

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05950

研究課題名（和文）エンドソームーリソソーム間のマイクロオートファジーを支える分子機構

研究課題名（英文）Endolysosomal dynamics involving microautophagy

研究代表者

和田 洋（Wada, Yoh）

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50212329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは特定の組織でエンドサイトーシスがマイクロオートファジーによって構成されることを見いだした。その生理的な意義を遺伝子欠失マウスを用い解析した。エンドソーム形成に関わるCORVETを欠損する初期胚は、細胞基質のエネルギー状態に応じた代謝の再編成を制御するmTORシグナル経路が途切れている。エンドソーム膜のエネルギー状態はH⁺ポンプ V-ATPaseによって支配される。V-ATPase欠損胚は細胞極性が喪失し、エンドソーム機能が細胞極性の獲得と維持に関わることを明らかにした。新生仔マウス小腸ではマイクロオートファジーを伴うエンドサイトーシスが栄養吸収に重要な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

マウス初期胚のエンドサイトーシス経路の最終到達点が大なる「液胞」であることを見いだした。「液胞」は従来、植物や菌類特有のオルガネラとされる。しかし、動物細胞でも「液胞」とよべる巨大なオルガネラが、マイクロオートファジーにより形成される。本研究では、このユニークなプロセスを駆動する分子装置の機能を失ったマウスを解析し、生理的な意義を明らかにした。初期発生における組織パターンニングを支配するシグナル経路がマイクロオートファジーによって制御されていること、また乳飲期の栄養吸収がマイクロオートファジーに依存することなどの発見は周産期直前・直後の発達生理の理解にあらたな知見をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：Endocytosis drives material and informational exchanges between exterior and interior of the cells. In highly differentiated mammalian cells like enterocytes or embryonic epithelial cells, the microautophagy is involved in this endocytic pathway. We have shown that mouse mutant lacking a CORVET complex is failed to transmit the mTORC1 signalling pathway, which is the master regulator for metabolic/catabolic switching. The proton pump V-ATPase determines the energy state of the endosome. Loss of the V-ATPase function resulted in compromising the apicobasal polarity in the embryonic epithelium. We asked whether the microautophagy is restricted to embryonic stages to find that the enterocytes of new born pups are highly active in this process. Genetic perturbation of the process causes a delay in thrive, demonstrating the significance of the microautophagy in post-natal development.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ エンドソーム リソソーム シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞は多彩な膜オルガネラを発達させ、生命機能の維持に必要な物理化学反応の区画化 (コンパートメンテーション) を行っている。オルガネラは相互に膜と内容を交換し合う、ダイナミックなシステムを形成している。液胞・リソソームを終着点とするエンドサイトーシス経路は栄養の供給、細胞間情報伝達の制御の場として機能する。「液胞」は従来植物や真菌に特徴的なオルガネラと認識されてきた。

私たちはマウス初期胚のエンドサイトーシス経路の最終到達点が、**apical vacuole** = 頂端液胞とよばれる大きな「液胞」であることを見いだした。「液胞」は従来、植物や菌類を特徴づけるオルガネラと考えられている。しかし、動物細胞でも「液胞」とよぶにふさわしい巨大なオルガネラが形成されることを示した。大きな「液胞」の形成には、マイクロオートファジーとして知られる、ユニークな膜ダイナミクスが関わっている。通常のオルガネラ間の輸送においては、異なるコンパートメントの膜同士が接触し、その後、融合して単一の連続的な膜が形成され、コンパートメント内腔が同一空間となる (図1: エンドソーム・リソソーム融合)。マクロオートファジーの場合にも、オートファゴソーム外膜とリソソーム膜の膜融合が起きている。しかしマイクロオートファジーの場合、エンドソームがリソソームに「食べられる」ことによってリソソームの内腔に送られ、その後、膜の消化が起きて内容物の混合が起きる (図1: ミクロオートファジー)。膜融合によるオルガネラ相互作用とマイクロオートファジーによるそれとは膜のダイナミクスの位相がまったく異なる。したがってそれぞれ独自のメカニズムがはたらくと予想される。

しかしながら、動物におけるマイクロオートファジーの分子機構はまったくわかっていない。

私たちは、エンドソーム・リソソーム形成に必要な膜繫留因子 **mVam2** や **Rab7** 低分子量 GTP 結合タンパク質がマイクロオートファジーに必須であることを示している。しかし、これらの分子はマイクロオートファジーのみならず、通常の膜融合を担う因子でもあることから、エンドサイトーシス経路の終着点が、「液胞」という大きなコンパートメントを構成するか、あるいはリソソームのようなコンパクトな形態をとるのか、を決定している分子機構は現在のところ明らかではない。また、マイクロオートファジーが果たす生理的な役割についても、これまでに得られた知見は十分ではない。



2. 研究の目的

本研究では、大きな「液胞」を構築する膜ダイナミクスとしてのマイクロオートファジーがいかなる生理的な役割を果たすのか、を明らかにすることを目標とした。エンドソーム/リソソーム間の膜ダイナミクスにおいて、膜融合とマイクロオートファジーの使い分けの論理を解明し、高等動物における多細胞体制の獲得における役割=発生学の観点=、および物質吸収における役割=恒常性維持の生理機能=の両面から明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

私たちは胎生 6.5 日目マウス初期胚の単層上皮組織、臓側内胚葉(visceral endoderm: VE)でマイクロオートファジーが起きることを見いだしている。マウス胚を実験材料として、エンドソームと液胞の動態を観察した。エンドソーム・リソソームの相互作用には、SNARE 分子 **syntaxin-7**, **syntaxin-8**, **Vti1b**、膜繫留因子 **HOPS** 複合体、 H^+ ポンプ **V-ATPase** などが関わる。これらの機能分子のうち **V-ATPase**, **HOPS** 複合体, **CORVET** 複合体を喪失した遺伝子改変マウスを用いて、それぞれの機能がどのようにマイクロオートファジーと関わるのかを観察した。また、活発

にエンドサイトーシスをしている組織のエンドサイトーシスを観察して、マイクロオートファジーが初期胚 VE のみで起きているのか、あるいは、より普遍的な膜ダイナミクスであるのか、を検討した。

4. 研究成果

(1) CORVET 複合体の初期胚における機能

初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟に関わる CORVET 複合体のサブユニット mVam8 の欠損胚は受精後 5 日目 (E5)、卵筒胚を形成した時点で発生が停止する (図 2A, B)。この変異マウスの VE では大きな液胞が形成されず、断片化した小胞が多数蓄積する。mVam2 や Rab7 変異の場合とは異なり、これらの小胞には電子密度のやや高い物質がたまっており、mVam2 が機能する HOPS 複合体の作用点とは異なる段階で液胞形成に欠損をもつと考えられる (図 2C)。E5.5 の変異マウス胚は、組織形態からは胚体外外胚葉 (ExE) の発達がきわめて悪く、あたかもエピブラストと VE のみで構築されたような卵筒胚となる (図 2)。胚葉特異的な遺伝子マーカーで観察したところ、変異胚では ExE を規定する転写因子 Cdx2 や Eomes の発現が特異的に欠失する。一方、VE のマーカー Gata6 やエピブラストマーカー Oct3/4, Nanog の発現パターンは正常に保たれている。

このマウス初期胚の表現型は Fgf シグナルに異常を示すことを示唆する。しかしながら、Fgf 経路、Tgf- β 経路、Bmp 経路などには顕著な異常は見いだせなかった。しかし、この表現型は mTORC1 の欠損で引き起こされる表現型とよく似ていることに気づき、解析を進めたところ、mVam8 欠失胚では mTORC1 が自身の基質 (S6K, 4E-BP1) にシグナルを伝えていないことが示された mTOR シグナルが顕著に低下していることがわかった。

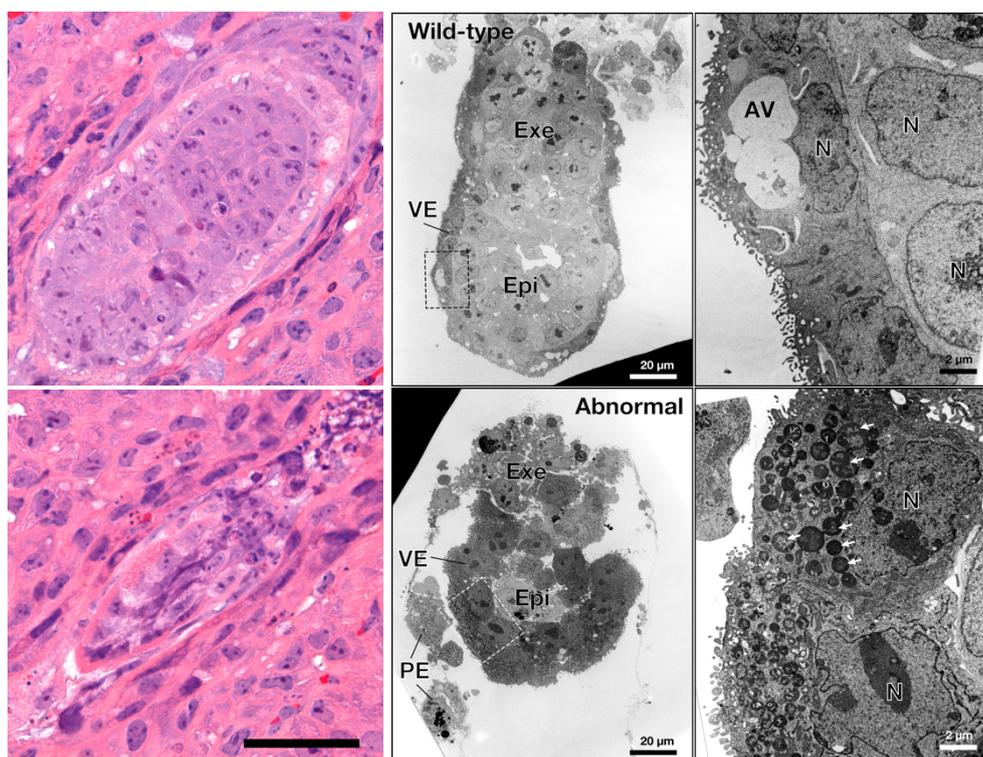


図 2 CORVET 複合体 mVam8 欠損胚の表現型

E5.5 胚の子宮内での形態を組織切片 H&E 染色で示した。また、同時期の胚を電子顕微鏡で観察した結果を示す。

(2) オルガネラ酸性化と巨大液胞形成

mTOR は細胞内のメタボリック・カタボリック経路の切り替えにおけるマスタースイッチとして機能する。細胞基質のエネルギー状態に応じて、オートファジーを介しての物質・代謝の再編成や、あるいは内腔酸性化状態の調節などが行われている。エンドソーム膜のエネルギー状態が初期胚でどのように機能しているかを解析した結果、エンドソームへ H⁺ を運ぶ H⁺ポンプ、V-ATPase を欠失したマウス初期胚では、組織の上皮構造が崩壊することをあきらかにし

た。単層上皮の形成においては細胞は apical 面と basolateral 面といった異なる細胞表層を確立することが必須である。apical 面と basolateral 面では、細胞膜の構成タンパク質やリン脂質が異なることが古くより知られている。V-ATPase を欠失したマウス初期胚の VE は単層上皮の構造が異常となり、basolateral 面に局在すべき E-Cadherin が細胞全体に分布するようになる(図 3a-d, e-h)。また、apical 面のマーカーである ezrin や atypical protein kinase C (aPKC) が本来は basolateral であるべき細胞表層の近傍にも局在するようになる(図 3i-l, m-p)。細胞膜成分の生合

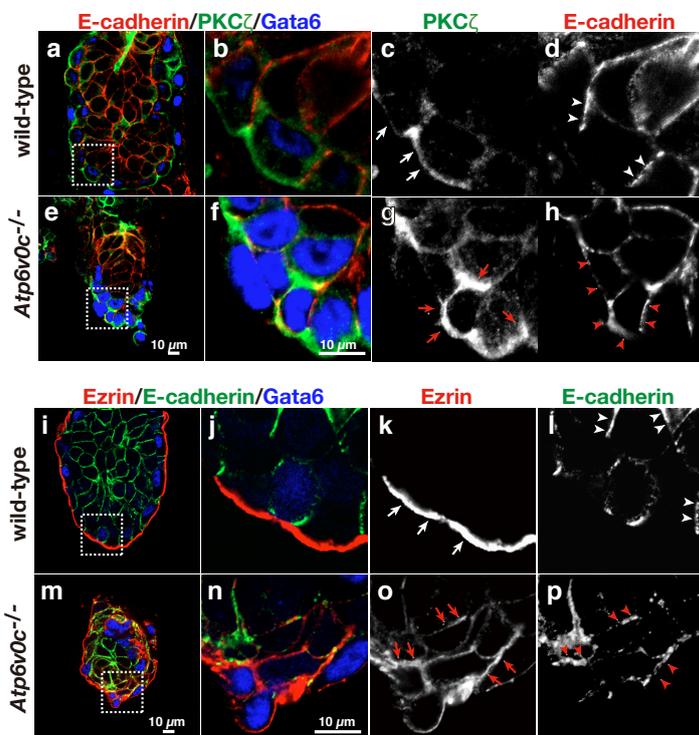


図 3 V-ATPase 欠失胚における細胞極性の喪失
E5.5 のマウス胚を basolateral のマーカーである E-cadherin, apical のマーカーである PKC ζ , ezrin の局在を蛍光抗体法により観察した。VE 特異的な転写因子 Gata6 より、異常となる上皮組織が VE であること、すなわち VE への分化は正常に起きていることを確認している。

成からあるべき場所への局在には小胞輸送が大きな役割を果たしている。この過程に積極的にはたらくことにより、酸性化が細胞極性の獲得と維持に機能するものと考えられる。

(3) 小腸上皮細胞でのマイクロオートファジー

VE 細胞はきわめて活発にエンドサイトーシスをおこなっており、細胞表層から細胞内へ大量に膜が運ばれる。このとき、エンドソームとリソソームの間の輸送が膜融合で起きるとすれば、形質膜由来の膜成分がどんどんリソソームに運ばれ、結果的にリソソーム自体が肥大化することになると考えられる。一方、マイクロオートファジーでは、形質膜から運ばれた膜がリソソーム内で分解されるため、膜の蓄積を解消することができる。すなわちマイクロオートファジーによる膜輸送は、活発にエンドサイトーシスをしている細胞において膜成分の局在バランスを調整する機構として考えられる。そこで VE と同じように活発なエンドサイトーシスをしている細胞では、マイクロオートファジーが起きているのではないかと予想した。新生仔の小腸吸収上皮細胞では活発なエンドサイトーシスが起きており、母体から与えられたミルクの栄養を摂取するのに重要なはたらきをしている。乳飲期のマウス小腸では、VE と同様に大きな液胞が発達しており、形態学的にマイクロオートファジーによってミルク構成成分が分解コンパートメントに送られている証左を得た。Rab7 は VE で大きな液胞が構築されるのに必須なタンパク質である。小腸特異的に Rab7 機能を喪失する Tg:Villin-Cre Rab7^{fllox/fllox} マウスを作出し、乳飲期で小腸上皮を観察したところ、予想とは異なり、超巨大化した液胞が出現した。詳細に観察すると上皮細胞が増殖分化する Villi の基部に位置する細胞では、Rab7 の欠失に伴い、小胞の蓄積が見られる。液胞は、出産前には小さな小胞として存在し、出産後、急激に大きな液胞へと変化する。Rab7 を欠失した小腸上皮細胞では出産前には、リソソーム様オルガネラはむしろ断片化していた。これらの結果は、Rab7 の機能喪失は小腸でも VE でも、大きな液胞を構築するのに必須であることを意味している。

小腸で Rab7 を欠いたマウスは正常に胎児として発生し、出産後、離乳期以降まで生育できる。しかしながら変異マウスは、わずかではあるが有意に低体重であり、胎仔の生育において

マイクロオートファジーを伴うエンドサイトーシスが重要な役割を果たしていることがわかった(図4)。

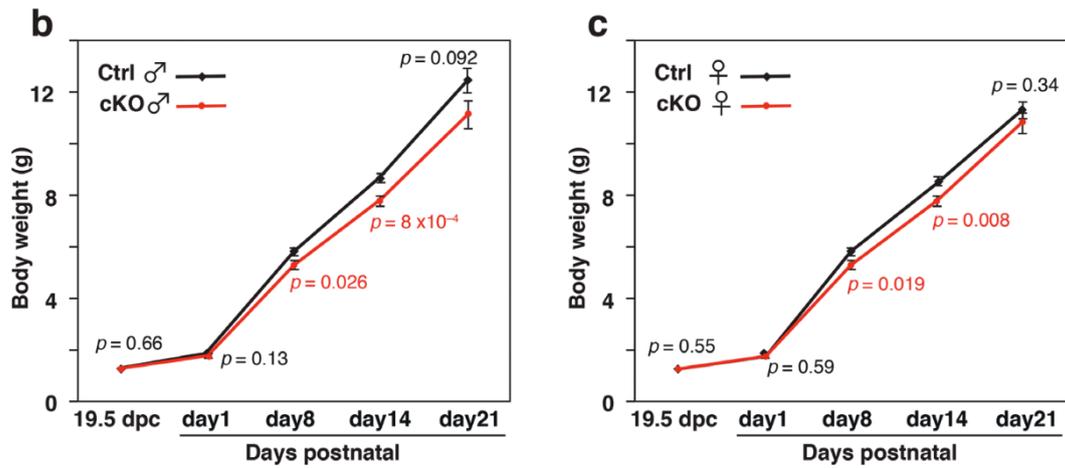


図4 Rab7欠失による胎仔の成長遅延

Rab7^{fl/fl}のマウス胎仔および新生仔の体重を計測した。Ctrl: Vil-Creをもたない個体 (Ctrl)、Vil-Cre トランスジーンをもち腸上皮細胞で Rab7 機能を喪失した個体(cKO; conditional KO)において、出生直前(19.5 dpc)に両者の体重は同等であった。しかし 3 週間の乳飲期で cKO 個体が有意に低体重となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh	4. 巻 12
2. 論文標題 The a subunit isoforms of vacuolar-type proton ATPase exhibit differential distribution in mouse perigastrulation embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-18002-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh	4. 巻 45
2. 論文標題 Exploring the Link between Vacuolar-Type Proton ATPase and Epithelial Cell Polarity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 12
2. 論文標題 The lysosomal V-ATPase a3 subunit is involved in localization of Mon1-Ccz1, the GEF for Rab7, to secretory lysosomes in osteoclasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12397-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sun-Wada Ge-Hong, Tabata Hiroyuki, Wada Yoh	4. 巻 11
2. 論文標題 Vacuolar-type proton ATPase is required for maintenance of apicobasal polarity of embryonic visceral endoderm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98952-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Fujimoto Yasuyuki, Haga Satoshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 169
2. 論文標題 Functional complementation of V-ATPase a subunit isoforms in osteoclasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 459 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Fujimoto Yasuyuki, Haga Satoshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional complementation of V-ATPase a subunit isoforms in osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Nobuyuki, Takaoka Katsuyoshi, Hamada Hiroshi, Hadjantonakis Anna-Katerina, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh	4. 巻 31
2. 論文標題 Rab7-Mediated Endocytosis Establishes Patterning of Wnt Activity through Inactivation of Dkk Antagonism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107733 ~ 107733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Matsukawa Reina, Takahashi Shohei, Kudo Koshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 389
2. 論文標題 V-ATPase a3 isoform mutations identified in osteopetrosis patients abolish its expression and disrupt osteoclast function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111901 ~ 111901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.111901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 McGuire Christina M., Collins Michael P., Sun-Wada GeHong, Wada Yoh, Forgac Michael	4. 巻 294
2. 論文標題 Isoform-specific gene disruptions reveal a role for the V-ATPase subunit a4 isoform in the invasiveness of 4T1-12B breast cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11248 ~ 11258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ma Ke, Bin Na-Ryum, Shi Shan, Harada Hidekiyo, Wada Yoh, Wada Ge-Hong-Sun, Monnier Philippe P., Sugita Shuzo, Zhang Liang	4. 巻 13
2. 論文標題 Observations From a Mouse Model of Forebrain Voa1 Knockout: Focus on Hippocampal Structure and Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 FUTAI Masamitsu, SUN-WADA Ge-Hong, WADA Yoh, MATSUMOTO Naomi, NAKANISHI-MATSUI Mayumi	4. 巻 95
2. 論文標題 Vacuolar-type ATPase: A proton pump to lysosomal trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 261 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 K. Shirahama, G. H. Sun-Wada and Y. Wada
2. 発表標題 Microautophagic Membrane Dynamics is Involved in Assembly of Large Vacuoles in Mammalian Cells.
3. 学会等名 The 26th SANKEN International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoh Wada1 and Ge-Hong Sun-Wada
2. 発表標題 ndolysosomal Integrity Maintains the Extraembryonic Ectoderm Lineage via mTORC1 Signalling
3. 学会等名 Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology, Stem Cells: Advances in the Application of Stem Cell and their Role in vivo (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Shirahama, G. H. Sun-Wada and Y. Wada
2. 発表標題 Assembly of large vacuoles in mammalian cells involving microautophagy
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (ISA) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関