

小胞体-エンドソーム間のメンブレンコンタクトにおける PI4P 駆動型脂質交換輸送

河崎 麻実, 中津 史

1. はじめに

細胞膜やオルガネラは、細胞内において互いに離れて存在しつつも、さまざまな手段でコミュニケーションを図っている。特に近年、それらは直接接することで物質や情報を共有・伝達することが明らかになってきた。本稿では、細胞膜やオルガネラの一部が近接する微小領域「メンブレンコンタクト」において脂質が交換輸送される仕組みを概説するとともに、最近我々が見いだした脂質交換輸送によるエンドソーム膜輸送制御機構についてご紹介したい。

2. メンブレンコンタクトとは？

メンブレンコンタクトとは、細胞内において生体膜どうしが10~30nm程度の距離で近接し、タンパク質分子によりテザリングされ、融合することのない膜領域として提唱されている¹⁾。呼称に関しては、membrane contact sitesあるいは単にcontacts, またはmembrane junctionsなどと記述されることが多い。本稿ではメンブレンコンタクトあるいはコンタクトと日本語表記する。メンブレンコンタクトは、電子顕微鏡を用いた形態学的解析により、今から70年近く前にPaladeらにより観察された²⁾。以来、形態学的な手法を中心に解析が進められたが、機能的な裏づけは得られぬまま、またアーティファクトの可能性も完全に排除できず、その実体は長らく不明であった。しかし1990年、Vanceは、小胞体とミトコンドリアが接する領域が脂質の輸送の場である可能性を報告し、メンブレンコンタクトの機能的な側面が提唱された³⁾。その後のイメージングや質

量分析によるタンパク質同定などの解析技術基盤の著しい発展に伴い、メンブレンコンタクトの実体が徐々に明らかになってきた。現在では、さまざまなメンブレンコンタクトが同定され、脂質輸送、カルシウム動態やチャネル制御などの細胞機能との関連が報告されている⁴⁾ (図1a)。

3. オキシステロール結合タンパク質ファミリーによる PI4P 駆動型脂質交換輸送

メンブレンコンタクトの主要な機能の一つは、脂質輸送である。脂質は、膜小胞の構成因子として細胞内膜輸送システムによって輸送される経路以外に、「脂質輸送タンパク質 (lipid transfer proteins)」と総称されるタンパク質群による膜小胞非依存的な経路によっても輸送される⁵⁾。脂質輸送タンパク質は、通常、疎水性ポケット領域を有しており、ここに脂質分子を囲い込むことで親水性環境である細胞質から脂質を隔離して、膜から膜へと輸送する⁶⁾。oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) は、酵母からヒトまで高度に保存された脂質輸送タンパク質ファミリーで、哺乳類では12分子種存在する⁷⁾ (図1b)。歴史的にオキシステロールに結合するタンパク質として同定されたが、現在ではコレステロール、イノシトールリン脂質、ホスファチジルセリン (PS) をリガンドとして輸送することが判明している。

我々は以前、ORP5およびORP8が小胞体-細胞膜コンタクトを形成し、そこで二つの異なる脂質が交換輸送される仕組みを見いだした⁸⁾ (図1c)。ORP5/8は、膜貫通領域 (TM) を介して小胞体にアンカーされる一方で、N末端に存在するpleckstrin-homology (PH) ドメインを介して細胞膜に結合することで、小胞体と細胞膜を架橋する。ORP5/8の脂質輸送ドメインはホスファチジルイノシトール4-リン酸 (PI4P) とPSをリガンドとして、これら2種の脂質を対向輸送する。そしてこれら脂質の輸送方向の制御には、PI4Pが鍵を握っている。PI4Pは、細胞膜に局在するPI4キナーゼ (PI4K3 α) により合成されるため、細胞膜に豊富に存在する。一方、小胞体にはPI4P脱リン酸化酵素が存在するため、小胞体のPI4P濃度は低く保たれている。ORP5/8のPHドメインはPI4P濃度の高い細胞膜領域に結合するため、ORP5/8コンタクト領域では細胞膜と小胞体の間にPI4Pの濃度差が生まれる。そのため、PI4Pは

新潟大学大学院医歯学総合研究科 (〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757)

PI4P-driven lipid countertransport at ER-endosome membrane contact sites

Asami Kawasaki and Fubito Nakatsu (Department of Neurochemistry and Molecular Cell Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, 1-757 Asahimachi, Chuo-ku, Niigata 951-8510, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940611

© 2022 公益社団法人日本生化学会

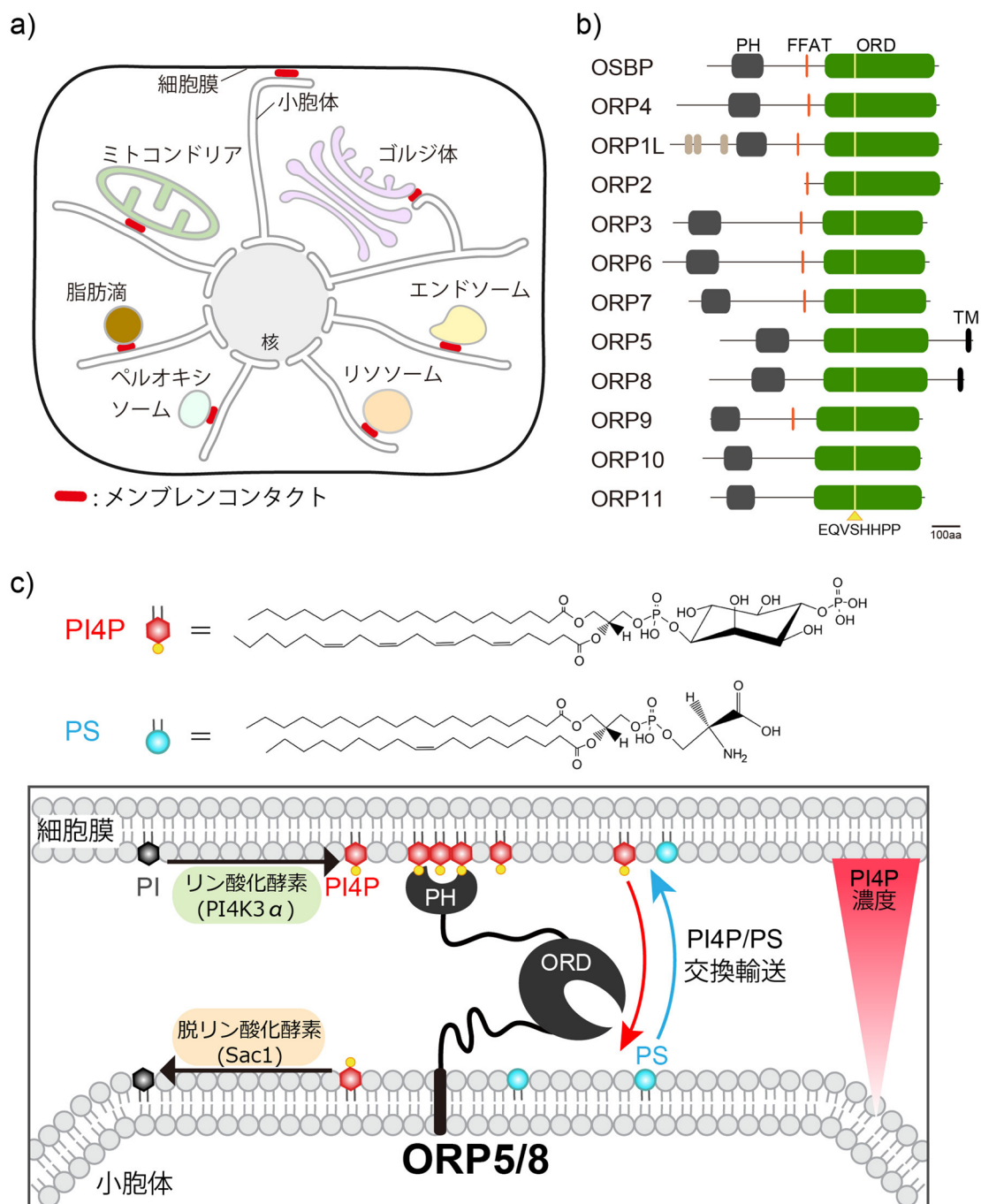


図1 メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送機構

(a)細胞内に形成されるメンブレンコンタクト。(b)哺乳類に存在するORPファミリー。PH:pleckstrin-homologyドメイン, FFAT:FFATモチーフ, ORD:脂質輸送ドメイン, TM:膜貫通領域。(c)小胞体-細胞膜間コンタクトにおいてPI4Pが駆動するPI4P/PS交換輸送機構。

その濃度勾配に沿って細胞膜から小胞体へと輸送され、このPI4Pの一方方向性の流れがPSの逆向きの輸送（すなわち小胞体から細胞膜）を促進する。その結果、これら2種の脂質がメンブレンコンタクトを介して細胞膜と小胞体の間で交換輸送される。つまり、これはPI4Pの濃度勾配が駆動する脂質交換輸送である⁹⁾ (図1c)。

4. ORP10は小胞体-エンドソームコンタクトに局在する

では、この「PI4Pの濃度勾配が駆動する脂質交換輸送」機能は、ORPファミリーに共通した性質であろうか？ 哺乳動物におけるORPファミリーは12分子種存在するが、そのうち脂質交換輸送活性が証明されているの

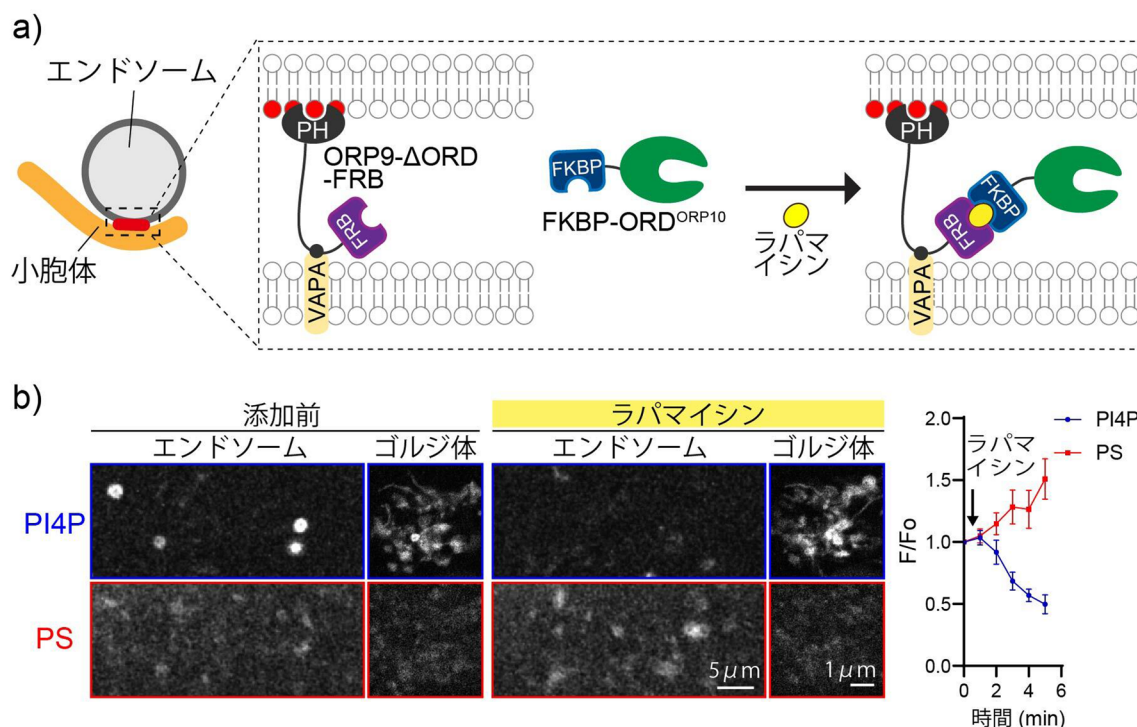


図2 小胞体-エンドソームコンタクトにおける脂質交換輸送活性
(a)小胞体-エンドソームコンタクトへのORP10脂質輸送ドメインの急速リクルート法。(b) ORP10脂質輸送ドメインの急速リクルートによるエンドソームPI4PおよびPSレベルの変化(文献15より改変)。F₀およびFは、それぞれラパマイシン添加前、およびラパマイシン添加後の蛍光値を表す。

はOSBP(小胞体-ゴルジ体間コンタクト)¹⁰⁾、ORP5およびORP8(小胞体-細胞膜間コンタクト)⁸⁾のみであった。そこで、PI4Pが局在するにもかかわらずいまだ脂質交換輸送が報告されていないエンドソームに着目した。エンドソームマーカーRab5およびエンドソーム局在型PI4キナーゼPI4K2αと共局在するORPファミリー分子を探索したところ、ORP10を得た。ゲノム編集法によりORP10遺伝子にHAタグ配列をノックインしたHeLa細胞を樹立し、内在性ORP10の局在を検討したところ、ORP10-HAは確かにエンドソームに局在することが判明した。種々のマーカーを用いた検討から、ORP10-HAはRab7陽性エンドソームに強く局在した。ORP10によるエンドソーム局在は、自身のPHドメインによるPI4P認識が重要であることも判明した。

次に、ORP10が小胞体-エンドソームコンタクトに局在する可能性とその分子機構の解明を試みた。多くのORPファミリー分子は、小胞体タンパク質VAPAおよびVAPBに結合するモチーフであるFFATモチーフを持っており、このFFATモチーフを介して小胞体に局在する⁷⁾。しかしORP10にはFFATモチーフが存在しない。そこで、質量分析を用いた生化学的手法によりORP10結合タンパク質を網羅的に探索したところ、その候補分子としてORP9を得た。ORP9にはFFATモチーフが存在し、VAPAと結合することが知られていることから、ORP10はORP9とともに小胞体-エンドソ-

ームコンタクトに局在する可能性が示唆された。事実、ORP10は、ORP9およびVAPBと共局在し、小胞体-エンドソームコンタクトを形成した。さらに、ORP9ノックアウト細胞では、ORP10の小胞体-エンドソームコンタクトへの局在が消失した。これらの結果から、ORP10は、自身のPHドメインによるPI4P認識と、ORP9への結合に依存して、小胞体-エンドソームコンタクトに局在することが明らかになった。

5. ORP10は、小胞体-エンドソームコンタクトでPI4PとPSを交換輸送する

ORP10は、脂質輸送ドメインにPSを結合する活性があることは報告されていたが、もう一つのリガンドは未同定であった¹¹⁾。そこで、ORP10の脂質輸送ドメインを動物細胞から精製し、質量分析により結合している脂質分子種の同定を試みたところ、PI4Pがリガンドとなることを突き止めた。そこで、ORP10によるPI4PとPSの交換輸送活性を人工脂質二重膜(リポソーム)を用いた*in vitro*脂質交換輸送アッセイにより検討したところ、精製ORP10タンパク質はPI4PとPSをリポソーム間で交換輸送する活性を有することが確認された。次に、培養細胞内における脂質交換輸送活性の評価を行った。ORP9の脂質輸送ドメイン(ORD)を欠失させ、代わりにFRBドメイン(FKBP12-rapamycin

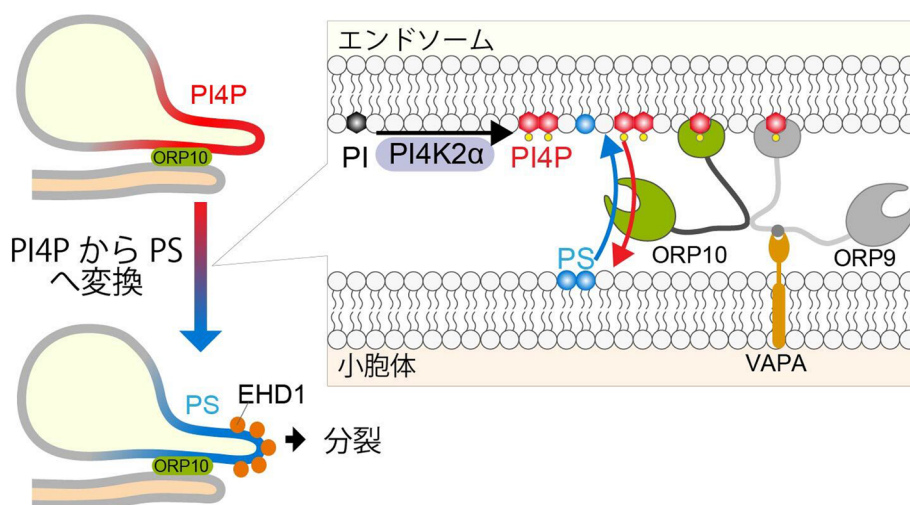


図3 小胞体-エンドソームコンタクトにおけるPI4P/PS交換輸送が膜輸送を制御するメカニズム

binding) をコードするキメラ分子 (ORP9-ΔORD-FRB) を設計し、これを小胞体-エンドソームコンタクトに局在させた (図2a)。一方、ORP10の脂質輸送ドメインにFKBPを融合したタンパク質 (FKBP-ORD^{ORP10}) を細胞質に発現させ、この細胞にラパマイシンを添加した (図2a)。すると、細胞質のFKBP-ORD^{ORP10}は、ORP9-ΔORD-FRBが局在する小胞体-エンドソームコンタクトに急速にリクルートされた。このとき、エンドソーム膜のPI4Pは徐々に減少する一方、PSは上昇した (図2b, c)。このことから、ORP10はPI4Pと引き換えにPSを小胞体からエンドソームへ交換輸送する活性を有することが示唆された。

さらにORP10による脂質交換輸送能を機能喪失法により検証した。ORP10ノックアウト細胞では、エンドソームのPS量が顕著に減少していたことから、ORP10はPSをエンドソームに正常に供給するのに必須の役割を担うことが判明した。ところが、エンドソームのPI4P量は、ノックアウト細胞とコントロール細胞で同程度であった。ORP9は*in vitro*においてPI4P輸送活性が認められていることから、ORP10ノックアウト細胞においてエンドソームPI4P量に変化がないのはORP9による機能補償であると予想した。そこでORP9ノックアウト細胞におけるエンドソームPI4P量を測定したところ、コントロール細胞に比して増加していることが判明した。これらのことから、ORP10は小胞体-エンドソームコンタクトにおいて、エンドソームのPI4Pを小胞体へ輸送すると同時に、小胞体からPSをエンドソームへ交換輸送していることが明らかになった。

6. ORP10による脂質交換輸送は、エンドソームにおける逆行輸送を制御する

では、ORP10を介したPI4P/PS交換輸送は、どのような

細胞機能を担うのであろうか？ ORP10ノックアウト細胞では、エンドソームのPS量が減少していたことから、PSに依存してエンドソームに局在する分子の局在異常が予想された。事実、PS依存的にエンドソームに局在することが知られているEHD1¹²⁾を調べたところ、ORP10ノックアウト細胞ではそのエンドソーム局在が減少していた。EHD1は、膜のリモデリングを制御するAAA ATPaseであり、エンドソームからトランスゴルジ網への逆行輸送の際にエンドソーム膜の分裂を促進することが報告されている^{13, 14)}。そこでORP10ノックアウト細胞におけるエンドソーム膜の分裂過程をライブイメージングにより定量解析したところ、コントロール細胞に比べてエンドソーム膜が分裂するのに要する時間が顕著に増加していた。さらに、マンノース6-リン酸受容体の輸送を調べたところ、ORP10ノックアウト細胞ではエンドソームからトランスゴルジ網への輸送が遅延しており、内在性のマンノース6-リン酸受容体はエンドソームに異常蓄積していた。以上の結果から、ORP10は自身の脂質交換輸送活性によりエンドソームへPSを供給することでEHD1をリクルートし、エンドソームからトランスゴルジ網への逆行輸送プロセスを制御することが判明した¹⁵⁾ (図3)。

7. おわりに

ORP10による小胞体-エンドソームコンタクトにおける脂質交換輸送制御の仕組みが明らかになったことで、PI4Pが駆動する脂質交換輸送は細胞内のメンブレコンタクトで広く作動するメカニズムであり、ORPファミリーは「PI4P駆動型脂質交換輸送」制御分子群であることが強く示唆された。一方で、その時空間制御機構—ORPsのオルガネラ特異性の決定やメンブレコンタクトの形成制御な

ドーンについては、PHドメインによるオルガネラ特異的局在化機構などが徐々に明らかになりつつあるものの依然として不明な点が多く、今後の課題である。また、ORP10による脂質交換輸送が膜輸送に密に連動して作動していたことから、メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送は、細胞の状態に応答して膜の脂質組成をすばやく調整し、さまざまな生命現象の反応場を制御する役割を担っていると我々は考えている。

謝辞

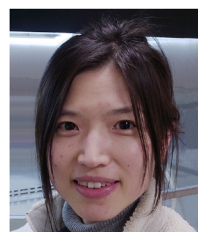
本稿で紹介したORP10の機能解析は、秋田大学・中西広樹博士、東京医科歯科大学・長谷川純矢博士、佐々木純子博士および佐々木雄彦博士、東北大学・田口友彦博士、東京大学・新井洋由博士、新潟大学・酒井晶子博士および五十嵐道弘博士との共同研究の成果です。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L.L., Levine, T.P., Pellegrini, L., Reinisch, K., et al. (2019) Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.*, **10**, 1287–1211.
- 2) Porter, K.R. & Palade, G.E. (1957) Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 269–300.
- 3) Vance, J.E. (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7248–7256.
- 4) Prinz, W.A., Toulmay, A., & Balla, T. (2019) The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 7–24.
- 5) Holthuis, J.C.M. & Levine, T.P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 209–220.
- 6) Wong, L.H., Čopić, A., & Levine, T.P. (2017) Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 516–530.
- 7) Raychaudhuri, S. & Prinz, W.A. (2010) The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **26**, 157–177.
- 8) Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czaplá, H., Tanner, L.B., Narayanaswamy, P., Wenk, M.R., Nakatsu, F., & De Camilli, P. (2015) PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*, **349**, 428–432.
- 9) Nakatsu, F. & Kawasaki, A. (2021) Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 664788.
- 10) Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., & Antonny, B. (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*, **155**, 830–843.
- 11) Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A., Kumar, A., Poletto, M., Kaksonen, M., & Gavin, A.-C. (2013) Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature*, **501**, 257–261.
- 12) Lee, S., Uchida, Y., Wang, J., Matsudaira, T., Nakagawa, T., Kishimoto, T., Mukai, K., Inaba, T., Kobayashi, T., Molday, R.S., et al. (2015) Transport through recycling endosomes requires EHD1 recruitment by a phosphatidylserine translocase. *EMBO J.*, **34**, 669–688.
- 13) Deo, R., Kushwah, M.S., Kamekar, S.C., Kadam, N.Y., Dar, S., Babu, K., Srivastava, A., & Pucadyil, T.J. (2018) ATP-dependent membrane remodeling links EHD1 functions to endocytic recycling. *Nat. Commun.*, **9**, 5187–5115.
- 14) Cullen, P.J. & Steinberg, F. (2018) To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 679–699.
- 15) Kawasaki, A., Sakai, A., Nakanishi, H., Hasegawa, J., Taguchi, T., Sasaki, J., Arai, H., Sasaki, T., Igarashi, M., & Nakatsu, F. (2022) PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.*, **221**, e202103141.

著者寸描

●河崎 麻実 (かわさき あさみ)



新潟大学大学院医学系研究科特任講師。薬学博士。

■略歴 1982年広島県で生まれる。2004年広島大学医学部薬学科卒業。09年同大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了。大阪大学大学院医学系研究科博士研究員を経て、11年より現職。

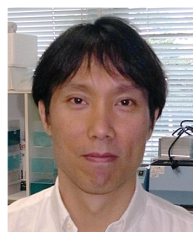
■研究テーマと抱負 メンブレンコンタクトを介した脂質輸送の生理機能解明。

細胞の個性を生体膜脂質から特徴づけたい。

■ウェブサイト <https://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

■趣味 料理。

●中津 史 (なかつ ふびと)



新潟大学大学院医歯学総合研究科准教授。博士（医学）。

■略歴 2001年千葉大学大学院医学研究科卒業後、金沢大学がん研究所博士研究員（日本学術振興会特別研究員）、理化学研究所・研究員、Yale大学Post-doctoral fellow（日本学術振興会海外特別研究員）、Yale大学Associate Research Scientistを経て、14年より現職。

■研究テーマと抱負 イノシトールリン脂質による膜動態制御の仕組みと生理機能の解明。真に「おもしろい」研究を目指しています。

■ウェブサイト <https://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/index.html>

■趣味 水泳、散歩。