

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06173

研究課題名（和文）核膜脂質代謝制御の変化に伴う核膜ストレス発生機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of nuclear membrane stress production mechanism associated with the regulation of nuclear membrane lipid metabolism

研究代表者

小笠原 裕太 (Ogasawara, Yuta)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・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）：本研究において骨肉腫細胞U2OSのCCT 欠損により著しい核膜形態変化が起きることを見出すとともに、哺乳類オートファジーに關与するDFCP1、Atg13、WIPI2といったいくつかのAtgがオートファゴソーム形成時に液滴様の構造を形成することをLive-imagingおよびFRAP法を用いて明らかにした。ヒトのAtg13やWIPI2は天然変性領域を持っており液-液相分離を介したAtgの高次構造形成に寄与していることが示唆された。核膜ストレス発生部位近傍でAtg13やWIPI2が液-液相分離を起こすことで迅速にオートファジーを介したストレス応答が可能になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに出芽酵母の液胞膜上の特定部位においてAtgの液滴構造(Fujioka et al. Nature. 2020)が形成されることについては既に報告されていたが、哺乳類ではいまだ報告がなく本研究で見いだされた相分離を介したオートファゴソーム形成機構は新規のメカニズムである。癌遺伝子RASの活性化がnucleophagyを介した核膜構成成分の分解を誘導することで、核膜ストレスの発生および細胞老化を引き起こすことが報告されているが、Atg13やWIPI2の相分離を制御することでオートファジーによる核膜ストレスの制御が可能となり老化の予防も期待できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the deficiency of CCT in osteosarcoma cells U2OS leads to significant changes in nuclear membrane morphology. Additionally, we elucidated that several Atgs involved in mammalian autophagy, such as DFPC1, Atg13, and WIPI2, form droplet-like structures during autophagosome formation using live-imaging and FRAP methods. It was suggested that human Atg13 and WIPI2, which possess intrinsically disordered regions, contribute to the higher-order structure formation of Atgs through liquid-liquid phase separation. It was also suggested that the liquid-liquid phase separation of Atg13 and WIPI2 near sites of nuclear membrane stress enables a rapid stress response via autophagy.

研究分野：細胞生物

キーワード：核膜ストレス オートファジー 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

細胞の生存にとって核膜の構造が維持されることは非常に重要である。しかしながら、DNA 損傷や酸化ストレスなどで核膜構成成分が劣化する状況では核膜崩壊や核輸送の障害といった核膜ストレスが発生し核の適切な機能が脅かされる。核膜ストレスは遺伝性早老症であるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群の発症に関連することから、細胞及び個体の老化の仕組みを明らかにするうえで重要な現象であるが、いまだ核膜ストレス応答を含めた分子の実態については大部分が未知である。

2. 研究の目的

申請者は、ホスファチジルコリン(PC)合成経路 Kennedy pathway で働く律速酵素 CCT β を欠損させ、生体膜の PC 供給を核に局在する CCT α に依存する CCT β 欠損細胞を用いた解析で核膜構造の破綻や飢餓ストレス条件化での細胞生存率が著しく抑制されることを見出した。本研究では核膜ストレス発生時の脂質の流動性を解析するとともに、オートファジー(nucleophagy)が核膜ストレスの発生・修復機構として如何にして効率よく膜形成を起こしているか明らかにする。

3. 研究の方法

骨肉腫細胞 U2OS の CCT β KO 細胞の解析

- ① U2OS の PC 合成を CCT α に限定した際の核膜形態の変化を解析する。
- ② 選択的オートファジーに関与する DFCP1 の変異体解析
オートファジーの初期構造である Omegasome のマーカータンパク質 DFCP1 が選択的オートファジーに関与することが報告されており(Nähse et al. *Nat Commun.* 2023)、Nucleophagy においても機能することが示唆されていたため DFCP1 の変異体を作製しオートファゴソームの形成に及ぼす影響を解析した。
- ③ FRAP assay を用いたオートファジー初期構造の解析
オートファゴソーム形成部位における各種 Atg の流動性を FRAP 方で解析する。
- ④ オートファジー初期構造 Omegasome の超解像ライブイメージング
オートファジーが誘導時の隔離膜形成部位について共焦点顕微鏡を用いた超解像イメージングを行う。

4. 研究成果

① 骨肉腫細胞 U2OS の CCT β KO 細胞の解析

骨肉腫細胞 U2OS の CCT β を欠損することで核膜が異常な形態になることを既に見出していたが、透過型電子顕微鏡法でも同様の結果が得られた(図 1)。

② 選択的オートファジーに関与する DFCP1 の変異体解析

DFCP1 の NTPase ドメインに変異を導入することで(DFCP1_T189A)、異常な形態のオートファゴソームが形成された。DFCP1_T189A を解析していく中で WT の DFCP1 に比べ FRAP assay の値に大きな差が出るのが明らかとなった。出芽酵母では効率よくオートファゴソームを形成するために Atg がオートファゴソーム形成部位(PAS)において液-液相分離を起こしていることが既に知られているが哺乳類でも Omegasome 上で DFCP1 含めいくつかの Atg が相分離している可能性があった。

③ 哺乳類オートファジー誘導時の各種 Atg の流動性に差があるか明らかにするために FRAP assay を行った。その結果 DFCP1 だけでなく WIPI2b や Atg13 についても高い流動性を持つことが明らかとなった(図 3)。

④ DFCP1 や WIPI2b は共に PI3P へと結合する分子である。これら分子が高い流動性をもって Omegasome へとリクルートされるのならば Omegasome 形成時の ER 膜も何らかの影響を受けていると考えられる。そ

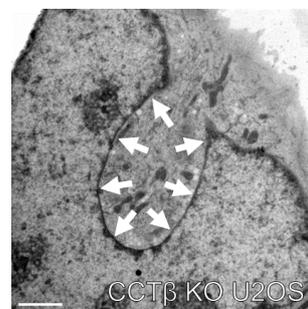


図 1. CCT β KO U2OS の電子顕微鏡観察。

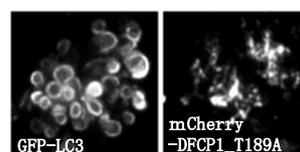


図 2. DFCP1_T189A 発現時に形成される異常な形態の隔離膜

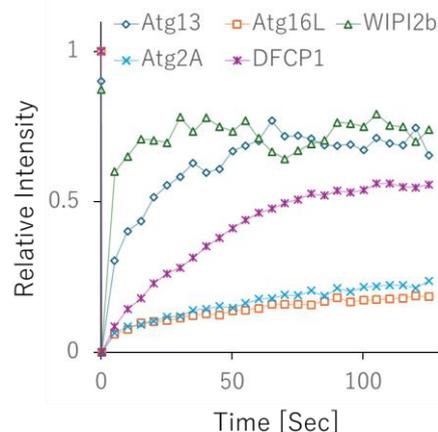


図 3. Atg の FRAP assay

の点を明らかにするために Omegasome の超解像ライブイメージングを行った。その結果 Omegasome 形成時に ER が集積していることが明らかとなった。また WIPI2b と ER の分布を追跡することで Omegasome の形成に伴って ER が協調して形態変化を起こしていることを明らかにした(図 4)。

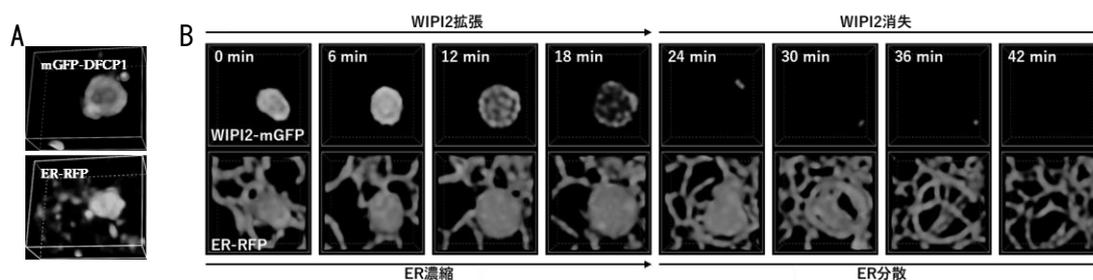


図 4. (A) Omegasome 形成時の DFCCP1 および ER の分布。(B) Omegasome 形成時の WIPI2b および ER の分布。

このことから哺乳類のオートファジーでは Omegasome の形成に伴って ER の集積が起こり、これにより ER から隔離膜へ Atg2 を介した膜脂質の効率的な供給が達成されていると考えられる。以上のことからオートファジー(nucleophagy)が核膜ストレスの発生・修復機構として効率よく機能するためには核膜ストレス発生部位においてオートファジー初期構造の効率的な相分離が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Cui Jin, Ogasawara Yuta, Kurata Ikuko, Matoba Kazuaki, Fujioka Yuko, Noda Nobuo N., Shibasaki Masakatsu, Watanabe Takumi	4. 巻 144
2. 論文標題 Targeting the ATG5-ATG16L1 Protein-Protein Interaction with a Hydrocarbon-Stapled Peptide Derived from ATG16L1 for Autophagy Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 17671 ~ 17679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07648	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 Hama Yutaro, Ogasawara Yuta, Noda Nobuo N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Autophagy and cancer: basic mechanisms and inhibitor development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.15803	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2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuta Ogasawara, Kazuaki Matoba, Yutaro Hama, Nobuo Noda.
2. 発表標題 哺乳類オートファジーにおける小胞体-隔離膜コンタクトサイトの解析
3. 学会等名 第59回日本生化学会北海道支部例会日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原裕太、程晶磊、立松律弥子、内田岬希、村瀬桜波、吉川翔吾、大崎雄樹、藤本豊士
2. 発表標題 長期的な飢餓条件下におけるオートファジー維持機構
3. 学会等名 「マルチモードオートファジー」第3回班会議 第14回オートファジー研究会・若手の会
4. 発表年 2021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
---------	---------