

提出日:2025 年 5 月 1 日

2024 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		ペルオキシソームー繊維毛間コレステロール輸送を規定する分子ダイナミクスの解明	
申請者 (実験責任者)	氏名	宮本 達雄	
	所属機関名・部局名	山口大学 大学院医学系研究科 分子細胞生理学講座	
	職名	教授	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)			原子分解能/3D-AFM
		○	高速 AFM
			SICM
			細胞測定 AFM
NanoLSI 受入担当教員名		中山 隆宏	
一次繊維毛は細胞周期の G0 期にヒト細胞表面に発達する微小管性の突起構造であり、細胞外情報を受容する「センサー」として機能する。一次繊維毛を覆う繊維毛膜は他の領域と比較してコレステロールの含有量が高く、繊維毛膜は GPCR 受容体などを集積する巨大な膜ドメインとして機能する。臨床的にも、コレステロール生合成欠損症 (Smith-Lemli-Opitz 症候群) やペルオキシソーム形成不全症 (Zellweger 症候群) では繊維毛膜コレステロールが低下して多発性嚢胞腎や小脳低形成による運動失調などの繊維毛病を発症することから、コレステロールは繊維毛機能を担う必須分子として位置付けられる。研究代表者らは、(1) ペルオキシソームが微小管上を繊維毛に向かって運動すること、(2) 繊維毛基部に局在するコレステロール輸送体・ORP3 がペルオキシソームからコレステロールを繊維毛へ供給することを明らかにした (Miyamoto <i>et al.</i>, <i>EMBO J</i> 2020)。また、ペルオキシソーム膜上の VAP (Vesicular Associated Protein)-A が ORP3 と分子複合体を形成して、ペルオキシソームを介した繊維毛コレステロール供給を担うことを見出した。興味深いことに、<i>VAP-A</i> 遺伝子欠損細胞においても繊維毛膜コレステロールが低下することが明らかになった。これらの知見に基づき、本研究では、高速 AFM による ORP3/VAP-A 分子複合体の分子動態観察系を構築して、繊維毛コレステロール供給の分子機構とその破綻による繊維毛病発症機構の解明を研究目的とした。 本研究において、GST 融合型 ORP3 を precision protease による GST 切断を行い、より正確な ORP3 分子動態の観察系を確立した。その結果、高速 AFM 下では、ORP3 は OHD ドメインが単一の球状構造として検出でき、PH ドメインとリンカー部分は天然変性領域として観察された。C 末端に His タグを付加した正常型 <i>VAP-A</i> タンパク質を 3-アミノプロピルトリエトキシシランを用いて試料ステージ上にクロスリンクした後、ORP3 タンパク質を添加すると、ORP3 と <i>VAP-A</i> の分子中心間距離 20 nm の分子複合体が形成されることが示された。また、ヒトで見出される <i>VAP-A</i> 変異体タンパク質は ORP3 との結合時間が有意に短縮することが明らかになった。さらに、高速 AFM 観察データと一致して、免疫沈降解析によっても、ORP3 と <i>VAP-A</i> 変異体タンパク質との相互作用が顕著に低下することが示された。<i>VAP-A</i> 欠損細胞における繊維毛膜コレステロール低下は、正常型 <i>VAP-A</i> 遺伝子導入によって正常化するのに対して、<i>VAP-A</i> 変異体には繊維毛膜コレステロール量を増加させる活性が示されなかった。以上のことから、ORP3 と <i>VAP-A</i> 変異体との結合不全が、繊維毛膜コレステロールの低下を引き起こすことが初めて実証された。			

※本様式 3 は、“事業成果報告”として、NanoLSI Web サイトにて公開させていただく予定です。
※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限:2025 年 5 月 9 日(金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。
※提出先:金沢大学 WPI-NanoLSI Bio-SPM 技術共同研究事業担当係 国岡 E-mail: nanolsi_openf01@ml.kanazawa-u.ac.jp