

科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」 研究概要
〔令和4年度事後評価用〕

令和4年6月30日現在

機関番号：12602
 領域設定期間：平成29年度～令和3年度
 領域番号：3904
 研究領域名（和文）細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読
 研究領域名（英文）Toward an integrative understanding of functional zones in organelles
 領域代表者
 清水 重臣（SHIMIZU Shigeomi）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
 研究者番号：70271020
 交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,214,600,000円

研究成果の概要

各研究班が、さまざまな生命現象において、30を超える「オルガネラ・ゾーン」がオルガネラ上（内）に存在することを示し、それらが生理学的に重要な機能ドメインを形成していることを証明した。これらの事実は、「オルガネラ・ゾーン」という概念の妥当性を示すものである。また、複数のオルガネラゾーンにおいて、その異常が細胞機能の変調をもたらすこと、それと連関するヒト疾患が存在すること、さらには「オルガネラ・ゾーン」を標的とした創薬の可能性も示され、その生物学的重要性は明白となった。

特に、小胞体やゴルジ体の内部に選別輸送ゾーンが存在する事実を、複数の班員が示したことは、細胞生物学にとって非常に大きな進歩である。即ち、これまでは、700を超える分子がどのように適切に糖鎖修飾等を受けるかは不明であったが、実際には、個々の小胞体／ゴルジ体経由分子が自らの選別輸送ゾーンに入ることで、適切な修飾や選別を受けることが明らかになった。

連携ゾーンに関しては、独自の技術開発により、ゾーン形成のライブイメージング、連携ゾーン構成分子の網羅的解析に成功した。また、この技術を応用して、さまざまなオルガネラ間で多様な連携ゾーンが発見された。

応答ゾーンに関しては、リサイクリングエンドソーム上のゾーンが、細胞増殖シグナルを制御していること、ゴルジ体膜がタンパク質分解を実行するゾーンに使われるなど、ゾーン概念を導入することにより、驚くべきオルガネラ機能が次々と発見された。

これらの発見は、個々のゾーンの解析として重要な知見をもたらしたとともに、ゾーンという新たな視点からの生物学の必要性を示すことができた。

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ、ゾーン、超解像顕微鏡、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム

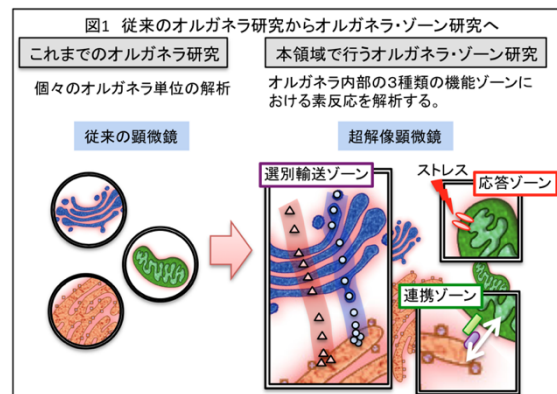
1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官（オルガネラ）は、各々が高度に専門化した役割を分担している。多様な生命現象を理解するためには、このようなオルガネラの機能や動態を正しく解析することが必要不可欠であり、このためには高度な細胞観察技術が求められる。実際に、顕微鏡の空間分解能や時間分解能の進歩に伴って、オルガネラの機能や反応が徐々に明らかにされてきた。

さらに、最近になって、STEDやPALMなどに代表される超解像顕微鏡の開発や高速度撮影技術の急速な進歩などにより、細胞の観察技術は飛躍的に発展しつつある。そして、オルガネラを精密に観察できるようになった結果、(1)1つのオルガネラの中に、異なる役割を担う領域が存在しうること、(2)オルガネラ機能の多くは、これらの領域における素反応の集積として発揮されること、が明らかにされつつある。このように、従来とは異なるアプローチで、オルガネラ研究を一段深いレベルで行うことが可能となっている(図1)。本領域では、オルガネラ研究に大きな貢献を為してきた研究者が集結し、一体となってオルガネラ研究を牽引していく。

このような背景のもと、本領域では、オルガネラの限局された機能領域を「ゾーン」と命名し、従来のオルガネラ研究から、オルガネラ・ゾーン研究へと転換する。即ち、各オルガネラ・ゾーンでの素反応を解析することによって、オルガネラの機能や役割をより深く、より正しく知り、細胞現象や生体現象の理解に繋げていく。

具体的には、(1)様々なオルガネラストレスに対する応答の実態を、その反応の場(応答ゾーン)における素反応解析により明らかにする。また、(2)オルガネラには他のオルガネラと相互作用する機能が有ることが明らかにされつつある。そこで、この相互作用の実態や役割を、相互作用の場(連携ゾーン)を解析することによって明らかにする。さらに、(3)小胞体やゴルジ体はこれまで1つのオルガネラとして解析されてきたが、本領域の班員は、実はその内部には複数の異なる機能(例えば、糖鎖修飾やリン酸化といった機能)を有する領域が存在し、これらを経由することによって、蛋白質の修飾や輸送が適切に実行されているという革新的な知見を見出しつつ有る。そこで、これらの領域(選別輸送ゾーン)の実態や役割を明らかにすることによって、小胞体やゴルジ体を、複数の選別輸送ゾーンの集合体として理解し、新たに定義し直す。



2. 研究の目的

本領域では、オルガネラゾーンを3つのゾーンに分類し、(1)超解像顕微鏡などを用いて各ゾーンを精密に観察し、(2)これらのゾーンを構成する分子の同定や形成機構を明らかにする。さらに、(3)各ゾーンを人為的に調節した時のオルガネラ機能、細胞機能、生体機能の変化を解析することで、各ゾーンの生理的役割を明らかにする。また、(4)未知のオルガネラ・ゾーンを同定するためのスクリーニングを行い、網羅的にオルガネラ・ゾーンを明らかにしていく。

具体的には、以下の課題に取り組む。

「応答ゾーンの解析」:(1)各オルガネラにストレスを加えた時に、主にオルガネラ膜上に出現する応答ゾーンを可視化し、(2)この応答ゾーンが形成される素過程とその分子機構を明らかにする。さらに、(3)このような応答ゾーンが如何にオルガネラ機能を調節し、ひいては細胞や生体の制御に関わっているかを明らかにする。

「連携ゾーンの解析」:(1)種々のオルガネラ連携ゾーン(ゴルジ体⇄小胞体、小胞体⇄ミトコンドリア、ミトコンドリア⇄ゴルジ体、リソソーム⇄ミトコンドリア、小胞体⇄核など)を構成する蛋白質や脂質の同定、(2)これらのオルガネラ連携ゾーンが、いつ、如何なる時に生じる(増減する)か、(3)連携ゾーンが形成される分子メカニズムの解明(特異的膜脂質組成を持つゾーンの形成機構や特定の蛋白質の集合/解離など)、(4)これらのオルガネラ連携の役割(連携を破綻させた時に生じるオルガネラや細胞の変化)を明らかにする。また、(5)新規のオルガネラ連携ゾーンを同定し、同様の解析を行う。

さらに、「オルガネラ連携」間の相互作用にも留意し、(1)刺激に応答して生じる複数のオルガネラ連携を捕捉した上で、(2)特定のオルガネラ連携を調節した時に、他のオルガネラ連携に如何なる影響が生じるかを明らかにする。

「選別輸送ゾーンの解析」:領域の研究者が発見した革新的な知見「各蛋白質は、特定の選別輸

送ゾーンで、特定の修飾を受け、細胞内各所に適切に運搬される」をさらに詳細に解析する。即ち、(1)種々の選別輸送ゾーンの動態を超解像顕微鏡などにより観察する。(2)これらのゾーンの構成分子や機能を同定する。(3)個々の蛋白質が、適切な選別輸送ゾーンを選択するメカニズムを解明する。(4)特定の選別輸送ゾーンを人為的に調節したときのオルガネラ、細胞、個体の変化を明らかにする。さらに、(5)新規の選別輸送ゾーンを同定し、同様の解析を行う。なお、遺伝学を使えるモデル生物（酵母、ショウジョウバエ）と哺乳動物細胞の解析を並行して行う。

3. 研究の方法

本研究領域は1つの総括班、9つの計画班、公募班（前半19班、後半17班）より構成された。本領域が掲げる目標は、細胞の様々な様態におけるオルガネラ・ゾーン動態を解析し、その生物学的な役割を明らかにすることである。この目的のために、各オルガネラの専門家、細胞反応をオルガネラから捉える研究者に加え、分子イメージング、ケミカルバイオロジー、糖鎖解析のエキスパートなどを融合することにより、研究者間の有機的連携を図り、研究領域全体の目標達成と発展を目指した。

共同研究の推進・領域の発展には、各研究班のオルガネラ・ゾーン解析レベルを高精度均一化することが必要であると考え、最先端技術を利用できる研究プラットフォームを整備した。具体的には、総括班内に技術支援部門を設置した。この部門では、世界最先端の技術であるSCLIMイメージング、超解像イメージング、電子顕微鏡解析、プロテオーム解析、糖鎖解析、脂質解析、siRNAライブラリースクリーニング、CRISPRによる変異細胞群作成支援等を提供した。また、領域内連携を進めるためには、お互いの研究の成果や研究手法、研究資材を知る必要がある。このために、総括班内に、領域全体の運営・進捗管理を行う事務部門を設置した。事務部門では、情報共有の場の提供、情報発信、自己点検評価、若手研究者の育成、アウトリーチ活動などを行った。これらの成果として、研究組織間の関係が進み、毎年56~62件の共同研究が行われた。

4. 研究の成果

本領域では、オルガネラの限局された機能領域を「ゾーン」と命名し、①オルガネラゾーンの概念の妥当性の証明、②選別輸送ゾーンの存在の証明、③応答ゾーンや連携ゾーンの生体での役割の解明などを明らかにすることを目的とし、このために、ゾーンの可視化、構成分子や形成メカニズムの同定、ゾーンの生理機能解明などの解析を行なった。

各研究班が、さまざまな生命現象において、30を超える「オルガネラ・ゾーン」（概ね50 nm~300 nmのサイズの特定の機能部位）がオルガネラ上（内）に存在することを示し、それらが生理学的に重要な機能ドメインを形成していることを証明した。

また、複数のオルガネラゾーンにおいて、その異常が細胞機能の変調をもたらすこと、それと関連するヒト疾患が存在すること、さらには「オルガネラ・ゾーン」を標的とした創薬の可能性も示され、その生物学的重要性は明白となった。これらの発見は、個々のゾーンの解析として重要な知見をもたらしたとともに、ゾーンという新たな視点からの生物学の必要性を示すことができ、当初の予定を上回る成果であった。

A01: 応答ゾーン、連携ゾーンの解析

応答ゾーン解析の達成状況:(1)オルガネラの局所で機能を発揮する12の応答ゾーンを同定した。(2)このうち、アポトーシス実行ゾーンなど、複数の応答ゾーンの可視化に成功し構造的実体を明らかにした。(3)ゴルジ体自然免疫応答ゾーンなど、複数の応答ゾーンの形成素過程と分子機構を明らかにした。さらに、(4)ゴルジ体ストレス応答ゾーンなどは、その破綻が起源となって神経細胞の生存ができず、神経変性疾患を発症するため、ゾーン機能が恒常性維持や正常な生命活動に不可欠であることを見出した。加えて、(4)刺激によって複数のゾーンが同時進行的に形成・誘導され、お互いにクロストークして、一つのオルガネラ反応となること、(5)細胞増殖に関わるHippo経路が、リサイクリングエンドソーム上の応答ゾーンで活性化されるなど、予想外の細胞

機能が、「応答ゾーン」で実行されることを見出した。

連携ゾーン解析の達成状況：split-GFP を用いた実験系を独自に開発し、任意のオルガネラ間連携ゾーンを生きた細胞を用いて、可視化、定量化することに成功した。以前は、固定した細胞を用いた電子顕微鏡解析でしか評価できなかった連携ゾーンを、生きた細胞を用いて、そのダイナミクスまでを解析可能になったことは、オルガネラゾーン研究を大きく前進させるものである。実際に、世界中からこの split-GFP のコンストラクトの供与依頼があったことも、この実験手法のインパクトの大きさを示している。またこの実験系をさらに応用し、siRNA ライブラリを用いた split-GFP のシグナルを指標とした遺伝学的スクリーニングや、split-GFP と split-TurboID（ビオチン化酵素）をタンデムに融合したモデルタンパク質を用いた生化学的解析により、連携ゾーンに集積するタンパク質を網羅的に同定することに成功した。これまで連携ゾーンに局在化する因子に関しては、逆遺伝学的な解析が主流であったが、バイアスの少ない網羅的な方法で連携ゾーン因子を同定したことは連携ゾーン研究によって大きな進歩である。特に ER-ミトコンドリア間連携ゾーン形成がヒトの神経変性疾患との関連が指摘されており、そのインパクトは大きい。さらに、ER ストレス環境では ER-ミトコンドリア間連携ゾーンが動的に変化することで、これらのオルガネラ間におけるリン脂質輸送を制御し、その結果 ER ストレス軽減のための ER 膜の拡大を引き起こすことも見出した。これらの発見は、連携ゾーンのダイナミクスが細胞ストレス応答に重要であることを示す先駆的なものである。

具体的には、(1)ミトコンドリア⇄小胞体ゾーンを中心に、11 の連携ゾーンの可視化、構成分子の同定、生理機能の解明に成功した。(2)ミトコンドリア⇄小胞体ゾーン以外に、新たにミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソーム、液泡、脂肪滴のすべての組み合わせにおいて連携ゾーンが存在すること、(3)様々なオルガネラの間連携ゾーンが、細胞ストレス環境において、ダイナミックその数や程度を変化させ、細胞ストレス応答に重要な役割を果たしていること、(4)同じオルガネラ間でも、異なる機能を発揮する複数の連携ゾーンが存在すること。(5)未知の連携ゾーンの同定法、可視化法の確立に成功した。

A02: 選別輸送ゾーンの解析

選別輸送ゾーン解析の達成状況：(1)酵母細胞や哺乳動物細胞の小胞体やゴルジ体においても、複数の選別輸送ゾーンが存在することを証明した。(2)複数のゾーンに関して、高精度の可視化、構成分子の同定に成功した。(3)ゾーン構成分子をゾーン外に移動させると、機能が失われることを証明し、ゾーン形成の生物学的重要性を確認することができた。さらに、(4)積荷蛋白質に付与されたシグナルと膜の相互作用によって、通過するゾーンが決定されること、(5)ゾーンは細胞のおかれた環境によって、ダイナミックにエリアを拡大縮小させうること、(6)複数の選別輸送ゾーンを制御できるマスター分子が存在する可能性があることなどを見出した。酵母細胞から哺乳動物細胞に至るまで、選別輸送ゾーンが存在することを実証したことは、小胞体、ゴルジ体をはじめとする細胞内蛋白質輸送の理解にパラダイムシフトをもたらす大きな発見である。

総括班：オルガネラゾーン統合解析プロジェクト

一つの細胞内で、複数のオルガネラゾーンが、同時多発的に形成されることが予想される。複数のオルガネラゾーンのクロストークを調べるために、インスリン分泌の際に形成されるオルガネラゾーンを、総括班メンバーが総力をあげて解析した。膵β細胞では、周囲のグルコース濃度を低下させると、インスリン分泌が急速に遮断され、細胞内インスリンが分解される。この時に生じるゾーンを解析した。その結果、細胞内のインスリンを分解するために、①ゴルジ体蛋白質分解応答ゾーンが活性化し、さらに、②ゴルジ体転写活性応答ゾーン、③小胞体関連分解ゾーン、④ミトコンドリアーゴルジ体連携ゾーンが同時に活性化されることが確認できた。さらに、ゴルジ体蛋白質分解応答ゾーンを破壊させると、他の 3 つのゾーンがさらに活性化されることを見出し、一つのゾーンが、他のゾーンとクロストークしていることが明らかとなった。これらの事実、オルガネラ・ゾーンの同時多発性、ゾーン間のクロストークの重要性を示している。

5. 主な発表論文等 (受賞等を含む) (国際誌 総計 450 報)

1. Nakano A. The Golgi apparatus and its next-door neighbors. **Frontiers Cell Dev. Biol.** 10:884360, 2022.
2. Shimizu S. Organelle zones in mitochondria **J. Biochem.** 165, 101-107. 2019
3. Kurokawa K., Nakano A. The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus. **J. Biochem.** 165,109-114, 2019.
4. Nakano A., von Blume J. Organelle zones. **Mol. Biol. Cell** 30, 731, 2019.
5. Nishitoh H. Paradigm shift from "Compartment" to "Zone" in the understanding of organelles. **J. Biochem.** 165, 97-99, 2019.
6. Yamaguchi H, Honda S, Katoh K., (他 7 名), *Shimizu S. Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration. **Nat. Commun.** 11, 5311, 2020.
7. Tamura T, (他 7 名), Tamura Y., *Hamachi I. Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. **Nat. Chem. Biol.** 16, pages1361-1367, 2020
8. Matsumoto S, (他 3 名), Tamura Y., *Endo T. Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. **Mol. Cell** 76(1) 191-205.e10, 2019
9. Tsuji T, (他 7 名), Arai H., (他 2 名), *Fujimoto T. Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution. **Proc .Natl. Acad. Sci. USA** 116, 13368-13373, 2019
- 10, Shimanaka Y, Kono N., (他 10 名), *Arai, H. Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation. **Nat. Med.** 23, 1287-1297, 2017.
- 11, Ninagawa S, (他 14 名), *Mori K. Antipsychotic olanzapine-induced misfolding of proinsulin in the endoplasmic reticulum accounts for atypical development of diabetes. **eLife.** 9:e60970, 2020
- 12, Rodriguez-Gallardo S, (他 9 名), Nakano A., Kurokawa K, Muñiz M, *Funato K. Quality-controlled lipid-based protein sorting into selective ER exit sites. **Cell Rep.** 39:110768, 2022.
- 13, Rodriguez-Gallardo S, *Kurokawa K., (他 13 名), Nakano A., *Muñiz M. Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. **Sci. Adv.** 6:eaba8237, 2020.
- 14, *Kurokawa K., (他 5 名), *Nakano A. Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus in living yeast cells. **J. Cell Biol.** 218:1602-1618, 2019.
- 15, Kawaguchi K, (他 3 名), *Goto S. Hrd1-dependent degradation of the unassembled PIGK subunit of the GPI transamidase complex. **Cell Struct. Funct.**, 46, 65-71, 2021
- 16, Kunii M, (他 9 名), *Harada A. SNAP23 deficiency causes severe brain dysplasia through the loss of radial glial cell polarity. **J. Cell Biol.** 220 (1): e201910080, 2021
- 17, Sobajima T, (他 4 名), *Harada A. The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. **J. Cell Biol.** 217, 1777-1796, 2018

ホームページ等

- 1, 領域ホームページ(<https://www.tmd.ac.jp/organellezone/outline/index.html>)