

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15082

研究課題名（和文）ゴルジ体トランス層のもつダイナミックな新規機能の解析

研究課題名（英文）Study of alternative function of Golgi apparatus

研究代表者

桜井 一（Sakurai, Hajime）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：00796732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーには、Atg5に依存し小胞体膜を起源とする通常のオートファジーと、Atg5に依存せずゴルジ体を起源とする新規オートファジーの2種類が存在する。後者のオートファジーについては、従来型のオートファジーと分子メカニズムが異なるが故に、既存の評価手法が適用できず、『ゴルジ体かどのように新規オートファジーの起点となって機能するのか？』について未解明のままであった。本研究では、新規オートファジーを可視化する手法を開発し、学術論文として公表した。また、開発した手法を用いて、2種類のオートファジーを比較することが可能となり、ゴルジ体を起点とする新規オートファジーの実態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、可視化手法の乏しかった新規オートファジーを簡便に可視化することが可能となった。新規オートファジーの進行度を判別することも可能となり、解析の遅れていた関連分子群の研究が加速することを期待できる。また、我々の先行研究から新規オートファジーは神経変性疾患との関連が深いことが明らかになっており、同疾患の機序の解明および新薬の開発への寄与が期待できる。さらに、同一細胞内における2種類のオートファジーの使い分けを明らかにした。一方のオートファジー経路の失調による疾患をもう一方のオートファジーを活性化することで機能補完するような治療法の開発にも期待している。

研究成果の概要（英文）：There are two types of autophagy: conventional autophagy, which depends on Atg5 and whose isolation membranes originate from the ER membrane, and alternative autophagy, which functions independently of Atg5 and is closely associated with the Golgi apparatus but not the ER. The molecular mechanism of the latter type of autophagy is quite different from that of conventional autophagy, and therefore existing methods of analysis cannot be applied to the latter type of autophagy. This makes it difficult to analyze the mechanisms of alternative autophagy so far. In this study, we first developed and published methods to visualize alternative autophagy. Using the developed method, we were able to compare two types of autophagy, and clarify the activity of alternative autophagy based on the Golgi apparatus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

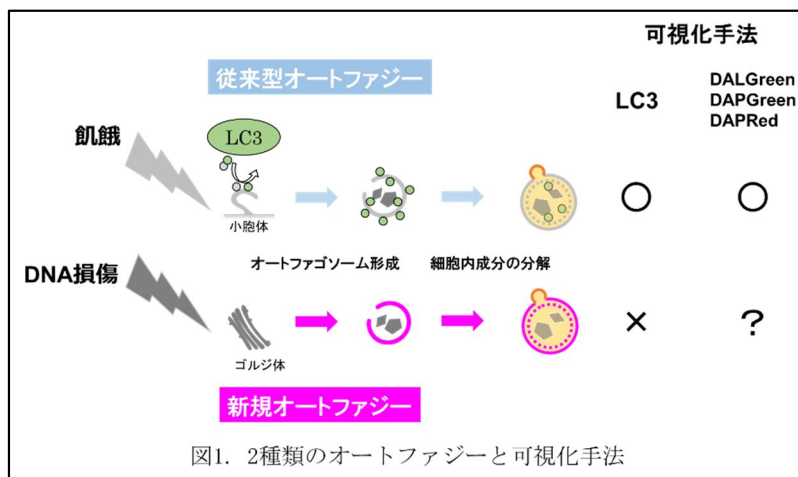
哺乳動物細胞においてゴルジ体は扁平な袋状の槽板が複数重なった構造をした特徴的な細胞内小器官である。各槽板は cis/medial/trans の3種類の層に機能的に分類され、小胞体で合成されたタンパク質が各層を段階的に輸送されることで、高度な糖鎖修飾を実行している。なかでも trans 層は、ゴルジ体で修飾されたタンパク質を細胞膜やリソソームへと分別して輸送するターミナルとしても重要な役割を果たしている。当研究室ではゴルジ体からの分泌輸送を薬剤で阻害することで、ゴルジ体を起点とした全く新規のオートファジーが誘導されることを発見している (Yamaguchi et al., 2016; Yamaguchi et al., 2020)。しかし、『ゴルジ体がどのように新規オートファジーの起点となって機能するのか?』については未解明のままであった。

一般的なオートファジー(以降、従来型オートファジー)においては、細胞質成分をリソソームで分解するために隔離膜と呼ばれるカップ状の膜構造を形成する。従来型オートファジーの分子メカニズムの解明は、LC3 (Atg8) の発見によって飛躍的に発展した(図1; Klionsky et al., 2021)。オートファジーが誘導されると LC3 は脂質修飾を受け、通常状態では細胞質中に拡散している細胞内局在を劇的に変化させ、隔離膜上へと局在化ようになる。即ち、LC3 の修飾状態をタンパク質の分子サイズの変化として検出できるだけでなく、視覚的な変化としてもオートファジーを検出することができる。LC3 の細胞内状態を指標とした判定方法は非常に秀逸であるが、課題もあった。LC3 が必ずしもオートファジー現象に必須ではなかったことである。当初は LC3 がオートファジーに必須な因子であると考えられていたが、新規オートファジーをはじめとして必ずしも必要ではないという報告が近年増加している。一方で、市販のオートファジー検出試薬類も、LC3 を指標として検出の確からしさを担保しており、これら指示薬でオートファジー活性を検出しない状況にあっても潜在的には異なる種類のオートファジーが惹起している可能性が指摘されていた。

以上の経緯より、申請者は『ゴルジ体がどのように新規オートファジーの起点となって機能するのか?』という学術的問いの解明を目指し、新規オートファジーを可視化する手法の開発に着手した。近年、申請者は(株)同仁化学研究所との産学共同研究により、オートファジーを可視化できる低分子化合物、DALGreenとDAPGreen、DAPRedという3つのプローブの開発に成功している (Iwashita et al., 2018; Sakurai and Iwashita et al., accepted)。開発した3つのプローブは共通した疎水性尾部を持ち、この構造によって従来型オートファジーの隔離膜に局在化することを明らかにしている。従来型オートファジーを誘導すると、これらの蛍光プローブとLC3は非常によく共局在するが(図1)新規オートファジーを評価できるかは不明であった。

また、これまで、新規オートファジーを評価するためには、細胞を固定して電子顕微鏡観察を実施する必要があった。

細胞質成分を膜で囲んだ構造であるオートファゴソームの形態が細胞内において非常に特異なものであるため、LC3で標識されない新規オートファゴソームを同定するのに有効な手段である。しかし、熟達した手技が要求されるうえ、開発した蛍光プローブは固定細胞に使用できなかったために、新規オートファジーに対する有用性は評価できていなかった。



2. 研究の目的

本研究では、『ゴルジ体がどのように新規オートファジーの起点となって機能するのか?』という学術的問いの解明を目指す。具体的には、まず、(1) 新規オートファジーを可視化する手法を開発する。次に、(2) 開発した手法を用いて、新規オートファジーがゴルジ体から形成される様子をライブイメージング観察で捉えることを目指す。さらに、(3) 2種類のオートファジーを比較することで新規オートファジー膜動態の理解をはかる。

3. 研究の方法

(1) 新規オートファジー可視化手法の開発

広く使用される LC3 によるオートファジーの可視化とは異なる戦略でオートファジーを可視化する手法として、新規蛍光プローブ(DALGreen、DAPGreen、DAPRed)および新規手法(FLAD);

Sakurai et al, 2022) を採用し、新規オートファジーへの適応を評価した。

(2) 新規オートファジー誘導時のゴルジ体ライブイメージング観察

上記の2手法において、新規オートファジーの可視化が可能であることを証明できたため、これからマーカーとゴルジ体の細胞内共観察を実施した。

(3) 2種類のオートファジー間の類似性と相違点の探索

従来型オートファジーと新規オートファジーを同時に可視化し、ストレスに対する応答度の差を比較した。各可視化手法が共通して2つのオートファジーを可視化できたことから、共通するメカニズムを探索した。

4. 研究成果

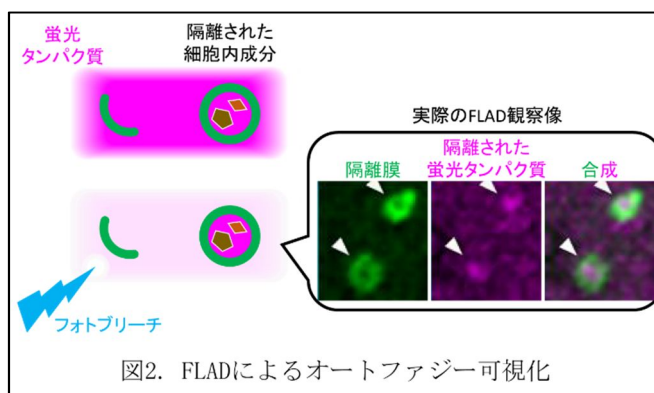
(1) 新規オートファジーだけでなく、広く普遍的にオートファジーを検出できる手法に着目した。

(株)同仁化学研究所との産学共同研究により開発した DALGreen、DAPGreen、DAPRed は従来型オートファジーを可視化できることを既に明らかにしている (Iwashita et al, 2018; 19K16119)。従来型オートファジーを機能欠損した培養細胞をこれら蛍光プローブで標識すると、新規オートファジー誘導に応答して蛍光強度が増強した。さらに、蛍光プローブの標識する細胞内構造を光-電子顕微鏡相関観察によって特定すると、オートファジー関連構造であることが明らかになった。以上の結果より、DALGreen、DAPGreen、DAPRed の3つの蛍光プローブは従来型オートファジーだけでなく、新規オートファジーも可視化することが可能であることを明らかにした。

オートファゴソームは「細胞内成分を膜で囲む」という他に類を見ない特性を持つ。その特性に着目し、普遍的なオートファゴソームを簡便に可視化する手法を開発し、FLAD と命名した (Sakurai et al, 2022)。

仕組みとしては、まず、細胞質中に蛍光分子を発現させてオートファゴソームによって取り込ませる。その後、取り込まれなかった蛍光分子だけを消光することで、オートファゴソームの特性である「細胞内成分を膜で囲んだ」構造を可視化できることを見出した (図2)。

同様に、従来型オートファジーを機能欠損した培養細胞で新規オートファジーを誘導すると、FLAD でも新規オートファジーが誘導される様子を可視化することに成功した。

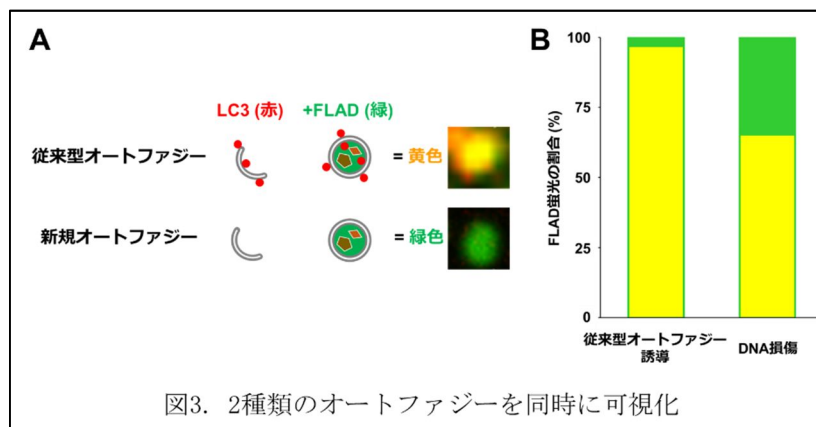


(2) 『ゴルジ体がどのように新規オートファジーの起点となって機能するのか?』を明らかにするために、開発した蛍光プローブおよび FLAD によって新規オートファジーを可視化してゴルジ体との関連性を解析した。いずれの指標においても新規オートファジーを誘導すると、ゴルジ体局在分子がオートファゴソーム構造をとっていることが示唆された。特に、FLAD によってゴルジ体局在分子が標識されたことにより、新規オートファジーがゴルジ体由来することが明確に示された。

(3) 新規オートファジーの生理的活性およびメカニズムを明らかにするべく、従来型オートファジーとの相違点と類似性を解析した。

まず、従来型オートファジーとの相違点に着目した。電子顕微鏡観察で従来型オートファジーと新規オートファジーを判別することが困難であるため、これまで新規オートファジーを可視化するには従来型

オートファジーを機能欠損した細胞を用いてきた。本研究により、蛍光顕微鏡で簡便にすべてのオートファゴソームを可視化することが可能となり、LC3 による従来型オートファジー可視化と組み合わせることで、2つのオートファジーを同時に可視化することが可能になった (図3A)。野生型の培養細胞を用いて FLAD と LC3 を組み合わせると、2種類のオートファジーが確かに存在し、興味深いことに、細胞に与える刺激によって使い分けられていることが明らかになった (図



3A)。野生型の培養細胞を用いて FLAD と LC3 を組み合わせると、2種類のオートファジーが確かに存在し、興味深いことに、細胞に与える刺激によって使い分けられていることが明らかになった (図

3B) 以上の結果から、新規オートファジーは従来型オートファジーとは全く異なる機構によって独立に制御される細胞応答であることが明らかになった。

次に、従来型オートファジーとの類似点にも着目した。DAPGreen によって従来型オートファジーのみならず新規オートファジーも可視化できることを明らかになったことより、DAPGreen がオートファジー構造を識別する機構が 2 種類のオートファジーで共通している可能性が示唆された。そこで、DAPGreen がどのような生体膜構造を識別するのかを解析したところ、PI3P を持つ二重膜構造を識別していることが明らかになった (Sakurai and Iwashita, Accepted)。この結果より、新規オートファゴソーム膜においても PI3P が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上の本研究成果により、新規オートファジーの分子機構解析が加速することが期待でき、新規オートファジーと従来型オートファジーを使い分けて関連疾患の克服に臨むような新手法の開発に期待ができる。

参考文献

Yamaguchi H, Arakawa S, Kanasaki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watanabe H, Tsujimoto Y, Shimizu S, Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals., 2016, *EMBO J.* 35:1991-2007.

Yamaguchi H, Honda S, Torii S, Shimizu K, Katoh K, Miyake K, Miyake N, Fujikake N, Sakurai HT, Arakawa S, Shimizu S, Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration., 2020, *Nat. Commun.* 11:5311.

Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)., 2021, *Autophagy*, 17(1), 1-382

Iwashita H, Sakurai HT, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Okuma K, Shimizu S, Ueno Y, Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux., 2018, *FEBS Lett.*, 592, 559-567

Sakurai HT, Iwashita H, Arakawa S, Yikelamu A, Kusaba M, Kofuji S, Nishina H, Ishiyama M, Ueno Y, Shimizu S, Development of small fluorescent probes for the analysis of autophagy kinetics, *Accepted, iScience*

Sakurai HT, Arakawa S, Noguchi S, Shimizu S, FLIP-based autophagy-detecting technique reveals closed autophagic compartments., 2022, *Sci. Rep.*, 12, 22452
2022

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 2件）

1. 著者名 Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Noguchi Saori, Shimizu Shigeomi	4. 巻 12
2. 論文標題 FLIP-based autophagy-detecting technique reveals closed autophagic compartments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22452-22452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26430-5	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 IWAMOTO TATSUYA, SHIMIZU SHIGEOMI, TAJIMA-SAKURAI HAJIME, YAMAGUCHI HIROFUMI, NISHIDA YUYA, ARAKAWA SATOKO, WATADA HIROTAKA	4. 巻 69
2. 論文標題 Inhibition of Insulin Secretion Induces Golgi Morphological Changes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14789/jmj.JMJ22-0040-0A	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桜井一, 岩下秀文, 荒川聡子, Alifu Yikelamu, 仁科博史, 石山宗孝, 上野右一郎, 清水重臣
2. 発表標題 新規開発低分子化合物による生体内オートファジーの可視化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
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
---------	---------