

平成30年 5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18505

研究課題名(和文)PI(3,5)P2結合因子としてのWIPI familyの解析

研究課題名(英文)Analyses of WIPI family as a PI(3,5)P2 effector

研究代表者

田村 直輝(Tamura, Naoki)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70745992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はPI(3,5)P2エフェクター因子としてのWIPI familyの役割に焦点をあてた。PI(3,5)P2の量が増える様々な条件下でWIPI familyの挙動を追ったところ、高浸透圧ストレス条件下でWIPI-1とWIPI-2が細胞質にドット状の局在を呈することを見出した。各オルガネラマーカースとの比較やp62分解などの生化学的解析から高浸透圧ストレス条件下では一種のオートファジーが誘導されていることが分かった。上流シグナルの解析から、このオートファジーにはPI(3,5)P2の前駆体であるPI(3)Pが必要である一方で、飢餓誘導性オートファジーに必須なUlk複合体が必要ないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on functions of WIPI family as a PI(3,5)P2-binding effector. First, I analyzed the subcellular localization of WIPI family under various conditions that the amount of PI(3,5)P2 was changed. As a result, WIPI-1 and WIPI-2 displayed punctate structures when cells were exposed to hyperosmotic stresses. Under hyperosmotic stresses, WIPI-1 and WIPI-2 were co-localized with autophagosomes and p62, a substrate of selective autophagy, was transported to lysosomes for degradation. Taken together, I concluded that an autophagic pathway is induced in response to hyperosmotic stresses. Unexpectedly, WIPI-1 and WIPI-2 functioned as a PI(3)P, a precursor of PI(3,5)P2, effector, but not as a PI(3,5)P2 effector. Interestingly, this autophagy did not require the Ulk complex in contrast to starvation-induced autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 高浸透圧ストレス WIPI Ulk複合体

1. 研究開始当初の背景

Phosphoinositides は、イノシトールリン脂質のイノシトール環の3位、4位、5位が単独もしくは複数リン酸化された誘導体群である。どの誘導体も生体内には微量しか存在しないが、キナーゼとフォスファターゼによる代謝調節が生体内のシグナルとして重要な機能を担っている。有名な例の一つとしては、フォスファチジルイノシトール-3-リン酸(PI(3)P)の合成がオートファジー経路に必須なことが挙げられる(Mizushima *et al.*, 2011., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*)。PI(3,5)P₂ は最も新しく見つかった Phosphoinositides で、主に酵母において研究が進められてきた。酵母では、Fab1p キナーゼが合成するフォスファチジルイノシトール-3,5-二リン酸(PI(3,5)P₂)に Atg18p、Ent3p や Ent5p といった分子が結合し、液胞の出芽やエンドサイトーシス経路を制御していることが分かっている(図1)。

マウスやヒトなどの哺乳類では Fab1p のホモログに相当する PIKfyve キナーゼが PI(3,5)P₂ を合成する。PIKfyve の遺伝子ノックアウトマウスは胚発生の段階で死に至り、部位特異的ノックアウトでも下痢症状(小腸上皮細胞特異的)、動脈血栓症(血小板特異的)を引き起こしている(Takasuga *et al.*, 2013., *PNAS.*, Min *et al.*, 2014., *Nat. commun.*)。このとき顕著に肥大化したリソソームが細胞内に観察される。ヒトにおいても、PIKfyve への変異が斑状核膜ジストロフィーを引き起こし、また PI(3,5)P₂ のフォスファターゼである Sac3 への変異がシャルコー・マリー・トゥース病の原因となる(Li *et al.*, 2005., *AM. J. Hum. Genet.*, Chow *et al.*, 2007., *Nature*)。

2. 研究の目的

PI(3,5)P₂ はイノシトールリン脂質の一種で、哺乳類細胞では PIKfyve キナーゼがイノシトール環をリン酸化することによって合成される。近年、PI(3,5)P₂ の代謝異常がヒトの様々な疾患に関係することが明らかにされた。しかし、キナーゼなどが解析される一方で PI(3,5)P₂ に結合する因子の知見は乏しい。オートファジー関連分子 Atg18p の哺乳類ホモログである WIPI family (WIPI-1~4) は全て *in vitro* で PI(3,5)P₂ に結合することが分かっている(Baskaran *et al.*, 2012., *Mol. Cell*)。しかし、細胞または組織レベルで PI(3,5)P₂ の結合因子として機能しているかは未だに分かっていない。我々は WIPI family に注目し、培養細胞を用いて WIPI family が PI(3,5)P₂ の下流因子として機能するかを解析し、さらにマウスを用いて組織での WIPI family の発現や局在を明らかにすることでその生理的機能を解明する。

3. 研究の方法

本申請課題は、未だに PI(3,5)P₂ の結合因

子が明らかになっていない哺乳類において、WIPI family が PI(3,5)P₂ の結合因子として機能するかを明らかにすることが目的である。具体的には、培養細胞(1)とマウスの組織(2)とに大きく二つの実験系に分けて研究を進めた。以下、それぞれの項目について詳細に記述する。

(1) 培養細胞を用いた研究

培養細胞の系では二種類の細胞(マウス胎児線維芽細胞(MEF)とヒト膀胱癌由来細胞(T24))を用い、PI(3,5)P₂ シグナルが活性化する条件下で WIPI family の局在の変化を調べた。さらに、細胞内の微細構造を蛍光顕微鏡や電子顕微鏡により観察した。また、申請者が酵母において明らかにした Atg18p のリン酸化による脂質結合能の調節が Atg18 の哺乳類ホモログである WIPI family においても保存されているかを生化学的に解析した。

(2) 組織・個体を用いた研究

組織レベル解析では、まず WIPI family の抗体の探索・作製を試みた。培養細胞を用いて機能性のある抗体を絞り込み、絞り込んだ抗体でマウスの各組織を免疫染色法で解析した。次に、WIPI-1 の遺伝子欠損マウスを共同研究先より取得し、同様の免疫染色法で解析を行った。

4. 研究成果

研究の成果は方法で記述した(1)培養細胞レベルの研究と(2)組織・個体レベルの研究に分けて報告する。

(1) 培養細胞を用いた研究の成果

(1-1) WIPI family の細胞内局在を変化させる培養条件の探索と結果

申請者はまず GFP を N 末端側に融合させた WIPI-1~4 の発現プラスミドを作製し MEF 細胞にトランスフェクションした。通常の DMEM 培地では 1~4 の全て細胞質の局在パターンを示していた。飢餓条件ではオートファジー経路の誘導に伴い、WIPI-1、WIPI-2 ならびに WIPI-4 はオートファゴソーム形成の近傍(オメガソームと呼ばれる)に局在することが知られているが、申請者もこのことを再現した。次に、PI(3,5)P₂ シグナルが活性化する様々な条件下で WIPI family の局在変化を探索したところ、高浸透圧ストレス条件下で GFP-WIPI-1 と GFP-WIPI-2 が細胞内に顕著なドット様の局在を呈していた(図1)。この局在変化は GFP-WIPI-3 と GFP-WIPI-4 では観察されなかった。様々な細胞内小器官のマーカーと比較したところ、この WIPI-1 と 2 のドット構造はオメガソームと後期エンドソームであることが明らかになった。

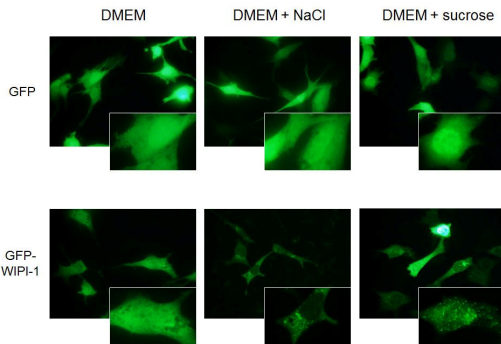


図1 高浸透圧ストレスによる GFP-WIPI-1 の局在変化。NaCl や sucrose の添加で細胞質にドット状の構造が確認される。

(1-2) 高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの解析

前項で高浸透圧ストレスが WIPI-1 と WIPI-2 の局在を変化させることを見出した。申請者はこの現象についてさらに詳細に解析を行った。その結果、オートファジーの分解基質である p62 ならびに ARA70 (NcoA4) がリソソームで分解されていたこと、ならびにオートファゴソームのマーカ分子である Atg16L などが WIPI-1,2 と共局在していたことが分かった。このことから、高浸透圧ストレス下では一種のオートファジー経路が誘導されていることが明らかになった。この現象は MEF 細胞だけでなく、ヒト膀胱癌由来 T24 細胞でも観察されたことから複数の細胞間で保存されている現象であることが分かった。電子顕微鏡で細胞内微細構造を観察したところ、高浸透圧刺激によりオートファゴソーム様の構造が形成されることが明らかになった。

(1-3) 高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの上流シグナルの解析

次に、高浸透圧ストレス下で誘導されるオートファジーの上流経路を探索した。まず、本課題の目的である PI(3,5)P₂ の関与を検討した。PI(3,5)P₂ 合成阻害薬の添加や PI(3,5)P₂ 合成酵素の疑似蛋白質の発現などから PI(3,5)P₂ は高浸透圧ストレス誘導性オートファジーには関与しないことが明らかになった。一方で PI(3,5)P₂ の前駆体である PI(3)P はこの経路に必要であった。従って、高浸透圧ストレス下では WIPI family は PI(3,5)P₂ ではなく PI(3)P のエフェクターとして機能していることが分かった。

オートファジーには Phosphoinositides 以外に別の上流シグナルとして mTOR-Ulk 経路が存在することが多くの研究から明らかになっている。そこで、申請者は mTOR-Ulk 経路の高浸透圧ストレス誘導性オートファジーへの関与を調べた。その結果、mTOR-Ulk 経路の Ulk 複合体が高浸透圧ストレス誘導性オートファジーには必須ではないことが明らかになった(図2: Ulk 複合体の構成分子である FIP200、Atg13 遺伝子欠失細胞でもオートファジー経路の誘導が見られた)。

Ulk は富栄養条件下で 757 番目のセリン残基が mTOR によってリン酸化され不活性化状態になっているが、細胞が飢餓に曝されると mTOR の不活性化によりリン酸化が 757 セリンから外れ活性化状態になる。この 757 セリンのリン酸化レベルを高浸透圧条件下で調べたところ、飢餓条件下とは異なりリン酸化状態を保ったままであった(図3)。興味深いことに、この高浸透圧ストレスによる 757 セリン残基のリン酸化は細胞が飢餓状態に曝されても変わらなかった。このことから、mTOR 以外のキナーゼが Ulk の上流として働いていることが示唆された。現在、このキナーゼを探索中である。

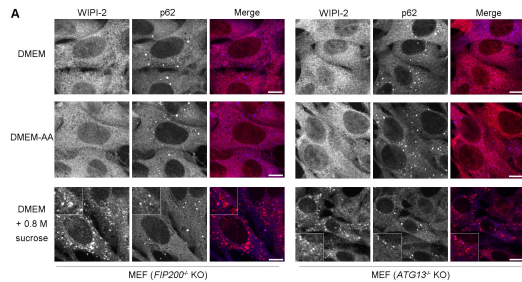


図2 FIP200 ならびに Atg13 遺伝子欠失細胞におけるオートファゴソームの形成能。飢餓条件(DMEM-AA)では見られないオートファゴソームが sucrose の添加では確認される。

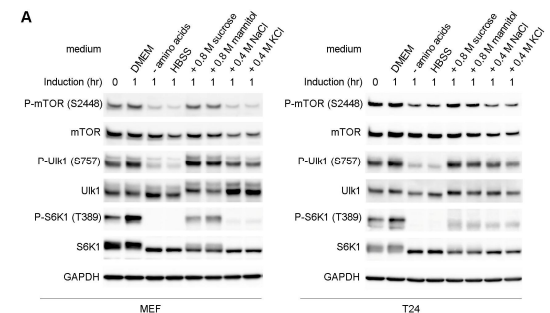


図3 Ulk1 757 セリン残基のリン酸化レベルの解析。飢餓条件である DMEM-AA や HBSS では Ulk1 セリン 757 は脱リン酸化されているが、高浸透圧条件下ではリン酸化状態を保持している。

(2) 組織・個体を用いた研究の成果

(2-1) 抗体の作製

組織解析に利用できる WIPI family の抗体が存在しない為、WIPI family 抗体の探索ならびに抗体の新規作製を試みた。取得した各抗体の評価は、標的遺伝子をノックダウンした培養細胞を用いて判断した。結果、市販の WIPI-1 抗体 1 種(Sigma-Aldrich W2394) ならびに自作の WIPI-1 抗体 1 種(NTW11)が培養細胞レベルで機能することが分かった(図4)。

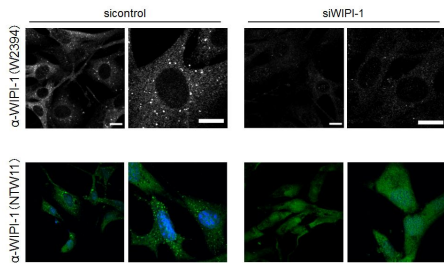


図4 培養細胞を用いた WIPI-1 抗体の評価。
各抗体ともに WIPI-1 のノックダウンでシグナルが消失しており機能性していることが分かる。

(2-2) 組織切片の染色

(2-1) で選抜した2種の抗体を用いて組織免疫染色を試みた。まず、野生型マウス (C57BL/6J) の各組織をパラフィンもしくは OCT compound に包埋し、ブロックをスライスして組織切片を作製した。先述の抗体で各切片を染色したところ、腎臓の一部、膀胱の移行上皮、食道の重層扁平上皮などが染色された。この染色は各抗体の抗原である合成ペプチドの添加で阻害されることが分かった。

次に、共同研究先である Institute of Biophysics Chinese Academy of Sciences に所属する Hong Zhang 博士より WIPI-1 の全身遺伝子欠損マウスの凍結組織切片を譲り受けた。この切片を先述の抗体2種を用いて免疫染色を行った。期待とは反して、野生型で染色が見られた腎臓などの各組織でシグナルの消失が認められなかった。つまり、野生型で検出されたシグナルは非特異的なものであると推測される。現在、野生型と遺伝子破壊型との間で染色性に違いのある部位を探索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

安納弘道、土橋 悠、田村直輝、植村武文、和栗 聡、患者腫瘍組織移植マウスで見られる骨格筋萎縮では LC3 陽性顆粒が増加する、体力科学、査読有、67 巻 1 号、2018、99-105

[学会発表](計5件)

日本細胞生物学会(2016 京都) 田村直輝、和栗 聡、オートファジー関連分子 WIPI-1、WIPI-2 の浸透圧ストレスへの関与

日本解剖学会 東北・北海道連合支部会(2016 帯広) 田村直輝、和栗 聡、オートファジー関連分子 WIPI-1、WIPI-2 の浸透圧ストレスへの関与

日本農芸化学学会(2017 京都) 田村直輝、和栗 聡、高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの形態および分子メカニズムの解析

日本細胞生物学会(2017 仙台) 田村直輝、和栗 聡、浸透圧ストレス誘導性オートファジーの分子機構の解明

日本解剖学会(2018 東京) 田村直輝、和栗 聡、高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの分子メカニズムの解析

[その他]

講座ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/achie.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 直輝 (TAMURA Naoki)

福島県立医科大学、医学部、助教

研究者番号：70745992

(2) 研究協力者

Hong Zhang