

## 「小胞体インターフェースによる細胞小器官の試験管内再構成系の開発」

神戸大学大学院医学研究科

匂坂 敏朗

### 1 研究の背景と目的

小胞体は、分泌タンパク質および膜タンパク質の合成と選別輸送、タンパク質の品質管理、リン脂質の合成を行う場として機能する一方、他の細胞小器官に作用し、エンドソーム(初期エンドソームからリサイクリングエンドソーム、後期エンドソーム)、ゴルジ体(*cis*ゴルジから*trans*ゴルジ)などの細胞小器官の形成、成熟に関与することが知られている。これら細胞小器官が自律的に形成、成熟するのか、または非自律的に形成されるのかを明らかにすることは、細胞小器官の構築原理にかかわる大変重要な問題である。細胞小器官の数と大きさによる影響に着目し、小胞体によって成熟誘導される細胞小器官の形成過程の解明を目指す。世界に先駆けて小胞体と細胞小器官のインターフェースによる試験管内再構成系の開発を行い、遺伝学的手法に偏重して行われている形成機構の研究を、生化学的手法によるタンパク質と脂質レベルの観点から捉え直す。

小胞体ネットワークのリモデリングは、細胞小器官とのインターフェースの形成調節に重要である。小胞体ネットワークのリモデリングにより、小胞体が複数の細胞小器官に接触し(インターフェースを形成し)、エンドソームなどの細胞小器官の非自律的な成熟に関与していることを明らかにしつつある(図1)。小胞体と他の細胞小器官とのインターフェースがどのような時間的空間的な調節を行い、各細胞小器官の同一膜上で、特定の膜成分のみが集積、分離し、様々な細胞小器官を成熟させていくのかというのは生物学上の根本的な問題である。脂質二重膜よりなる細胞小器官の形成には、タンパク質のみならず、非タンパク質の因子とりわけ、膜局所の脂質組成変化、膜の曲率、膜の張力、膜の剛直性、脂質の充填状態といった脂質二重膜の物理特性の寄与が予想される。本研究課題では、試験管内再構成系という生化学的手法を用いることで、このような従来の遺伝学的手法では取り扱うことができなかった非タンパク質の因子の役割を解明することができ、生物学に新たな展開をもたらすことが期待できる。今回、新しい小胞体ネットワークのリモデリング調節機構を見出したので、それを報告する。

### 2 研究方法・研究内容

#### GFP-TMCC3 を安定に発現する U2OS 細胞株(GFP-TMCC3-U2OS 細胞)の樹立

TMCC3 と蛍光タンパク質 GFP の融合遺伝子を作成し、GFP-TMCC3 とピューロマイシン耐性遺伝子の両方を同時に発現するベクターをヒト骨肉腫細胞株 U2OS にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を抗生物質ピューロマイシンを含む培地で培養し、GFP-TMCC3 を安定に発現する U2OS 細胞株(GFP-TMCC3-U2OS 細胞)を樹立した。

#### 培養細胞の小胞体の染色

GFP-TMCC3-U2OS 細胞を小胞体マーカータンパク質である PDI(protein disulfide isomerase)に対する抗体で免疫染色し、GFP 蛍光と PDI 染色を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### p30 が結合する TMCC3 の領域 (p30 結合領域)

HA タグをつけた TMCC3 の様々なフラグメントを作成した。これらを、Flag タグをつ

けた p30 とともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 Flag 抗体で免疫沈降することで、p30 が結合する TMCC3 の領域 (p30 結合領域) を決定した。

#### p30 結合領域にあるリン酸化部位

部位特異的変異導入により p30 結合領域にあるリン酸化部位を特定した。HA タグをつけた TMCC3 のリン酸化部位のアミノ酸置換を行い、リン酸化されない p30 結合領域の変異体を作成した。これらを、Flag タグをつけた p30 とともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 Flag 抗体で免疫沈降することで、変異体による p30 結合能の変化を明らかにした。

### 3 研究成果

小胞体ネットワークのリモデリングは細胞小器官とのインターフェースの形成調節に重要である。私どもは TMCC3 (Transmembrane and coiled-coil domain family 3) が小胞体の three-way junction に特異的に局在し、膜融合タンパク質 atlastin に結合することで小胞体ネットワークの形成を制御していることを明らかにしている。

本研究では TMCC3 の活性調節機構の解明に取り組んだ。GFP-TMCC3 を安定に発現する U2OS 細胞株 (GFP-TMCC3-U2OS 細胞) を樹立した。GFP-TMCC3-U2OS 細胞を小胞体マーカータンパク質である PDI (protein disulfide isomerase) に対する抗体で免疫染色し、GFP 蛍光と PDI 染色を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。GFP-TMCC3 は内在性の TMCC3 と同様に小胞体の three-way junction に特異的に局在した。TMCC3 に結合するタンパク質 p30 を GFP-TMCC3-U2OS 細胞にトランスフェクションしたところ、p30 の過剰発現により GFP-TMCC3 の three-way junction への局在が障害された。HA タグをつけた TMCC3 の様々なフラグメントを作成した。これらを、Flag タグをつけた p30 とともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 Flag 抗体で免疫沈降することで、p30 が結合する TMCC3 の領域 (p30 結合領域) を決定した。

HA タグをつけた p30 結合領域フラグメントを HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 HA 抗体で免疫沈降し、リン酸化特異的抗体でウェスタンブロットした。その結果、p30 結合領域は細胞内でリン酸化されていることが明らかになった。部位特異的変異導入により p30 結合領域にあるリン酸化部位を特定した。リン酸化部位のアミノ酸置換を行い、リン酸化されない p30 結合領域の変異体を作成した。免疫沈降により、この変異体は p30 との結合が顕著に低下していることを明らかにした。アミノ酸置換によりリン酸化されない全長の TMCC3 変異体を作成した。この TMCC3 全長変異体と GFP の融合遺伝子を作成し、野生型 TMCC3 と同様の方法で、GFP-TMCC3 変異体を安定に発現する U2OS 細胞株 (GFP-TMCC3 変異体-U2OS 細胞) を樹立した。GFP-TMCC3 変異体-U2OS 細胞を PDI に対する抗体で免疫染色したところ、GFP-TMCC3 変異体は野生型 GFP-TMCC3 と同様に小胞体の three-way junction に特異的に局在した。p30 を GFP-TMCC3 変異体-U2OS 細胞にトランスフェクションしたところ、GFP-TMCC3 変異体は p30 の過剰発現には影響を受けずに three-way junction への局在を保持した。

以上の結果から、TMCC3 の three-way junction への局在は、TMCC3 のリン酸化とリン酸化に依存的な p30 の結合により負に調節されていることが明らかになった。TMCC3 は atlastin の上流分子として小胞体ネットワークの形成を促進する働きがある。従って今回の結果により、p30 による TMCC3 の局在制御が小胞体ネットワークのリモデリングを引き起こし、細胞小器官とのインターフェースの形成を調節していると考えられた (図 2)。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により小胞体の形状変化の新たな分子機構として、p30 による TMCC3 の three-way junction への局在化調節機構を世界に先駆けて発見した。Three-way junction と細胞小器官のインターフェースの形成が、細胞小器官の形成、成熟を促進すると考えている。

エンドソームの形成、成熟障害がアルツハイマーなどの神経変性疾患、免疫疾患、がんなどの疾患を引き起こすことが知られている。ゴルジ体の形成、成熟障害は先天性糖鎖合成異常症、神経変性疾患、がんなどの疾患を引き起こす。小胞体と細胞小器官のインターフェースによる試験管内再構成系を用いて、患者の細胞から細胞小器官の形成、成熟を改善する化合物をスクリーニングすることで、治療薬開発への基礎的知見の提供が期待でき、本研究の生活や産業への貢献および波及効果は極めて大きいと考えている。

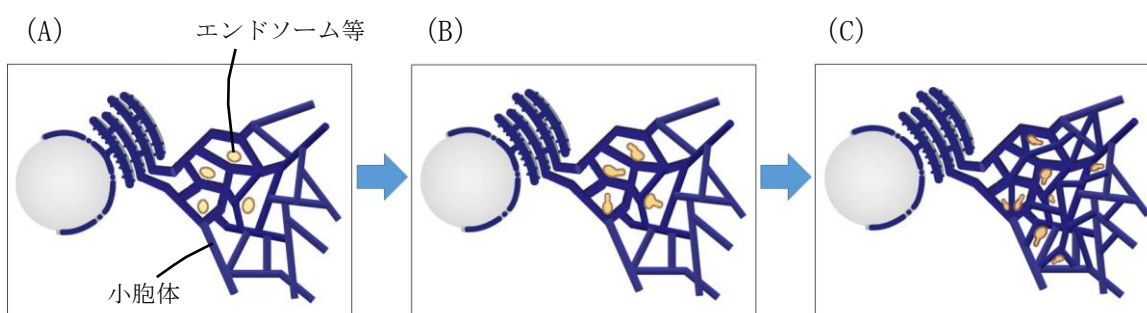


図1 小胞体と細胞小器官のインターフェースによる細胞小器官の形成、成熟の想定図

- (A) 小胞体の three-way junction に未成熟の細胞小器官(エンドソーム等)が近づく。  
 (B) 小胞体の three-way junction に未成熟の細胞小器官(エンドソーム等)が接触する。  
 (C) Three-way junction に接触した細胞小器官(エンドソーム等)が成熟する。

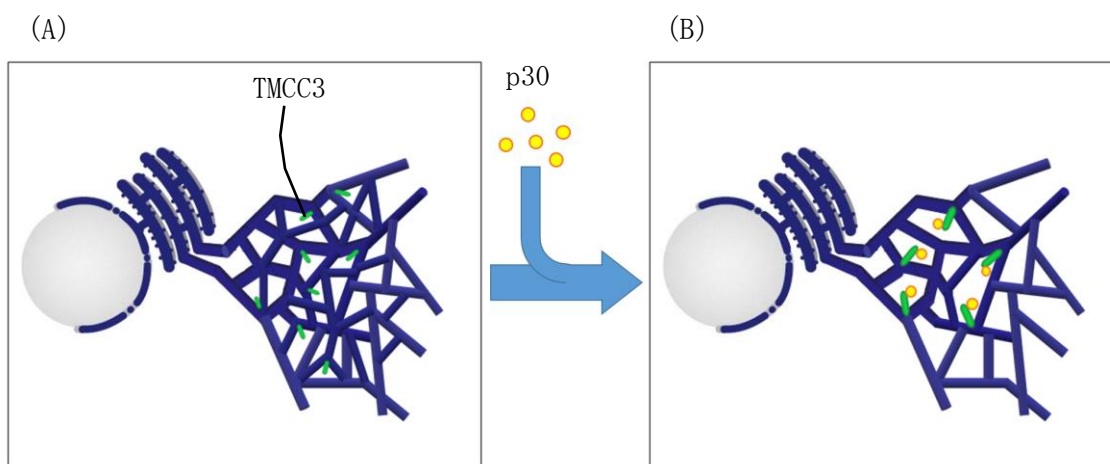


図2 TMCC3 による小胞体ネットワークのリモデリング調節機構

- (A) TMCC3 が three-way junction を安定、維持している。  
 (B) p30 が TMCC3 に結合することにより、three-way junction が不安定になり、小胞体ネットワークのリモデリングが起きる。