

生細胞内メンブレンコンタクトを可視化する蛍光プローブの開発

(名工大工¹・名工大院工²・新潟大院医歯³) ○阿喰 萌香¹・吉川 優²・筒井 啓太²・中津 史³・築地 真也^{1,2}

Development of fluorescent probes for visualizing membrane contact sites in living cells (¹Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology, ²Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University) ○Moeka Ajiki,¹ Masaru Yoshikawa,² Keita Tsutsui,² Fubito Nakatsu,³ Shinya Tsukiji,^{1,2}

Eukaryotic cells contain various membrane-bound organelles such as the nucleus, mitochondria, and endoplasmic reticulum (ER). It has been recognized that these organelles are physically separated from each other. However, in recent years, a growing number of evidence has revealed that the ER communicates with other organelles and the plasma membrane (PM) by forming close contacts, often called “membrane contact sites” (MCSs). MCSs play various important roles in cell physiology. However, the spatiotemporal dynamics of MCSs in living cells remains poorly understood due to the lack of methods suitable for MCS visualization. In this work, we aimed to develop a method that allows specific visualization of MCS dynamics in living cells. For this purpose, we focused on splitFAST, a reversible fluorescence complementation system that allows monitoring of association and dissociation of an N-FAST/C-FAST fragment assembly in the presence of a fluorogenic dye, HBR. We will show that ORP5-mediated ER-PM contact sites can be visualized in living cells by using PM-targeted N-FAST and C-FAST-fused ORP5 constructs.

Keywords: membrane contact; fluorescent probe; split protein; plasma membrane; endoplasmic reticulum

真核細胞には、核、ミトコンドリア、小胞体 (ER) などに代表される「オルガネラ」が存在する。長年、これらのオルガネラはそれぞれが物理的・空間的に離れて存在していると考えられてきた。しかし近年、ERが細胞膜 (PM) や他のオルガネラと距離的に近接し、膜と膜がタンパク質によって係留されたメンブレンコンタクト (以下、コンタクト) を形成することが明らかになってきた¹⁾。コンタクトは、脂質交換をはじめとする様々な細胞生理機能を制御していると考えられている。しかし、コンタクトの形成や解消などの時空間動態を解析できる可視化技術の開発が遅れているため、コンタクトの機能や制御機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、生細胞内のコンタクト動態を特異的かつ可逆的に検出できる蛍光プローブの開発を目指した。

本研究では、コンタクト検出のための汎用的手法を確立するため、脂質交換輸送に関わるタンパク質 ORP5 による ER-PM コンタクトの蛍光検出から着手した。我々の戦略では、FAST と呼ばれるタンパク質を分割した splitFAST (N-FAST フラグメントと C-FAST フラグメントのペア) を利用する。FAST は本来、HBR という小分子化合物と結合することで蛍光を発するが、FAST を分割した N-FAST と C-FAST は HBR 存在下でも蛍光を発さない。一方、これらのフラグメントが近接すると両断片が結合して再構成し、HBR と結合して蛍光を発するようになる²⁾。そこで我々は、膜と膜が近接したコンタクト領域で splitFAST の再構成を引き起こすことでコンタクト領域を特異的に HBR 蛍光で可視化できるものと考えた。そこで、N-FAST を PM 上に、ORP5 に C-FAST を融合したものを ER 上に発現させたところ、ER 上の ORP5 が PM に接触した領域で splitFAST の再構成が起こり、ORP5 による ER-PM コンタクトを特異的に可視化することに成功した。本発表では、splitFAST によるコンタクト検出法と応用について報告する。

1) W. A. Prinz, A. Toulmay, T. Balla, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 7–24 (2020).

2) A. G. Tebo, A. Gautier, *Nat. Commun.* **10**, 2822 (2019).