

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570206

研究課題名（和文）クリノファジーの分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of crinophagy

研究代表者

山本 章嗣 (Yamamoto Akitsugu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：30174775

研究成果の概要（和文）：

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の予定孢子細胞を脱分化過程におくと、この細胞に特異的な分泌顆粒である PSV がクリノファジー（分泌顆粒が直接リソソームと融合する現象）によって一斉に分解されることを電子顕微鏡観察により見いだした。PSV のクリノファジーにおいては、リソソームだけでなくエンドソームも PSV と融合することが明らかになった。この事実は、クリノファジーによる分泌顆粒の分解過程にエンドソームが深く関わっていることを示している。

研究成果の概要（英文）：

During dedifferentiation process of prespore cells of cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, it was revealed by electron microscopic observation that PSVs; secretory granules specifically present in prespore cells are degraded simultaneously by crinophagy in which PSVs are directly fused with lysosomes. In crinophagy of PSVs, it was found that PSVs fuse with endosomes as well as with lysosomes, suggesting that endosomes are deeply concerned with crinophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：細胞性粘菌、*Dictyostelium discoideum*、クリノファジー、PSV、リソソーム、  
エンドソーム、電子顕微鏡、プロテオミックス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内タンパク質や細胞内構造の分解による代謝回転は、細胞のリニューアルだけでなく、異常タンパク質の排除、細胞の分化状態の変換などに重要な意義を持っている、クリノファジーとは、分泌顆粒にリソソームが直接融合することにより、分泌顆粒内に貯留されたホルモンなどのタンパク質を分解し、分泌顆粒を消失させる作用を言う。ラット乳児を母親から離すと、脳下垂体のプロラクチン産生細胞の分泌顆粒がクリノファジーされる結果、プロラクチン顆粒が減少してプロラクチンの分泌が減少し母乳の生産が停止することを示した Smith と Farquhar (1966) の研究はよく知られている。このように、クリノファジーは、分泌顆粒の量的調節を通じて、ホルモン分泌などの細胞の分泌機能の調節にきわめて重要な役割を果たしている。しかしながら、その分子機構については、ほとんど未知であった。

(2) 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、単細胞と多細胞の生活環をもつ特異な真核生物であり、細胞分化のモデル生物として広く用いられている。分化期に入った粘菌細胞は、集合して多細胞からなる移動体を形成し、将来、孢子になる予定孢子細胞と柄になる予定柄細胞に分化する。予定孢子細胞には、孢子形成時にその細胞壁成分をエクソサイトシスするために、予定孢子細胞特異液胞 (PSV) と呼ばれる糖タンパク質などを貯留する分泌顆粒が形成される。移動体から細胞を分散して培養すると、PSV が分解され、数時間で脱分化して、栄養存在下で再び増殖を開始する。この過程を、電子顕微鏡的に解析したところ、PSV の分解がクリノファジーによることが示唆されたので、本申請を行い、研究を進めた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、クリノファジーの分子機構の解明にある。我々は、細胞性粘菌の分泌顆粒である PSV が、細胞の脱分化過程でクリノファジーによって一斉に分解されることを見出した。この実験系を用いて、クリノファジーがいかにして起こるか、その分子機構の解明を目指す。さらに、その知見に基づいて、哺乳類におけるクリノファジーの研究を展開し、クリノファジーの全体像を明らかにするとともに、ホルモン分泌など細胞の分泌調節におけるクリノファジーの生理的意義を解明したいと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養と脱分化。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* AX-2 株を栄養培地 (HL5) で震盪培養し増殖させた。AX-2 株を無栄養培地に移してミリポアフィルター上で発生させ、移動体を形成させた (図 1)。

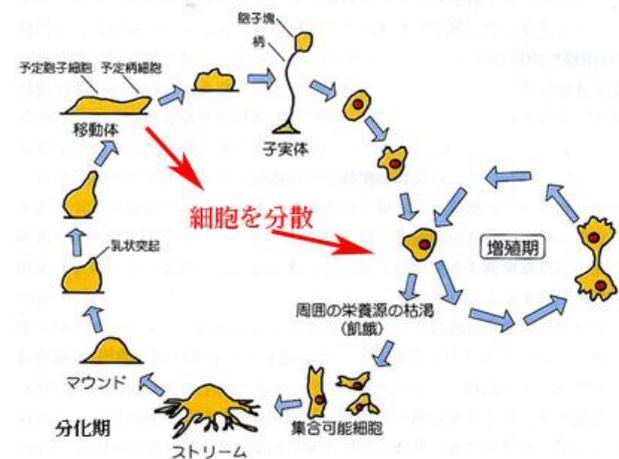


図 1 キイロタマホコリカビ *Dictyostelium discoideum* の生活環。前田靖男博士 パワフル粘菌を改変

移動体を回収し塩溶液中でピペッティングにより細胞を分散し、HL5 中で震盪培養して予定孢子細胞を脱分化させた。細胞分散、0-5 時間後の細胞を回収し、以下の生化学的解析、蛍光抗体法、電子顕微鏡的解析に用いた。

(2) PSV 膜の調製。脱分化過程にある予定胞子細胞から PSV を密度勾配遠心法により単離し (Srinivasan et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 35823-35831)、単離 PSV からさらに限界膜面分 (PSV 膜) を調製し、2次元電気泳動により膜タンパク質をプロテオミックス解析する予定であったが、脱分化過程にある細胞から解析に十分量の PSV 膜を調製することはできなかつた。

(3) 蛍光抗体法。

①抗体。PSV マーカーとして PSV 抗原、リソソームマーカーとしてカテプシン D、エンドソーム マーカーとして p80 エンドソーム膜タンパク質に対する抗体を用いた。カテプシン抗体は、細胞性粘菌のカテプシン D の N 末端の配列; AGTTIPISDFEDAQYYGAIT をペプチド合成し、家兎に免疫して得た。

②蛍光抗体法。ポリリジンコートしたカバーガラス上に細胞懸濁液を乗せ、接着させた後、 $-20^{\circ}\text{C}$  に冷却した 100 % メタノールで 5 分固定した。PBS で洗浄後、通常の方法を用いて間接蛍光抗体法を行った。

(4) 電子顕微鏡。細胞のペレットを 2.5% グルタルアルデヒドを含む固定液で 1 時間固定した後、1% オスミウム酸で 1 時間固定し、脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製して電子顕微鏡観察を行った。

(5) 免疫電子顕微鏡。細胞性粘菌のための免疫電子顕微鏡法を開発した。プラスチックカバーガラスに接着させた細胞を 2% パラフォルムアルデヒドと 0.05% グルタルアルデヒドを含む固定液で 1 時間固定後、 $-20^{\circ}\text{C}$  に冷却した 100 % メタノールで 10 分透過処理を行った。その後、1 次抗体、1 nm 金粒子ラベル 2 次抗体、金増感試薬と反応させ、

エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製して電子顕微鏡観察を行った。本法を用いて、*Dictyostelium* 液胞膜タンパク質の免疫電顕的検出に成功し、*Dictyostelium* 液胞の起源の解明を進めることができた。現在、本法を用いて、クリノファジーにおける PSV、リソソーム、エンドソームの挙動を解析中である。

#### 4. 研究成果

(1) PSV 消失過程の電子顕微鏡的解析。PSV 消失過程を電子顕微鏡により詳細に解析した。移動体分散約 2 時間後からリソソームと PSV との融合がみられ、その後、PSV の内容物が分解される様子が観察された (図 2、A-C)。分散約 5 時間後には、その内容がほぼ完全に分解されたリソソームが多数みられた。この過程では、オートファジーは観察されなかつた。これらの観察から、PSV の分解は、PSV とリソソームが融合して、加水分解酵素が PSV に供給されて起こるクリノファジーによるものであることが示された。

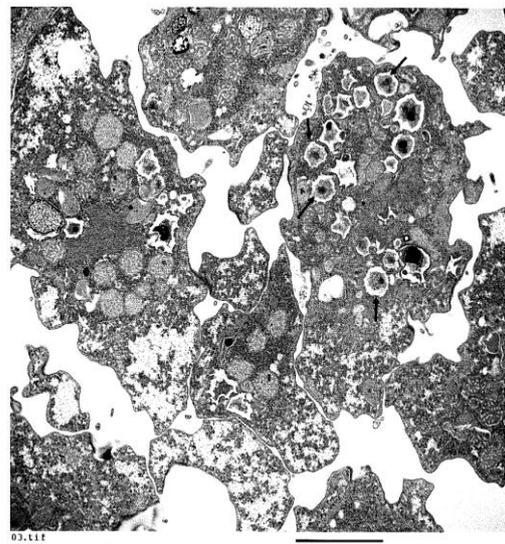


図 2A。移動体から分散直後の予定胞子細胞。矢印は PSV を示す。バー;  $2\mu\text{m}$ 。

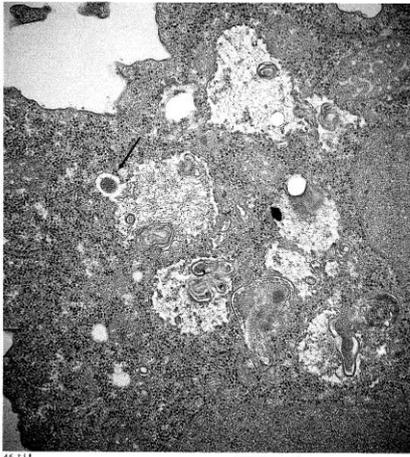


図 2B。分散 2 時間後の予定胞子細胞。矢印は PSV とリソソームの融合を示す。バー ; 500 nm。

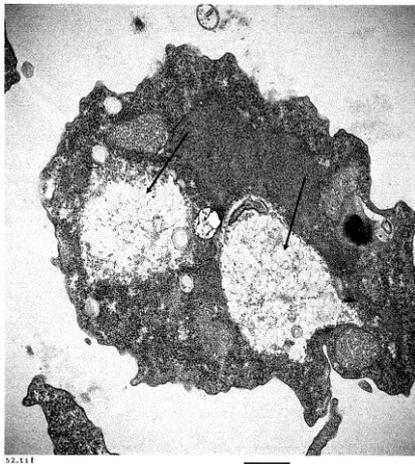


図 2C。分散 2 時間後の予定胞子細胞。矢印は内容物の分解された PSV を示す。バー ; 500 nm。

(2) PSV 消失の時間経過とリソソーム阻害剤の効果。次に、PSV 抗原を蛍光抗体法により検出して、クリノファジーの動態と PSV 消失に及ぼすリソソーム阻害剤 ; バフィロマイシン A1 の効果について調べた。その結果、移動体分散後、数時間で PSV 顆粒を持つ細胞が急速に減少すること、バフィロマイシン A1 が、PSV の消失を有意に阻害することが示された (図 3)。この PSV の消失のカイネティクスは、PSV とリソソームとの融合が分散後 2 時間くらいから観察されるという電顕観察

とよく対応している。バフィロマイシン A1 は、PSV と融合したリソソームの内腔 pH を中性化することによって、PSV 抗原の分解を阻害すると考えられる。

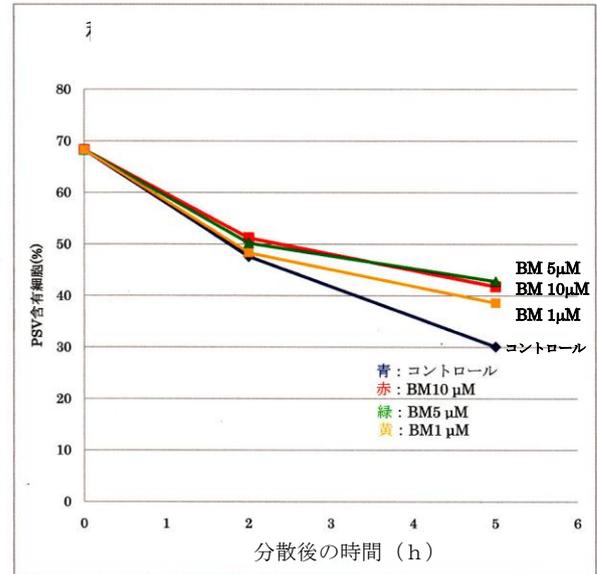


図 3。クリノファジーのカイネティクスとバフィロマイシン A1 による阻害。移動体分散後、各時間における PSV 含有細胞の割合を縦軸に示す。PSV 抗原を蛍光抗体法を用いて検出した。BM ; 1~10 μM の濃度のバフィロマイシン A1 を含む HL5 で震盪培養した。

(3) 蛍光抗体法による PSV 消失過程における PSV、リソソーム、エンドソームの動態の解析。PSV 消失時におけるクリノファジーの過程をさらに解析するため、リソソームマーカーのカテプシン D とエンドソームマーカーの P80 に対する抗体を用いて、PSV 消失時におけるリソソームとエンドソームの挙動を追跡した。その結果、移動体分散後、約 2 時間で、リソソームとエンドソームがほぼ同時に PSV と融合し、それ以降、PSV 抗原の消失が見られた (図 4, A, B)。この事実は、クリノファジーによる PSV の分解過程にエンドソームが深く関わっていることを示している。

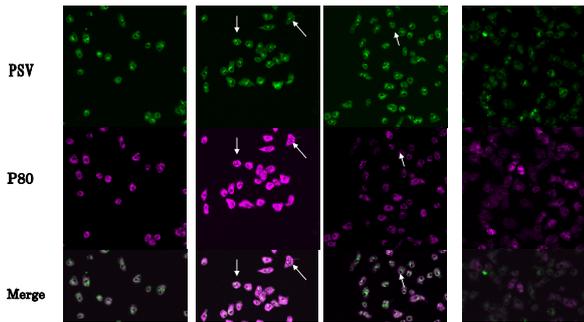


図 4 A. 脱分化過程における PSV とエンドソームの動態。移動体分散後、各時間における PSV 抗原、p80 エンドソーム膜タンパク質を蛍光抗体法により検出し、共焦点顕微鏡により観察した。白矢印は、両者が共局在する部位を示す。

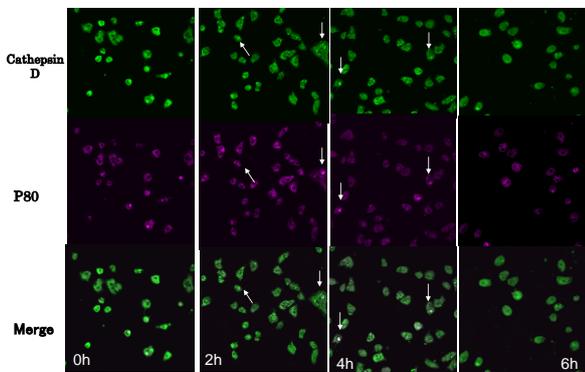


図 4 B. 脱分化過程におけるリソソームとエンドソームの動態。移動体分散後、各時間におけるカテプシンD、p80 エンドソーム膜タンパク質を蛍光抗体法により検出し、共焦点顕微鏡により観察した。白矢印は、両者が共局在する部位を示す。

(4) GFP, YFP タグ PSV タンパク質発現細胞を用いた解析。クリノファジーの過程をさらに詳細に解析する系をつくるため、オクラホマ大学、健康科学センター West 教授と共同して、PSV に含まれる分泌タンパク質 sp65、sp85 の遺伝子座に各々、GFP, YFP タグを導入した AX-3 株を用いて PSV をラベルし、同時に、リソソームマーカーのカテプシンDとエンドソームマーカーの p80 に対する抗体を用

いて、PSV 消失時におこるリソソームとエンドソームの挙動を追跡した。その結果、エンドソーム、リソソームが細胞分散後約 2 時間のほぼ同じ時期に PSV と融合し、そのあと内容物の sp65, sp85 が分解されることが明確に示された。

以上の結果については、本年度、10 月の国際学会で発表を予定している。

#### 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)

- ① Uchikawa T, Yamamoto A, Inouye K.  
Origin and function of the stalk-cell vacuole in Dictyostelium. Dev Biol.  
352 巻、2011 48-57、  
DOI:10.1016/j.ydbio.2011.01.014

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 章嗣 (Yamamoto Akitsugu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：30174775