

令和元年5月17日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2018
 課題番号：17K15544
 研究課題名(和文) 脂質ドメイン形成とリポファジーの分子機構解明

研究課題名(英文) Membrane domain and lipophagy

研究代表者

辻 琢磨 (Tsuji, Takuma)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40725628

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)：我々は凍結切断レプリカ電顕法を駆使することにより、静止期に入った出芽酵母の液胞膜にステロールに富んだラフト様のドメインが形成され、脂肪滴がこの液胞膜ドメインに包まれながら液胞内に陥入り取り込まれることを明らかにした。また液胞膜へのステロール供給機構としてニーマンピック病C型タンパク質に注目し、出芽酵母オルソログであるNcr1/Npc2が液胞膜のラフト様ドメイン形成、ミクロオートファジー小胞の形成に必須の役割を担うことを見出した。さらに短時間の窒素飢餓時にもMVBの内部小胞をステロールの供給源としてNcr1/Npc2依存的にラフト様ドメインが形成され、脂肪滴が取り込まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類ニーマンピック病C型タンパク質はリソソーム内腔のコレステロールをリソソーム膜に供給し、その変異がリソソーム内のコレステロール異常蓄積、神経細胞の脱落に至ることが知られている。今回の結果より、ニーマンピック病C型タンパク質は細胞全体のステロール代謝に必須であるばかりでなく、液胞(リソソーム)膜のドメイン形成を介してリポファジーを制御する役割も担うことが明らかになった。また、マクロオートファジーよりも研究の遅れているミクロオートファジーについて新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In budding yeast in the stationary phase, the vacuole forms sterol-rich raft-like membrane domains and degrades lipid droplets (LDs) in its lumen (lipophagy). To reveal the relationship between the domain formation and lipophagy, we examined the membrane dynamics in the lipophagic process by using the quick-freezing and freeze-fracture replica electron microscopy. We found that LDs are engulfed by invagination of raft-like domains toward the vacuolar lumen. Sterol needs to be supplied to the vacuolar membrane for the raft-like domain formation. In yeast lacking Ncr1 and Npc2, sterol accumulated in the vacuolar lumen, formation of raft-like domains was significantly reduced, and lipophagy was suppressed. We also found that Ncr1 and Npc2 are essential for formation of the vacuolar membrane domains in acute nitrogen starvation, and that sterol is derived from the intraluminal vesicles of MVB.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ラフト 脂肪滴 オートファジー リポファジー ニーマンピック病C型 電子顕微鏡 凍結切断レプリカ法 免疫電顕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴に貯蔵された脂質の分解は、おもに細胞質中の酵素(リパーゼ)の働きによるものと解されてきたが、近年、オートファジーが脂肪滴の分解に関与すること(リポファジー)が明らかにされ、注目を集めている。ラット肝細胞や出芽酵母などにおいてリポファジーが報告されているが、それらが共通のメカニズムによって起こるのか、また他のオートファジーと同じ分子機構によるものかなど、不明な点が多く残されている。これまでに、静止期酵母の液胞膜(哺乳類細胞のリソソームに相当する)に形成されるステロールリッチなラフト様ドメインがリポファジーに必須であることが明らかにされている。しかしながらリポファジーの具体的なメカニズムはほとんど明らかになっておらず、ラフト様ドメインがどのように重要なのかも不明であった。

リポファジーがどのようなメカニズムで進行するのかを明らかにする上で、ラフト様ドメインを可視化することは必須条件である。これまでは、このドメインに集積するタンパク質(Ivy1、Gtr2)に蛍光タグを付与した融合タンパク質がマーカーとして利用されてきた。しかし、蛍光観察では標的分子以外の情報を得ることが出来ず、脂肪滴が液胞内にどのようなメカニズムで運び込まれるのかを解明することは難しい。加えて、蛍光タグの付加により標的分子本来の機能が損なわれることが懸念される。また、従来の超薄切片電子顕微鏡法では、本来「面」である膜を「線」としてしか観察することができず、立体再構築したとしても、膜の微細な起伏を正確に捉えることは困難を極める。我々はこの課題を克服するために急速凍結・凍結切断レプリカ(QF-FR)電顕法が有効であると考えた。本法では瞬時(ミリ秒オーダー)に細胞内すべての分子の動きを止めるため、生きたままの生体膜の形態、膜分子の分布を保持することができ、さらに免疫標識によりこれらを可視化することができる。我々は本法により静止期の出芽酵母を観察し、静止期の液胞は球ではなく、多くが六角形の面をもつ多面体であり、興味深いことに、膜内粒子(=膜貫通タンパク質)は六角形の面から排除され、六角形の辺に集積していることを確認した。非ラフト領域のマーカーであるVph1-mRFPをRFP抗体と金コロイドで標識すると、六角形の辺に特異的にシグナルが得られた。すなわち、液胞膜のステロールリッチなラフト様ドメインは、膜内粒子が疎な領域として観察されることが分かった。

ではこのマイクロドメインはどのように形成されるのだろうか?液胞膜は本来ステロールに乏しい膜である。ラフト様ドメインを形成するためのステロールはどこからやってきて、どのように液胞膜に付加されるのか?液胞膜にステロールを供給するタンパク質として、我々はリソソーム内にコレステロールが異常蓄積する神経変性疾患、ニーマンピック病C型(NPC)タンパク質に着目した。NPCタンパク質は哺乳類リソソーム内腔のコレステロールをリソソーム膜に差し込む。我々はすでに蛍光観察によりNPCタンパク質の出芽酵母オルソログNcr1、Npc2がリポファジーに関与することを示唆する所見を得ている。しかしながらリポファジーにおけるNcr1、Npc2の具体的な役割はわかっていない。本研究では、【1】ラフト様ドメインの形成機構を明らかにするとともに、【2】リポファジーの分子機構を解明し、さらに【3】ラフト様ドメインとNPCの関係を追究する。

2. 研究の目的

【1】ラフト様ドメインの形成機構:ラフト様ドメインを形成するためのステロールはどこからやってきて、どのように液胞膜に供給されるのかを明らかにする。ドメイン形態の分類、リン脂質局在解析、ステロール供給源の探索、またNcr1/Npc2の機能解析などを通してラフト様ドメインの形成機構を理解する。まずはNcr1、Npc2に注目して解析を行う。また、ステロール供給源として脂肪滴とMVBの内部小胞について検討する。

【2】リポファジーの分子機構:ラフト様ドメインを介して進行するリポファジーについて、これまでに報告されている幾つかのリポファジー不能株で一体何が起きているのかをQF-FR法を用いて解析し、リポファジー分子機構を解明する。

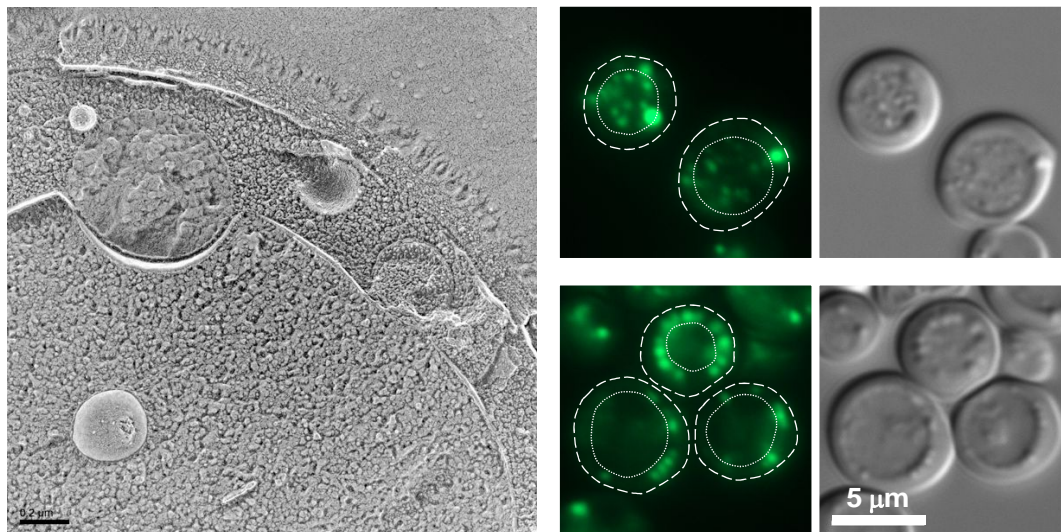
【3】哺乳類ラフト様ドメインとニーマンピック病C型との関係:哺乳類のNPCタンパク質が局在するリソソーム膜にラフト様ドメインがあるのかどうか、もし存在するならば、どのような役割を持つのかを明らかにする。さらに、ニーマンピック病C型との関係について追求する。

3. 研究の方法

実験材料としては出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いた。加圧凍結装置で急速凍結した細胞を極低温下、高真空中で切断し、切断面に白金・炭素を蒸着し凍結切断レプリカを作製した。また膜分子の局在を解析するために、レプリカをZymolyase、SDSで処理し、余分な細胞細分を除去した。これらのレプリカをリコンビナントタンパク質や抗体、金コロイド付き二次抗体で標識し、透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

まず我々はQF-FR電顕法を用いて、野生型酵母リポファジーの過程を調べた。その結果、液胞膜にラフト様ドメインが形成され、このドメインに脂肪滴が密着し、脂肪滴を包み込むようにラフト様ドメインが液胞内腔にむかって拡張し、非ラフト様ドメインは巾着を閉じるように動き、最終的に液胞膜から解離することがわかった。つまり、脂肪滴はラフト様ドメインを介したマイクロオートファジーの様式で液胞内に取り込まれることが明らかになった(図1)。



(左) 図1：静止期出芽酵母のQF-FR像。脂肪滴と接する液胞膜が液胞内腔に向かって落ち込んでいる。

(右) 図2：静止期出芽酵母のリポファジー。Bodipy (緑) により脂肪滴を染色している。上：野生型出芽酵母。液胞内 (内側の丸線) に多数の脂肪滴がみられる。下：ncr1 npc2 細胞。液胞内にはほとんど脂肪滴はない。

次に我々は、液胞膜へのステロール供給機構としてニーマンピック病C型 (NPC) タンパク質に注目し、NPC1/NPC2 の出芽酵母オルソログである Ncr1/Npc2 の欠損株を解析した。図2に示すように ncr1 npc2 細胞では静止期でも液胞内に脂肪滴はほとんど取り込まれておらず、リポファジーが抑制されていた。また、Filipin 染色により液胞内にステロールが蓄積していることがわかった。この細胞の液胞膜ドメイン形成率をQF-FR電顕法を用いて計測したところ、野生型と比べて有意に形成率が低下していた。また我々は PtdIns3P が液胞内のマイクロオートファジー小胞のマーカートとなることを見出し、NPC1/NPC2 欠損株のマイクロオートファジー小胞は野生型と比べて有意に小さいということを示した (図3)。同様の異常は NPC 患者の変異を元にした Npc2 発現細胞でも見られた。これらの結果から、Ncr1/Npc2 が液胞膜のラフト様ドメイン形成、マイクロオートファジー小胞の形成に必須の役割を担うことが明らかになった。

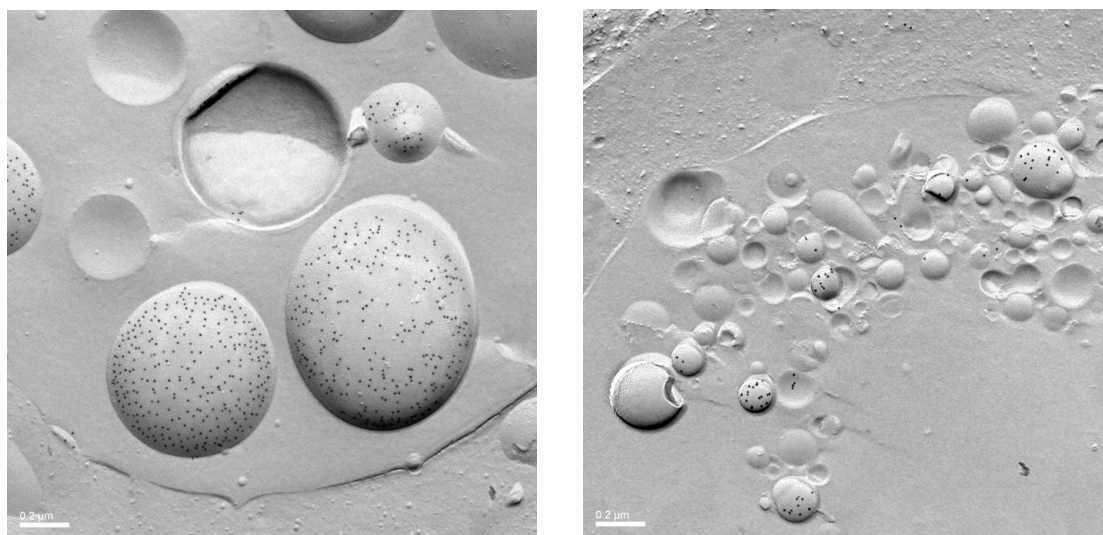


図3：静止期出芽酵母の液胞内のQF-FR像。黒点は PtdIns3P を標識している金コロイド。ncr1 npc2 細胞 (右) では野生型 (左) に比べてマイクロオートファジー小胞 (PtdIns3P 陽性の小胞) が小さい。

ATG 遺伝子群の欠損細胞ではリポファジーが抑制されることが報告されていたが、その理由は不明であった。我々はこれらの欠損株で Ncr1/Npc2 が液胞に局在せず細胞質中に凝集していることを見出した。

さらに短時間の窒素飢餓時にも Ncr1/Npc2 依存的にラフト様ドメインが形成され、そのドメインを介してリポファジーが起こること、この際に必要なステロールが MVB の内部小胞に由来することを明らかにした。今回の結果より、NPC タンパク質は細胞全体のステロール代謝に必須であるばかりでなく、液胞 (リソソーム) 膜のドメイン形成を介してリポファジーを制御する役割も担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Tsuji T, Takatori S, Fujimoto T. Definition of phosphoinositide distribution in the nanoscale. *Current Opinion in Cell Biology* 57 33-39 2018 査読有
10.1016/j.ceb.2018.10.008
- (2) Tsuji T, Fujimoto T. Lipids and lipid domains of the yeast vacuole. *Biochemical Society Transactions* 46(5) 1047-1054 2018 査読有
10.1042/BST20180120
- (3) Sobol M, Krausová A, Yildirim S, Kalasová I, Fáberová V, Vrkoslav V, Philimonenko V, Marášek P, Pastorek L, Čapek M, Lubovská Z, Uličná L, Tsuji T, Lísa M, Cvačka J, Fujimoto T, Hozak P. Nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate islets contribute to efficient RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Science* 131(8) 2018 年 査読有
10.1242/jcs.211094
- (4) Aktar S, Takatori S, Tsuji T, Orii M, Ohsaki Y, Cheng J, Fujimoto T. A New Electron Microscopic Method to Observe the Distribution of Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Acta Histochemica et Cytochemica* 50(5) 141-147 2017 年 査読有
10.1267/ahc.17025
- (5) Tsuji T, Fujimoto T. Freeze-fracture-etching Electron Microscopy for Facile Analysis of Yeast Ultrastructure. *Bio-protocol* 7(18) e2556 2017 年 査読有
10.21769/BioProtoc.2556
- (6) Tsuji T, Fujimoto M, Tatematsu T, Cheng J, Orii M, Takatori S, Fujimoto T. Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole. *eLife* 6 2017 年 査読有
10.7554/eLife.25960

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 辻琢磨、藤本豊士. ス克蘭ブラーゼによる細胞内ホスファチジルセリン分布の変化. 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 2019年3月 招待講演
- (2) 辻琢磨、藤本豊士. 電子顕微鏡によるホスファチジルセリンの細胞内分布解析. 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月 招待講演
- (3) Tsuji T, Sumi E, Ebata A, Kamikawa H, Tatematsu T, Cheng J, Taguchi T, Fujimoto T. Subcellular distribution of phosphatidylserine revealed by freeze-fracture replica labeling electron microscopy. 59th International Conference on the Bioscience of Lipids 2018年9月
- (4) 辻琢磨、藤本豊士. 電子顕微鏡による膜脂質分子の可視化. 第60回日本脂質生化学会 2018年5月 招待講演
- (5) 辻琢磨、藤本豊士. 電顕による膜脂質ドメインの解析. 第123回日本解剖学会全国学術集会 2018年3月 招待講演
- (6) 辻琢磨、藤本萌、立松律弥子、程晶磊、藤本豊士. 膜マイクロドメインとリポファジー. 第69回日本細胞生物学会 2017年6月 招待講演

〔図書〕(計2件)

- (1) 辻琢磨、藤本豊士. 羊土社. リポクオリティの分析,可視化技術とその応用 2.膜リン脂質クオリティの可視化. *実験医学* 36(10) 1781-1786 2018年6月
- (2) Tsuji T, Fujita A, Fujimoto T. Immunoelectron Microscopy of Gangliosides. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1804 231-239 2018年

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科・分子細胞学ホームページ

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index-j.html>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者
なし

- (2) 研究協力者

藤本 豊士(FUJIMOTO TOYOSHI) 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号:50115929

程 晶磊(CHENG JINGLEI) 名古屋大学・大学院医学系研究科・技術補佐員
立松 律弥子(TATEMATSU TSUYAKO) 名古屋大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。