

162. 小胞体－ゴルジ体接触部位における輸送小胞形成制御

若菜 裕一

東京薬科大学 生命科学部 分子細胞生物学研究室

Key words : オルガネラ膜接触, 小胞体, ゴルジ体, 輸送小胞

緒言

サイトカインやホルモン、細胞外マトリックス構成因子をはじめとする分泌タンパク質の多くは、トランスゴルジ網 (TGN) において特定の輸送小胞に選択的に取り込まれ細胞膜へと輸送される。TGN からは他にも様々な輸送小胞が形成され、積み荷タンパク質をそれぞれの最終目的オルガネラへと送り届けている。私たちは以前、TGN から細胞膜への輸送を仲介する新規輸送小胞、CARTS (carriers of the TGN to the cell surface) ¹⁾ を同定し、その形成に小胞体膜接触に関わる VAMP-associated protein (VAP) が必要であることを見出した。細胞質全体に広く分布する小胞体は、細胞膜やミトコンドリア、エンドソーム、ゴルジ体などほぼすべてのオルガネラとの間にわずか 10~30 nm を隔てて膜を並置させた膜接触部位と呼ばれる構造を形成することが明らかになっている²⁾。小胞体－ゴルジ体接触部位において、VAP は ceramide transfer protein (CERT) と oxysterol-binding protein (OSBP) に結合し、それぞれセラミドとコレステロールを輸送すると考えられている^{3,4)}。しかし、この小胞体－ゴルジ体接触がゴルジ体の機能調節にどのような役割を果たすのかはよくわかっていない。そこで私たちは以下の3点：小胞体－ゴルジ体接触が CARTS 形成に関与することの直接的な証明 (1)、小胞体－ゴルジ体接触が Ca²⁺輸送を介してゴルジ体における積み荷選別に関与している可能性の検証 (2)、小胞体－ゴルジ体接触部位の新規構成因子の探索 (3) を目的として研究を行った。

方法、結果および考察

1. 小胞体－ゴルジ体接触が CARTS 形成に関与することの直接的な証明

OSBP はゴルジ体膜のホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) および Arf1 と相互作用する pleckstrin homology (PH) ドメインと VAP と結合する two phenylalanines (FF) in an acidic tract (FFAT) モチーフを持っている。これらに加え、その間に位置する coiled coil ドメインをのみを有する OSBP 変異体 (PH-FFAT) は、小胞体－ゴルジ体接触部位を固定化し増大させることが報告されている⁴⁾。私たちは以前、小胞体の脂質ホスファターゼである Sac1 が VAP-OSBP と複合体を形成すること、そして Sac1 がゴルジ体と膜接触部位を形成する小胞体サブドメインの主要な構成因子であることを明らかにした。GFP-Sac1 安定発現 HeLa 細胞に PH-FFAT-mRFP を発現させたところ、GFP-Sac1 陽性膜構造の移動度が顕著に低下し、小胞体－ゴルジ体接触部位の結合・解離ダイナミクスが低下していることが示唆された (図 1A)。HEK293T 細胞に Myc-PH-FFAT と CARTS 積み荷分泌タンパク質 pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF)-MycHis を共発現させたところ、PAUF-MycHis 分泌はほぼ完全に阻害された (図 1B)。次に、PAUF-MycHis 安定発現 HeLa 細胞を用いて免疫蛍光染色により、CARTS 形成への影響を調べた。その結果、PH-FFAT-mRFP 発現細胞ではコントロールに比べて CARTS を示す PAUF-MycHis 陽性のドットの数に 1/4 近くまで減少していることがわかった (図 1C)。これらの結果から、タンパク質分泌と輸送小胞形成には、小胞体－ゴルジ体接触部位の結合・解離ダイナミクスが重要であることが示唆された。私たちは昨年 12 月、これらを含む研究成果を Mol. Biol. Cell 誌に発表した⁵⁾。

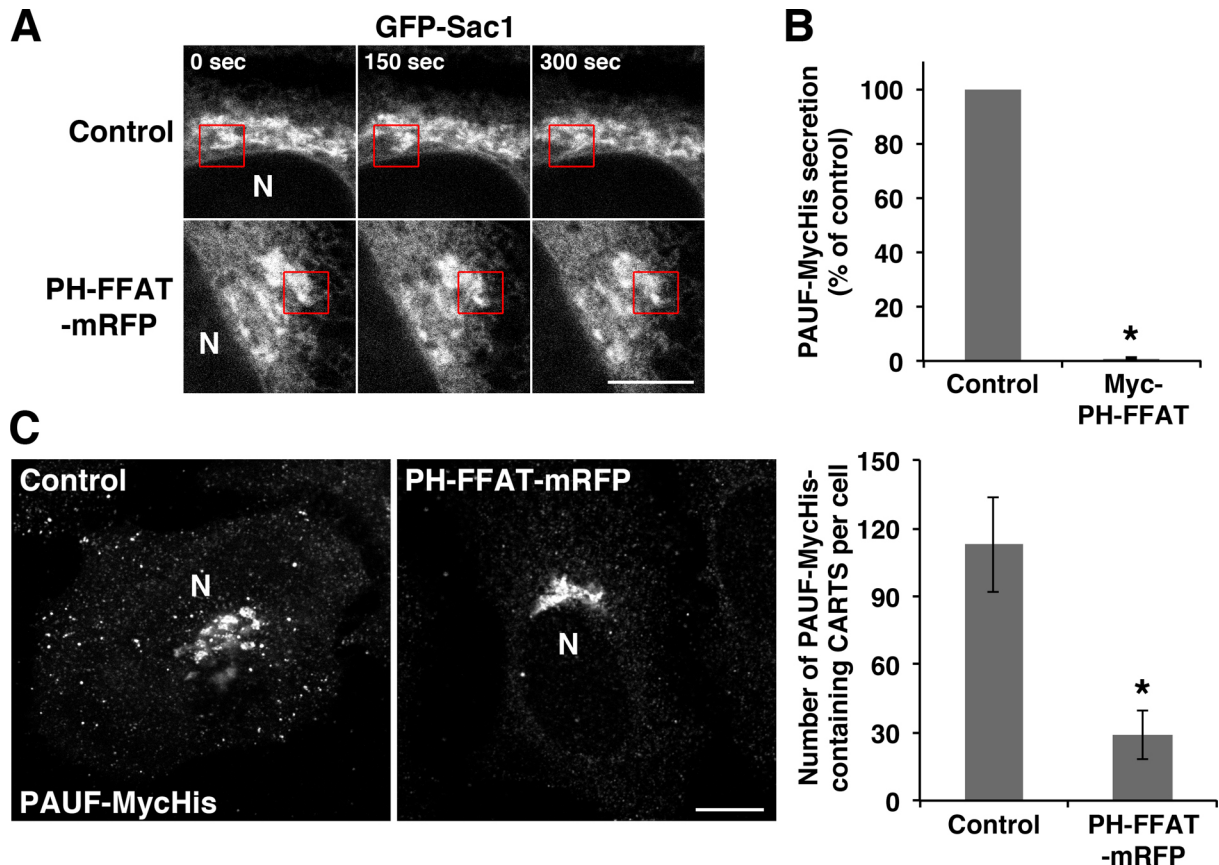


図1. PH-FFAT の過剰発現が Sac1 陽性膜構造の動態と PAUF 分泌、CARTS 形成に与える影響

(A) PH-FFAT-mRFP 発現細胞では、コントロール (mRFP 発現細胞) に比べて GFP-Sac1 陽性膜構造の移動度が低下した。N: nucleus、Scale bar: $5\mu\text{m}$ (B) Myc-PH-FFAT 発現細胞では PAUF-MycHis の分泌がほぼ完全に阻害された。mean \pm SD、* $p < 0.04$ (C) PH-FFAT-mRFP 発現細胞では CARTS (PAUF-MycHis 陽性のドット) の数が 1/4 近くまで減少した。N: nucleus、Scale bar: $10\mu\text{m}$ 、mean \pm SD、* $p < 0.0001$ 。

2. 小胞体-ゴルジ体接触が Ca^{2+} 輸送を介してゴルジ体における積み荷選別に与えている可能性の検証

TGN における積み荷タンパク質の選別には TGN 内腔の Ca^{2+} レベルが重要であるが、その制御メカニズムについては不明な点が多い^{6,7)}。TGN の Ca^{2+} レベルは、TGN 膜の Ca^{2+} ポンプ SPCA1 が細胞質から Ca^{2+} を取り込むことによって制御されるが、小胞体の関与は明らかになっていない。細胞内の主要な Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体は、膜接触部位を介してミトコンドリアへ Ca^{2+} を供給することが明らかになっており、また細胞膜や (おそらく) エンドソーム/リソソームの間でも Ca^{2+} をやりとりしている。

HeLa 細胞を用いて、VAP の二つのアイソフォーム (VAP-A と VAP-B) を発現抑制した結果、33% の細胞において、Cab45 がゴルジ体から消失していることがわかった。 Ca^{2+} 結合タンパク質である Cab45 は、TGN の Ca^{2+} レベルが低下するとゴルジ体に留まることができず、誤って輸送小胞に積み込まれ分泌されることがわかっている⁷⁾。VAP 発現抑制の効果は、培地中の Ca^{2+} 濃度を低下させることによって増強されるばかりでなく、コレステロールの合成ならびに輸送を阻害する 25-ヒドロキシコレステロール (25-OH) で細胞を処理した時にも増強されることがわかった。同様の効果は、CERT と OSBP を二重発現抑制した細胞においても見られた (図 2)。これらの結果は、小胞体-ゴルジ体接触部位における脂質輸送が Ca^{2+} 輸送と共役している可能性を示唆している。

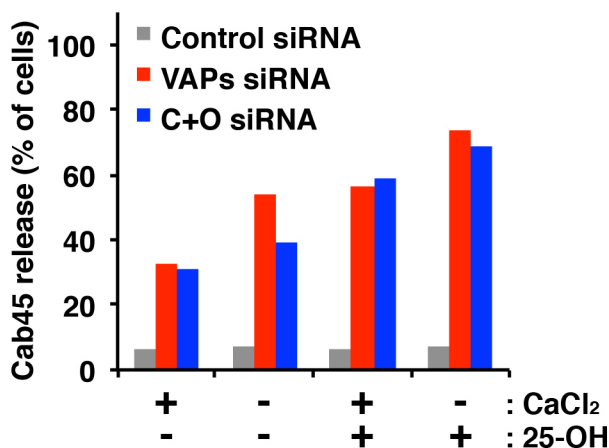


図2. VAP-A/B および CERT/OSBP 二重発現抑制が Cab45 のゴルジ体局在に与える影響

VAP-A/B (VAPs) および CERT/OSBP (C+O) を二重発現抑制した結果、それぞれ 33 %、31 % の細胞で Cab45 がゴルジ体から消失した。この効果は、低 Ca²⁺培地 (-CaCl₂) および 25-OH 存在下で増強された。Scale bar: 10 μm.

3. 小胞体-ゴルジ体接触部位の新規構成因子の探索

私たちは小胞体-ゴルジ体接触部位の主要な構成因子である Sac1 の結合タンパク質を明らかにすることによって、この膜接触部位の新規構成因子を同定できるのではないかと考えた。FLAG タグを付加した Sac1 全長を HEK293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体アフィニティー精製ゲルを用いて免疫沈降を行った。FLAG ペプチドを用いて溶出後、銀染色によって共沈降タンパク質を検出し、質量分析によってタンパク質を同定した。その結果、VAP や OSBP などの既知の結合タンパク質や膜接触部位に局在することが報告されている複数のタンパク質に加え、興味深いタンパク質を多数同定することができた。しかし、本研究の目的である小胞体-ゴルジ体接触部位だけでなく、他の膜接触部位で Sac1 と結合するタンパク質も多く含まれているように思われた。現在私たちは、機能解析へと進める候補タンパク質を絞り込むための二次スクリーニングの準備を進めている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、首都大学東京大学院理工学研究科の田岡万悟先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Wakana Y, van Galen J, Meissner F, Scarpa M, Polishchuk RS, Mann M, Malhotra V. A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. EMBO J. 2012 Oct 17;31(20):3976-90. doi: 10.1038/emboj.2012.235. Epub 2012 Aug 21. PubMed PMID: 22909819; PubMed Central PMCID: PMC3474920.

- 2) Prinz WA. Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *J Cell Biol.* 2014 Jun 23;205(6):759-69. doi: 10.1083/jcb.201401126. PubMed PMID: 24958771; PubMed Central PMCID: PMC4068136.
- 3) Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T. CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1791(7):684-91. doi: 10.1016/j.bbali.2009.01.006. Epub 2009 Jan 22. Review. PubMed PMID: 19416656.
- 4) Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G, Antonny B. A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell.* 2013 Nov 7;155(4):830-43. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.056. PubMed PMID: 24209621.
- 5) Wakana Y, Kotake R, Oyama N, Murate M, Kobayashi T, Arasaki K, Inoue H, Tagaya M. CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol Biol Cell.* 2015 Dec 15;26(25):4686-99. doi: 10.1091/mbc.E15-08-0599. Epub 2015 Oct 21. PubMed PMID: 26490117; PubMed Central PMCID: PMC4678024.
- 6) von Blume J, Alleaume AM, Cantero-Recasens G, Curwin A, Carreras-Sureda A, Zimmermann T, van Galen J, Wakana Y, Valverde MA, Malhotra V. ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca²⁺ ATPase SPCA1. *Dev Cell.* 2011 May 17;20(5):652-62. doi: 10.1016/j.devcel.2011.03.014. PubMed PMID: 21571222.
- 7) von Blume J, Alleaume AM, Kienzle C, Carreras-Sureda A, Valverde M, Malhotra V. Cab45 is required for Ca²⁺-dependent secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 2012 Dec 24;199(7):1057-66. doi: 10.1083/jcb.201207180. PubMed PMID: 23266954; PubMed Central PMCID: PMC3529532.