

論文内容要旨

論文題目

オルガネラ間コンタクトサイト評価系の開発と応用

所属コース：分子疫学 コース

所属講座：生化学・分子生物学 講座

氏 名：武田 百合子

【内容要旨】(1,200 字以内)

最近の研究により，異なるオルガネラ同士が物理的に結合する，オルガネラ間コンタクトサイト (MCS) が見いだされ，その機能が注目されている。特に出芽酵母細胞のミトコンドリア外膜と小胞体膜を直接結合する **ERMES** 複合体に関して研究が進んでおり，**ERMES** 複合体が小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送を担うことが明らかとなっている。しかし **MCS** 研究はまだ黎明期の状態であり，**ERMES** のような **MCS** を形成する因子が明確である場合は，**MCS** 機能解析を行うことが可能であるが，**MCS** 形成因子が未知であるオルガネラ間に関しては，その近接を生きた細胞を用いて可視化，評価する方法は存在しなかった。そこで本研究では，蛍光タンパク質 **GFP** を二つに分断した **Split-GFP** を用いてオルガネラ間近接評価実験系の開発に取り組んだ。**Split-GFP** を異なるオルガネラ膜上に発現させると，**Split-GFP** 自体はオルガネラ膜全体に拡散して局在する一方で，再構成した **GFP** から生じるシグナルはオルガネラ上のごく限られた区画に，ドット状のパターンとして検出された。ミトコンドリア外膜と小胞体膜上に発現させた **Split-GFP** のシグナルが，**ERMES** と共局在することが確認できたことから，**Split-GFP** がオルガネラ膜間 **MCS** の可視化ツールとして有効であることが明らかとなった。この実験系を用いることで，ミトコンドリア，小胞体，液胞，ペルオキシソーム，脂肪滴膜の全ての組み合わせで **MCS** が存在する可能性が示された。

さらに，本研究では，小胞体内に異常な構造を持ったタンパク質が蓄積することで引き起こされる小胞体ストレス状態では，**ERMES** 複合体の挙動が変化することを発見した。**Mmm1** に **GFP** を融合した **Mmm1-GFP** を細胞内に発現させると，平均5個程度のドット状のシグナルとして観察される(以下，**ERMES** ドット)。この細胞に小胞体ストレスを誘導すると，一細胞あたりの **ERMES** ドット数が増加した。さらに，超解像蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングによって，小胞体ストレス時に一つの **ERMES** ドットが複数のドットに解離する様子を観察し，**ERMES** クラスター構造が解離することで **ERMES** ドット数が増加することを明らかにした。小胞体ストレス時には，リン脂質合成量の増加によって小胞体膜が拡大し，小胞体内のタンパク質フォールディング能力が増加する。**ERMES** ドット数が増加しない **Mmm1** 変異株では，小胞体ストレス時の小胞体膜の拡大が抑制されており，細胞増殖が遅延していた。また，**ERMES** ドット数の増加は小胞体ストレス応答を担う **Ire1** や **Hac1**, **Ino2** や **Ino4** に依存しなかったことから，小胞体ストレス時の **ERMES** ドット数の増加は，既存の小胞体ストレス応答とは異なる新しいストレス応答経路であると考えられる。

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 武田 百合子

論文題目：オルガネラ間コンタクトサイト評価系の開発と応用

審査委員：主審査委員	中	島	修
副審査委員	藤	井	順 逸
副審査委員	高	木	理 彰



審査終了日：令和 4年 1月 5日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

異なるオルガネラ間で物理的に結合している領域は、オルガネラ間コンタクトサイトと呼ばれる。近年、この領域が細胞内で種々の機能を果たしていることが、明らかになりつつある。具体的には、出芽酵母の小胞体とミトコンドリア間を結合させている **ERMES** タンパク質複合体は小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送を担っていることが判明している。一方で、細胞内でのオルガネラ間コンタクトサイトを簡便に可視化する評価系が報告されていなかったことから、本研究において、武田氏は、酵母細胞に、蛍光タンパク質 **GFP** が二分された **Split-GFP** をそれぞれ異なるオルガネラに発現させ、当該2分子が近接して再構成され蛍光を発することを利用して、簡便に細胞内の動的変化を観察できるオルガネラ間コンタクトサイト評価系の開発を行い、これを利用して種々のオルガネラ間コンタクトサイトを探索するとともに、小胞体ストレスをはじめとする様々なストレスに対する、オルガネラ間コンタクトサイトの動的変化を解析した。

武田氏は、すでに詳細な解析が進んでいる、出芽酵母の小胞体とミトコンドリア間を結合させている **ERMES** タンパク質複合体を指標として、**Split-GFP** オルガネラ間コンタクトサイト評価系の妥当性を検証し、**ERMES** タンパク質複合体と **GFP** シグナルが共局在することを確認した。加えて、**ERMES** 欠損株での解析から、小胞体-ミトコンドリア間コンタクトサイトの形成に **ERMES** が必須でないこと、**Split-GFP** の発現が **ERMES** 欠損株の生育阻害を一部回復させることを明らかにした。さらに、**Split-GFP** オルガネラ間コンタクトサイト評価系により、種々のオルガネラ間コンタクトサイトを解析し、既に報告されているオルガネラ間コンタクトサイトの検出を確認するとともに、これまで報告の無い、液胞-ペルオキシソーム間コンタクトサイトを見出した。一方、小胞体ストレス負荷時に、小胞体-ミトコンドリア間コンタクトサイトの **ERMES** クラスター（多数の **ERMES** 複合体がコンタクトサイトで凝集している）が分裂して、コンタクトサイトが増加する動的変化を観察した。また、この **ERMES** クラスターの分裂が、酵母の小胞体ストレス応答経路の **Ire1** や **Hac1** とは独立に制御され、**ERMES** が担うリン脂質輸送活性の調節に関与していることを明らかにした。さらに、栄養飢餓、酸化ストレス、細胞老化などのストレスに応答して、オルガネラ間コンタクトサイトが増加拡大することを示した。

本研究では、細胞内のオルガネラ間コンタクトサイトを可視化する評価系を確立し、この評価系を応用して、ストレス負荷によりオルガネラ間コンタクトサイトの動的変化がおこり、ストレス応答での種々の細胞内過程の制御に関わっていることを明らかにした。このオルガネラ間コンタクトサイト評価系を利用することで、更なるオルガネラ間コンタクトサイトの細胞機能・分子メカニズムの解明に繋がることが期待される。

以上から、審査会では、本研究が学位（医科学）の授与に値するものと判定した。

(1, 200字以内)