

令和元年度 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	自然免疫応答に関わるゴルジ体膜脂質ドメインの動態解析	
新規・継続の別	新規・継続	
研究代表者	所属	東北大学大学院 生命科学研究科
	職名・氏名	教授・田口 友彦
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	東北大学大学院 生命科学研究科
	職名・氏名	助教・向井康治朗
	所属	東北大学大学院 生命科学研究科
	職名・氏名	修士1年・高橋花乃子
受け入れ教員	職名・氏名	田中 一馬
概要 (100～150字程度)	本研究では、ゴルジ体における STING の活性化機構に関わると推測されるスフィンゴミエリンを含有するゴルジ体脂質ドメインに着目して研究を進める。脂質分布と膜の物性という点から解析することで、STING の活性化に必要なゴルジ体脂質ドメインの動態および物理的な特性を明らかにする。	
研究目的 (300字程度)	研究代表者のグループは、細胞質 DNA 応答性自然免疫分子 STING の活性化には、STING のパルミトイル脂質修飾およびゴルジ体のスフィンゴミエリンが必要であることを明らかにしてきた (Mukai et al., Nat Commun 2016)。これらの知見から、スフィンゴミエリンが形成するゴルジ体脂質ドメインが、パルミトイル化修飾を受けた STING のクラスター化を促し、STING の活性化を引き起こしているものと考えている。本研究では、スフィンゴミエリンを含有するゴルジ体脂質ドメインを種々の脂質関連プローブにより可視化し、これまでの生化学的アプローチでは問うことができなかった STING の活性化に必要なゴルジ体脂質ドメインの動態および物理的な特性を明らかにすることを目的とする。	
研究内容・成果 (1000字程度)	<p>本年度は、2種類の実験系、1) 脂質関連プローブ観察の実験系、ならびに2) 細胞内生体膜物性評価系を確立するために、予備的な条件検討を中心に研究を進めた。</p> <p>1) 脂質関連プローブ観察の実験系の確立</p> <p>本年度は、コレステロールを可視化するツールの開発を行った。コレステロールはスフィンゴミエリンと親和性が高く、ゴルジ体上でのドメイン形成過程に関わる可能性が予測される。スフィンゴミエリンについては、結合タンパク質 Equinatoxin II を用いた内膜系染色プローブによる観察法が確立している一方、コレステロールについては細胞膜以外についての可視化は成功に至っていない。そこで、ステロール結合性毒素 Perfringolysin O のステロール結合ド</p>	

	<p>メイン D4 に複数箇所変異を入れることにより結合性を高めた improved D4H (iD4H) を開発し、その性質について評価を行った (iD4H の開発は遺伝子病制御研究所 (以下、遺制研) にて、評価については東北大にて行った)。その結果、D4 が細胞の生体膜のステロールを全般的に可視化するのに対し、iD4H はオルガネラ膜(内膜) のステロールを好んで可視化している傾向を認めた。現在、内膜系の iD4H 分布がどのオルガネラに由来しているかを解析している。来年度は、プローブのさらなる改良ならびにその評価方法の確立を予定している。</p> <p>2) 細胞内生体膜物性評価系の確立</p> <p>スフィンゴミエリンから形成される膜ドメインは、ゴルジ体の他の領域とは脂質組成が異なり、脂質充填密度など膜の物性に影響すると予測される。膜の物性は局在するタンパク質の機能に影響する可能性が考えられる。そこで、本研究で用いる細胞種 (MEF 細胞) の内膜系でも、環境感受性蛍光試薬 Di-4-ANEPPDHQ を用いた脂質充填密度の評価を行うことが可能かについて検討した。まず、染色方法について、従来の方法で染色できることを確認した。そして、画像取得する際の、顕微鏡の設定の最適化を行った。現在は、顕微鏡の違いにより結果が異なる可能性を考慮し、当研究室の顕微鏡で同様の実験を行い、遺制研で取得する画像との整合性を確認している。今回の条件検討から今後の共同研究実験での画像解析に反映させたい。</p> <p>来年度以降は、上述の実験系の確度をあげ、STING 活性化に必要なゴルジ体脂質ドメインの動態および物理的な特性を決定したい。</p>
成果	<p>【学会報告】</p> <p>参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと</p> <hr/> <p>【論文発表】</p> <p>著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと</p> <hr/> <p>【新聞報道】</p>