

令和元年5月24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：17K15545

研究課題名(和文)オートファジー膜形成におけるリン脂質供給機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of phospholipid supply on autophagosomal membrane formation

研究代表者

小笠原 裕太 (Ogasawara, Yuta)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：00773524

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)：真核生物が持つ主要な分解系オートファジーは細胞内の恒常性維持において重要である。その機構を理解するためには膜脂質供給機構の解明が必要であるが現在に至るまで未知である。本研究ではマウス繊維芽細胞を用いた解析で、ホスファチジルコリン(PC)合成に関与するCCT₃が、1)長時間飢餓条件下で脂肪滴へとリクルートされる、2) CCT₃陽性脂肪滴近傍からオートファゴソームが形成される、3) CCT₃の発現量抑制により長時間飢餓時のオートファジー活性が減少する、などの現象を見出した。これら結果は、長時間飢餓条件下においてPCの供給がオートファジー活性の維持において需要であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた、「長時間にわたって継続するオートファジーを維持する機構」はこれまでの研究では見過ごされてきた現象である。これまでは短時間と長時間の飢餓で同じ機構を介してオートファゴソームが形成されていると考えられてきたが、本研究により飢餓の長さによってその制御機構が異なることが明らかとなった。癌細胞の増殖において長期的なオートファジー活性の維持が重要なことは既に報告されている。そのため、CCT₃の活性を阻害することによって長時間飢餓条件のオートファジーを抑制できることが明らかになれば、新たな抗癌剤開発への応用が可能になると考えられ、医学的な観点からも重要な知見の獲得が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a major catabolic process to degrade cellular components in the lysosome. The source of phospholipids forming the autophagosomal membrane is not yet clear. We found that newly synthesized phosphatidylcholine is incorporated to the autophagic membrane preferentially, and that CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta3 (CCTbeta3), a minor isoform of the rate-limiting enzyme of the Kennedy pathway, plays an essential role. Under prolonged starvation condition, CCTbeta3 distributed to lipid droplets generated from autophagic degradation products. The autophagic membrane emanated from the vicinity of those lipid droplets. We also found that autophagy in prolonged starvation was compromised by knockdown of CCTbeta3. The result demonstrates that phosphatidylcholine synthesis enhanced by activation of CCTbeta3 plays a critical role in sustaining autophagy for a long term.

研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー lipid droplet phosphatidylcholine

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物が持つ主要な分解系である。細胞は外環境から栄養を獲得できなくなると、オートファジーを誘導し自身の一部を分解することで自ら栄養素を産生する。これにより細胞は飢餓条件下でも生育することが可能になる。近年の研究によってオートファジーが飢餓応答だけでなく、損傷を受けたオルガネラの分解、細胞死、癌抑制、免疫に関与することが明らかとなっている。哺乳類細胞のオートファジーでは、隔離膜と呼ばれる扁平な二重膜構造体が出現し、隔離膜が伸長することで細胞質の一部やオルガネラを隔離する二重膜小胞(オートファゴソーム)が形成される。その後オートファゴソームがリソソームと融合して加水分解酵素が供給され内容物が分解される。1993年東京大学の隅らの研究によって出芽酵母のオートファジー欠損株が単離されて以来(Tsukada et al, FEBS Lett 333: 169-174, 1993)、哺乳類を含めた真核生物において多数のオートファジー関連タンパク質(Atg)が同定された。哺乳類細胞におけるオートファジーはAtgの階層的なリクルートによって制御されていることが報告されており、オートファジーに関わるタンパク質個々の機能や相互作用機構の解明は大きく進んだ(Itakura et al, Autophagy 6:764-776, 2010)。一方でオートファゴソームや隔離膜の大半を占める脂質がどこからどのように供給されるのかについては未だほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

真核生物が持つ主要な分解系であるオートファジーは細胞内の恒常性維持において重要な役割を果たしている。オートファジーによる分解を実行する二重膜小胞であるオートファゴソームの形成機構は未解明な部分が多く、特に膜脂質の供給が如何にして行われているかは大部分が未知である。哺乳類の場合、生体膜の主要な脂質であるホスファチジルコリン(PC)はKennedy経路によって合成されている。研究代表者はKennedy経路の律速酵素であるCTP:phosphocholine cytidylyltransferase(CCT)のアイソザイムCCTβ3がオートファゴソーム形成に関与することを見出し、新たなオートファゴソーム形成因子であることを示唆する結果を得た。本研究ではCCTβ3の機能的意義をさらに詳細に解明し、オートファゴソームへの膜脂質供給機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)[新規合成PCの可視化] 細胞内の新規合成PCの分布を知るためにコリンにアルキン基を付加した propargylcholine で細胞を代謝ラベルし、Cy3-Azide 添加後 Azide-alkyne 環化付加反応(クリック反応)を用いて新規合成されたPCの可視化を行った。またオートファゴソーム膜へ他のオルガネラに比べ有意に新規合成PCが取り込まれているか否か、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(SDS-FRL)によってナノレベルの分布解析を行った。

(2)[AtgとCCTβ3の局在化解析] 長時間飢餓条件下におけるCCTβ3と各種Atgの挙動、およびAtgがリクルートされる構造とCCTβ3陽性構造体の位置関係をLive imagingと抗体染色によって解析した。

(3)[CCTβ3ノックダウン細胞を用いた解析] CCTβ3ノックダウンにより長時間飢餓時のオートファジー活性が抑制されるか解析した。

4. 研究成果

(1) オートファジー誘導条件である飢餓条件下で新規合成されたPCがオートファゴソームマーカーGFP-LC3と共局在することが分かった。また短期よりも長期的な飢餓条件の方がより多くの新規合成PCがオートファゴソームへ取り込まれていることが明らかとなった(図1)。

(2) 実際にオートファゴソーム膜へと新規合成PCが取り込まれている点については急速凍結切断レプリカ法を用いてERの延長上にある核外膜や、細胞膜に比べより多くの新規合成PCがオートファゴソームに分布することを示した(図2)。

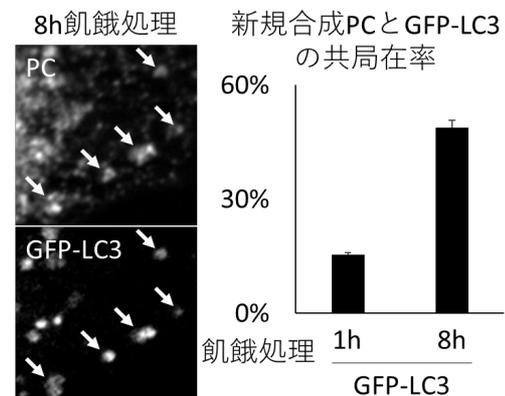


図1. 飢餓に伴ったオートファゴソームへのPC供給

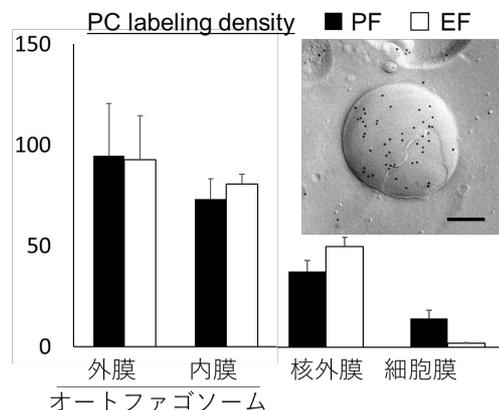


図2. 新規合成PCのオートファゴソームへの分布

(3) PCの取り込みが増大する長時間飢餓条件下におけるCCTβ3の局在を解析したところ、脂肪滴(LD)マーカー-BODIPYと共局在した(図3)。

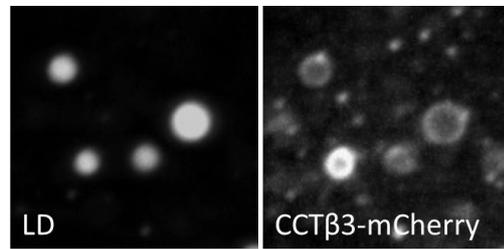


図3.CCTβ3のLDへのリクルート

(4) CCTβ3がリクルートされた構造とオートファジーの関係を明らかにするためにLive imaging解析を用いてCCTβ3およびオートファゴソームマーカー-GFP-LC3の局在を解析した。その結果CCTβ3陽性構造体上でオートファゴソームが伸長する様子が明らかとなった(図4A)。またCCTβ3の発現量をsiRNAにより抑制することで長時間飢餓時のオートファジー活性が抑制されることもわかった(図4B)。これら結果は長時間飢餓条件下においてCCTβ3がオートファジー活性の維持において重要であることを示している。

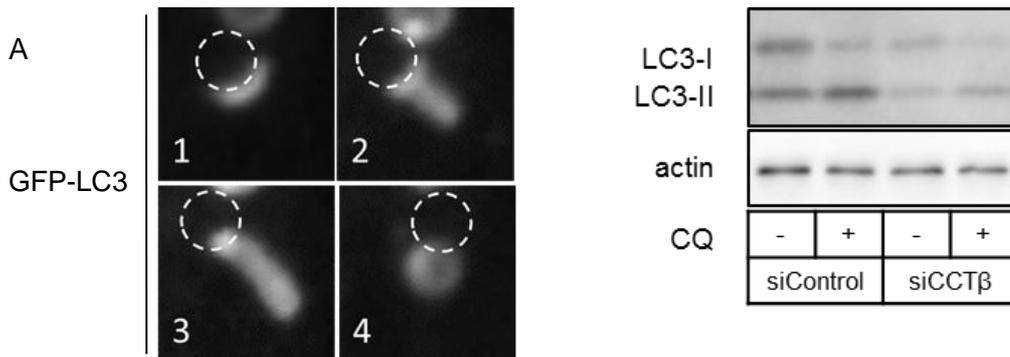


図4. CCTβ3陽性構造体(点線)から伸長する隔離膜(A)。CCTβ3欠損によるオートファジー活性の減少(B)

(5) 長時間の飢餓条件下ではオートファジー活性依存的に遊離脂肪酸が生成され(FFA)、この時FFAがDGAT1の活性を介してLD合成に利用されることは既にいくつかのグループから報告されている(Rambold et al. Dev Cell. 2015 ; Nguyen et al. Dev Cell. 2017)。長時間飢餓時にCCTβ3がLDへとリクルートされる時にDGAT1の活性が重要だと考えられたため、DGAT1阻害実験を実施した。その結果、DGAT1阻害剤処理によりオートファゴソームとオートファジーの初期構造オメガソームのマーカーであるGFP-LC3とGFP-DFCP1の面積が有意に減少した。またオートファジー活性についても同様にDGAT1阻害剤処理により抑制されることが分かった(図5A, B)。以上の事から長時間の飢餓条件下ではオートファジー活性依存的に形成されるLDへとCCTβ3がリクルートされることでオートファゴソームへの新規合成PCが供給され、オートファジー活性を維持できるという新たな機構が示唆された(図5C)。

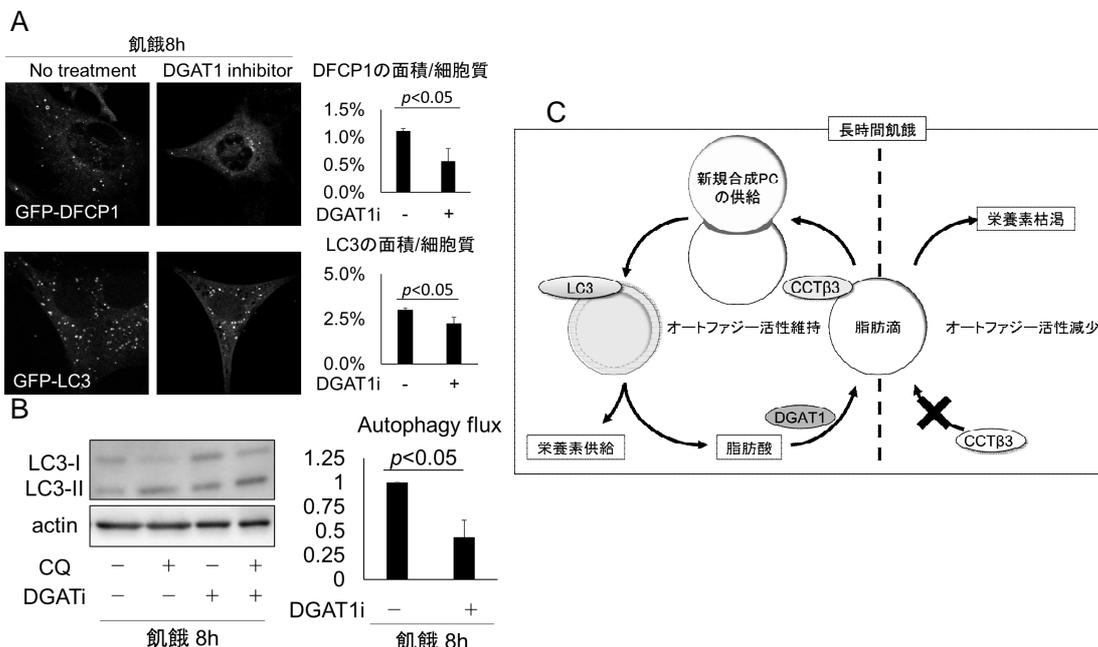


図5. DGAT1阻害剤による長時間飢餓時のオートファジー阻害

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

口頭発表

Ogasawara Y, Fujimoto T. 長時間飢餓時のオートファジーにおける膜脂質供給機構. 第11回オートファジー研究会, 掛川, 2018

Ogasawara Y, Sugimoto T, Uchida M, Murase O, Fujimoto T. オートファジーにおけるホスファチジルコリン (PC) 供給機構の解析. 第123回日本解剖学会総会全国学術集会, 東京, 招待講演, 2018

Ogasawara Y, Fujimoto T. オートファジーにおける膜脂質供給機構の解析. 新学術領域研究「脂質クオリティが解き明かす生命現象」第一回若手研究発表会, 横浜, 2017

Ogasawara Y, Sugimoto T, Uchida M, Fujimoto T. オートファゴソームへの膜脂質供給機構の解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 招待講演, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：