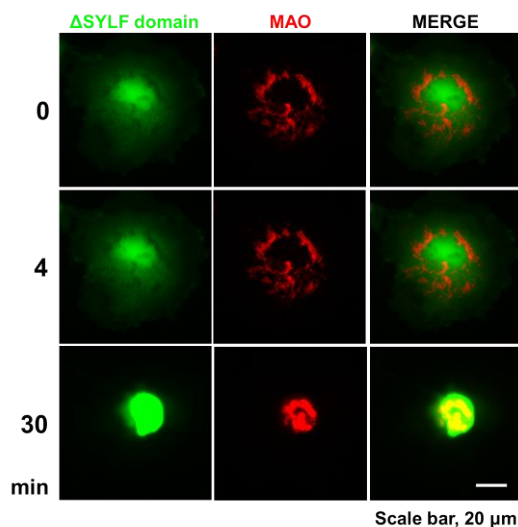


図 3 : ミトコンドリア移行における SH3YL1 の責任部位の同定

(3) イノシトールリン脂質との結合能の低下がみられる SH3YL1 の変異体 (Hasegawa et al. J. Cell Biol.2011) である SH3YL1 (K14,15A) - GFP は細胞死の直前に起きるミトコンドリアの局在変化が生じなかった (図 4)。このことより、SH3YL1 のミトコンドリアの移行には何らかの脂質を標的にしていることが考えられた。

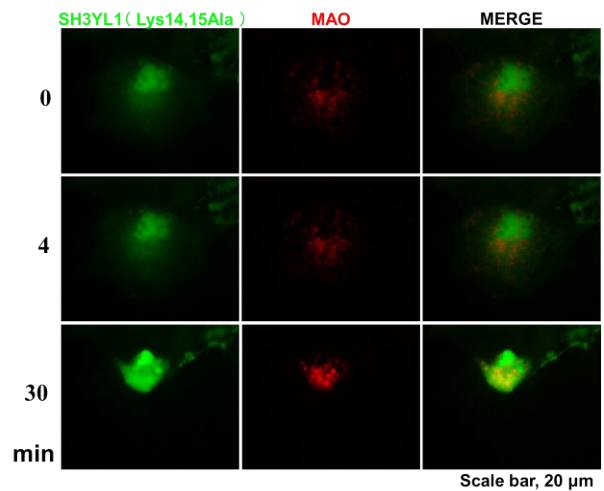


図 4 : 細胞死における SH3YL1 (K14,15A) の局在変化

(4) リポソーム結合実験により、SH3YL1 はカルジオリピンと結合能を有している可能性が示唆された。

(5) SH3YL1 のミトコンドリアの移行とミトコンドリアの電位低下との前後関係を調べた結果、SH3YL1 のミトコンドリアに移行とともに、TMRE 蛍光の素早い消失が観察された (図 5)。

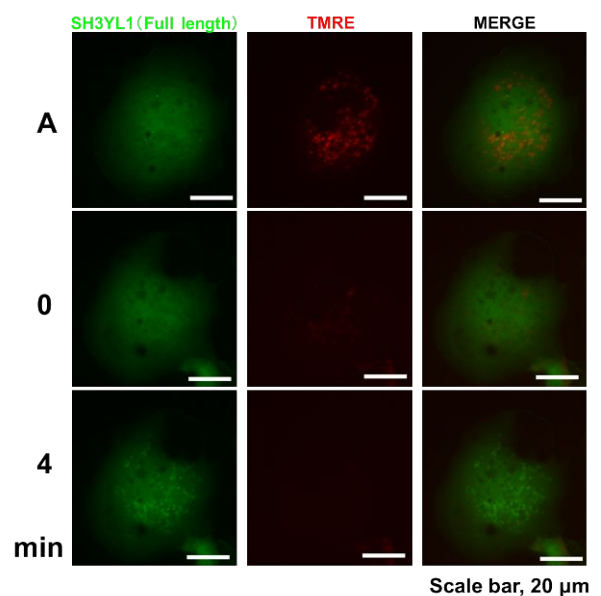


図 5 : SH3YL1 の局在変化におけるミトコンドリアの膜電位変化 (A : 撮影開始時)

以上のことより、SH3YL1 のミトコンドリア移行は何らかの細胞死メカニズムに關与することが示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-ito/>

6．研究組織
(1)研究代表者
山本 光 (Yamamoto Hikaru)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・研究員
研究者番号：70737337