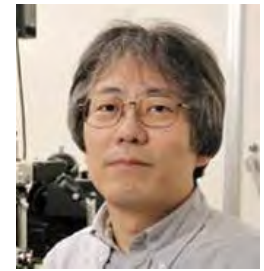


佐甲細胞情報研究室

主任研究員 佐甲 靖志 (D.Sci.)



(0) 研究分野

分科。: 生物

キーワード: 生体膜、受容体、細胞内情報伝達、蛋白質ダイナミクス

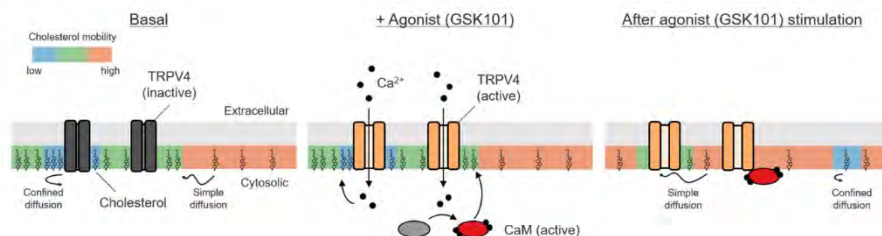
(1) 研究背景と研究目標

蛋白質分子・分子システム・細胞の各階層において、生体システムの示す情報処理機能の性質とその発現機構の解明を目標としている。環境ノイズと同レベルの低エネルギーで働く生体素子が集積して内在性あるいは外来性の情報を処理し、柔軟な細胞応答を生み出す仕組みを探る。細胞内1分子計測技術を始めとする顕微計測、細胞工学、生体システムの再構成、反応ネットワークの数理解析、計算機実験などの技術を開発・応用し、さらに1細胞計測により、細胞毎の応答ダイナミクスとゆらぎを実測し解析する。現在の主要な対象は、細胞膜受容体RTK、GPCRを起点とする細胞内情報処理システムである。これらのシステムで働く個々の蛋白質の分子反応と分子動態の詳細を知り、さらに細胞内における反応ネットワーク動態と細胞応答の関係を明らかにして、細胞運命を決定する情報処理を理解したい。

(2) 2023年度成果と今後の研究計画

イオンチャネルを通過するCa²⁺流入による細胞膜の再編成

TRPV4は細胞膜に存在するCa²⁺透過性の非選択的陽イオンチャネルであり、コレステロールやイノシトールリン酸といった膜脂質による活性制御を受けることが知られている。TRPV4の細胞質側にはコレステロール結合配列があり、コレステロールに富む膜構造であるカベオラへの集積が報告されている。TRPV4と細胞質側の膜内コレステロールの相互作用を調べるため、生細胞内で2色の蛍光1分子計測を行った。コレステロールの標識には、共同研究者が開発したD4H蛋白質を用いた。TRPV4とコレステロールは共に流動性の低い膜ドメインに集合しており、ドメインはカベオラの内外に見られた。TRPV4アゴニストを加えると、膜表面のコレステロール密度が大幅に低下し、TRPV4との共局在率が半減したが、これらの減少は主として流動性の低い膜構造で起こった。TRPV4のチャネル活性はコレステロールによって低下するため、この現象はチャネル活性に対する2重抑制すなわち正のフィードバック回路である。TRPV4のコレステロール結合部位における変異体R616Qは以上の現象に関与しなかったが、細胞外のCa²⁺をキレートして流入を止めると、アゴニスト存在下でもコレステロール減少が起こらなくなった。意外なことにカルシウムイオノフォアによるCa²⁺流入はコレステロール減少を起こすことができず、TRPV4を通過したCa²⁺による部位選択的なCa²⁺濃度上昇が必要であることが示唆された。コレステロール減少の分子機構は明らかでないが、TRPV4の細胞質側に存在するカルモジュリン結合部位に変異を入れることによって部分的に抑制されることから、TRPV4近傍でCa²⁺結合によって活性化されたカルモジュリンがTRPV4に結合することが関与していると推測される。(Kuwashima et al. 2024)

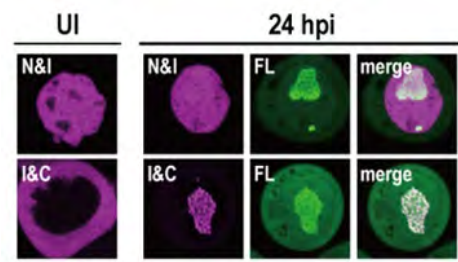


A model of cholesterol remodeling regulated by the Ca²⁺ influx through TRPV4 channel.

昆虫ウイルス蛋白質IE1の核内集積制御

バキュロウイルスIE1蛋白質はウイルスのDNA複製とRNA転写に関わる多機能蛋白質である。IE1は宿主核内においてフォーカスを形成して早期遺伝子転写を促進し、その後DNA複製時にはフォーカスは拡大・融合したvirogenic stroma (VS)の形成に関わる。アミノ酸配列

からIE1はN, I, Cの3つのフォールド領域とそれらの間の天然変成領域を持つと予想し、各ドメインを細胞内に発現させて機能解析を行ったところ、NドメインとIドメインの間にある天然変成領域が核移行シグナルを持つことが明らかになった。また、Iドメインにあるshort linear motive (SLiM)と予想される配列を削除するとIE1の核およびVSへの局在が阻害された。核局在はfocus形成と早期遺伝子発現、VS局在はVSの形成とDNA複製に必要である。分子内FRET計測により、感染ステージにつれてI-Cドメインが構造変化することがわかり、SLiMが構造変化とIドメインの2量体形成に関わることも明らかになった。SLiMの変異体S291AとS291Eは核局在、VS局在能を保持しているが、両者は感染後のfocus形成時間の違いをもたらす。これらの結果はSLiMのリン酸化によるIE1の構造変化が機能変化のメカニズムであることを示唆している。(Nagamine and Sako 2023)



IE1断片によるfocus, VS形成

その他、細胞膜脂質と膜蛋白質のダイナミクスに関してストラズブール大学との共同研究を継続し、糖脂質の細胞膜内分布が細胞密度によって変化すること(Murate et al. 2023)や、HIV-1の感染において、ウイルス表面蛋白質Gagが宿主細胞膜の脂質ラフトに結合すること(Tomishige et al. 2023)を明らかにした。

今後もこれらの研究を継続・発展させる。

(3) 研究室メンバー

(2023年度)

(主任研究員)

梅木伸久、吉澤亮、永峰俊弘

佐甲靖志

(テクニカルスタッフ)

(専任技師)

佐藤裕美、中西睦、菅美良、湊原麻衣子、

山本明弘

Dong Kesu

(専任研究員)

(研修生)

荒田幸信、阿部充宏、岡本憲二

桑島佑太郎

(研究員)

(研究パートタイマー)

太田伊津美

(4) 発表論文等

1. “TRPV4-dependent Ca^{2+} influx determines cholesterol dynamics at the plasma membrane”, Kuwashima, Y., Yanagawa, M., Maekawa, M., Abe, M., *Sako, Y., and *Arita, M. **Biophys. J.** in press (2024). *co-corresponding
2. “HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane reorganizes sphingomyelin and cholesterol rich lipid domains”, Tomishige, N., Nasim, M. B., Murate, M., Pollet, B., Didier, P., Godet, J., Richert, L., Sako, Y., Mély, Y., and Kobayashi, T. **Nat. Commun.** 14, 7353 (2023).
3. “A SLiM-dependent conformational change in baculovirus IE1 controls its focus formation ability”, Nagamine T. and Sako Y. **J. Gen. Virol.** 104, doi: 10.1099/jgv.0.001910 (2023)
4. “Cell density-dependent membrane distribution of ganglioside GM3 in melanoma cells”, Murate, M., Yokoyama, N., Tomishige, N., Richert, L., Humbert, N., Pollet, B., Makino, A., Kono, N., Mauri, L., Aoki, J., Sako, Y., Sonnino, S., Kaneko, M. K., Kato, Y., Inamori, K-i., Iokuchi, J-i. Mély, Y., Iwabuchi, K., and Kobayashi, T. **Cell. Mol. Life Sci.** 80, 167 (2023).

Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_inf/index.html

<http://www2.riken.jp/cell-info/>