

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650019

研究課題名(和文) 独自開発したオートファゴソーム単離法を用いたオートファゴソーム膜の脂質成分解析

研究課題名(英文) The development of method for the isolation of autophagosomes

研究代表者

長谷川 純矢 (Hasegawa, Junya)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：00533788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内大規模分解システムである。その駆動オルガネラであるオートファゴソーム膜の脂質成分解析の報告はこれまで全くない。そこで、我々が開発したビーズを用いたオートファゴソーム単離法を用いて、脂質成分解析を実施すべく研究を開始した。我々は本方法でプロテオミクス解析を行い、いくつか興味深い分子を発見している。その方法を改良し、より多くのビーズ(オートファゴソーム)を回収可能な条件を見出すことに成功した。その条件で回収したビーズから脂質を抽出し、質量分析にて解析したが、脂質のピークは検出限界以下だった。今後はさらに改良し、脂質が検出できる条件を見出し脂質成分解析を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a bulk degradation system which is mediated by a unique organelle "autophagosome". It has been few reports on the lipid component of the autophagosome membrane. We have previously developed the unique method for the isolation of autophagosomes using latex beads. Thus, we set out to purify the autophagosomes to clarify the lipid component. We found the suitable condition to collect the high amounts and high purity of autophagosomes. Under the condition, we tried MS analysis, but unfortunately we could not detect any peak of lipids in MS. Hereafter, we will find the more suitable condition, and perform the analysis of lipid component of autophagosomes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オートファジー 脂質

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物全般に普遍的に存在する細胞内大規模分解システムである。飢餓やストレスにさらされると、扁平な袋状の膜小胞（隔離膜）が一過的に現れ細胞質成分やオルガネラを囲い込み、オートファゴソームと呼ばれる閉じた二重膜構造体を形成する。そこにリソソームが融合（オートリソソーム）し、内容物の分解が起こる（**図1**）。近年の爆発的な研究進展により、飢餓時の栄養源確保以外に、発がん・神経変性・糖尿病の抑制など多岐に亘る機能が次々と判明し、創薬のターゲットとしても大きな注目を浴びている。オートファジーの分子メカニズムは徐々に明らかとなってきたが、そのほとんどがタンパク質に焦点を当てた研究であり、膜輸送システムの一つでありながら、主な膜成分である「脂質」に注目した解析は皆無に等しい。我々は、独自にラテックスビーズを用いたオートファゴソーム単離法を開発している。侵入した細菌や損傷したオルガネラにはユビキチンという目印が付けられ、それを認識してオートファゴソーム膜に包まれる（選択的オートファジー）(Fujita et al., J Cell Biol. 2013)。本方法はそれを模倣しており、すなわち遺伝子導入試薬でコートされたラテックスビーズを細胞に取り込ませると、ビーズを囲ったエンドソームが破裂しユビキチン化が起き、その損傷したエンドソームを認識してオートファゴソーム膜が形成される（**図2**）、という原理に基づいている。細胞破碎後、シヨ糖密度濃度勾配でビーズ画分を取得すれば、高純度のオートファゴソームが単離できる。実際この方法で、プロテオミクスを実施しており、LC3やp62といった既知のタンパク質から、これまでオートファジーと関わりが知られてない未知のタンパク質を多く同定している（未発表データ）

図1

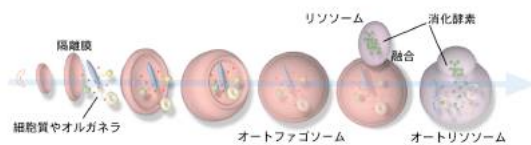
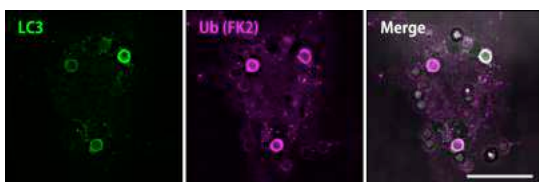


図2



MEF 細胞に取り込まれたビーズは、ユビキチン (Ub) 及びオートファゴソーム (LC3) 陽性である。

2. 研究の目的

酵母を用いた遺伝学を皮切りに、近年爆発的にオートファジー研究は進展しており、オートファゴソーム形成に関わる多くのタンパク質 (ATG タンパク質) の解明は進んでいる。しかしながら、どのような種類の「脂質」がオートファゴソームを形成しているのか、その多くは謎に包まれている。その理由の一つとして、オートファゴソームは一過的に形成されるオルガネラであるため、その単離が極めて難しいことが挙げられる。飢餓などのストレスにより、オートファゴソームは数分から十数分で完成し、すぐにリソソームと融合してしまう。この短寿命のオルガネラ故、その単離は困難を極めていた。

今回、我々が独自に開発したオートファゴソームの単離方法は、オートファゴソーム膜が取り込まれたビーズ上に形成され、その維持時間が長い大量に精製可能である、というメリットがある。そこで、本方法を用いてリポドミクスを行い、オートファゴソームの脂質成分及びその関連酵素群を網羅的・統合的に解析し、オートファジーにおける脂質制御マシナリーの全貌解明に迫る。

3. 研究の方法

a) リポドミクスにおける条件検討

上述したが、我々は独自にオートファゴソーム単離法を開発・実施し、すでにプロテオミクス解析を行っている。しかし、タンパク質と脂質では回収される効率等が異なることが予想されるため、脂質成分が測定できるような条件検討を行う必要がある。本研究では、最適な 1) 細胞株、2) 細胞数、3) ラテックスビーズの量、4) 脂質抽出方法、5) コントロール、といった条件検討を主に行い、リン脂質の定量アッセイにより適量の脂質が抽出されているかどうか判断した。

b) リポドミクス

条件検討を終了した後、脂質解析で著名な東京大学大学院薬学系研究科の新井洋由先生ならびに理化学研究所の有田誠先生にサンプルを送付し、質量分析により脂質成分解析を行った。特に有田先生のグループは、脂質に特化した質量分析機を数台保有しており、リポドミクスの共同研究を数十件行っている程、日本で唯一のリポドミクスに特化した研究室である。

4. 研究成果

(1) 条件検討

脂質成分解析では、高い収量並びに純度が求められるため、適した細胞株や細胞数、ビーズの量などの検討を行った。検討比較した細胞株は MEF、COS、そして HeLa 細胞である。まずは、ビーズを取り込む量の検討を

行い、MEF 細胞では 1 細胞あたり取り込むビーズは 5 個程度だったが、COS 細胞及び HeLa 細胞では 10 個程度だった。HeLa 細胞は遺伝子導入効率の高さや CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊も比較的容易である。一方、COS 細胞はサルの細胞であり、また最終的に得られるビーズの総収量は HeLa 細胞より劣ったため、検討の結果、用いる細胞株は HeLa 細胞に決定した。

また、我々はすでに CRISPR/Cas9 システムによって、多くの Atg 関連遺伝子のノックアウト HeLa 細胞を作成している。その中でネガティブコントロールとして、我々は FIP200 (オートファジーの最上流因子 ULK1/2 複合体の一部) ノックアウト細胞を用いることにした。その理由として、1) Atg5 や Atg7 ノックアウト細胞では隔離膜が形成されてしまい、単離したビーズにはオートファジー因子が結合している可能性が高い、2) ULK1/2 複合体はオートファジーの最上流に位置し、隔離膜は全く形成されず、ネガティブコントロールとして最適、などが挙げられる。また、FIP200 ノックアウト細胞では、野生株に比べやや劣るものの、ビーズの取り込み量は十分であった。ポジティブコントロールとして、オートファゴソームとリソソームの融合阻害及びリソソームの ATPase 阻害剤である Bafilomycin を用いた。Bafilomycin 処理でも、ビーズの取り込み量自体には影響はなかった。

用いる細胞数だが、これは回収したビーズからどれくらい脂質が抽出できるかを指標に検討を行った。脂質の抽出は全脂質抽出方法である Bligh&Dyer 法を用い、脂質量の測定は、リン脂質に含まれるリンの量を定量することで行った。しかしながら、回収したビーズの量をいくら増やしても、リンの量を検出することができなかった。同じサンプルでタンパク量を測定すると、高濃度のタンパク質が検出されることから、ビーズ画分の回収はうまくいっているものと思われる。15cm ディッシュ 15 枚程度からビーズを回収してもリン量は検出できなかった。一方で、ビーズではなく、細胞抽出液から Bligh&Dyer 法により脂質を抽出した後、リンの定量を行ったところ、相当量のリンが検出されたことから、脂質抽出やリンの定量アッセイの手技には問題ないと思われる。また、細胞株を変えても同様な結果だった。このことに関して、共同研究先の新井先生および有田先生に相談したが、リンの量が検出できない明確な理由はわからずじまいだった。本画分にリン脂質が含まれないというのは考えにくい、とりあえず質量分析で解析してみるという判断に至った。

(2) 脂質成分解析

我々の所属する大阪大学医学部にて、細胞からのビーズ回収及び脂質抽出 (Wild-type、

FIP200 ノックアウト、Wild-type + Bafilomycin 処理；全て HeLa 細胞、各サンプル 15cm ディッシュ 10 枚) を行い、そのサンプルを東京大学もしくは理化学研究所へ送付した (その際、一部タンパクを採取し、イムノプロット等で Atg タンパクが検出されることを確認)。送付した場所にて、サンプルの一部を用いて質量分析機で解析した。その結果、脂質のピークがほとんど観測されなかったが、アプライ量を増やしていくと唯一検出されたのがジアシルグリセロール (DAG) だった。DAG とオートファジーとの関連を示す報告は幾つかあるものの、オートファゴソーム膜が DAG のみで形成されている可能性は極めて低いことが考えられた。また、オートファゴソーム膜にアンカーしている LC3-II は、少なくともフォスファチジルエタノールアミン (PE) と結合することで膜にアンカーできることが示されているため、PE が検出されないことは、オートファゴソーム膜の脂質の検出が機能していないことが予想された。これらのことから、ビーズの回収方法 (オートファゴソームの回収方法) もしくは脂質の抽出に問題があると考えられた。本結果は、ビーズ画分でリンの定量が検出限界以下であったことと一致する。

次に、リンの定量で検出可能なレベルの画分を得るため、細胞数並びにビーズの添加量を増やし、再度脂質抽出を行ったが、やはり結果はネガティブであった。細胞株を変えても同様な結果だったことから、細胞を破碎しビーズを回収する際に何かしらの原因で脂質が剥離 (ただしタンパク質は付着) してしまったのではないかと考えている。

以上から、本研究課題ではビーズを含んだ大量のオートファゴソームを回収する条件を見出すことに成功したものの、肝心の脂質の検出ができなかった。前述したが、問題は「細胞を破碎後、ビーズを回収する時間が長いこと」であると思われる。ビーズの回収方法は比較的簡単とはいえ、細胞を破碎した後、スクロースの密度濃度勾配を用いた超遠心を 1 時間程度行わなくてはならない。その 1 時間の超遠心が、ビーズから脂質成分を剥離している可能性もある (しかし、タンパク成分は残存していることはすでに調査済みであるので、何故脂質のみが剥離するのか極めて不思議である)。この 1 時間をいかに短縮するかが今後の課題である。今後は、細胞破碎後のビーズの回収時間をより短時間とするため、磁気ビーズを用い検討するなど、ビーズの回収の方法を改善し、脂質が検出可能なレベルにしたいと考えている。オートファゴソーム膜の脂質成分解析は、まだ未解明なオートファジーマシナリーの根本的な問題を解決すると思われるため、本研究期間内で判明した問題を早急に解決し、脂質成分解析を実行する予定である。

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2件)

1. Selective autophagy: lysophagy.
Hasegawa J, Maejima I, Iwamoto R,
Yoshimori T. *Methods*. 75: 128-132
(2015)
2. Phosphatidylinositol 4-phosphate in
the Golgi apparatus regulates cell-cell
adhesion and invasive cell migration in
human breast cancer.
Tokuda E, Itoh T, Hasegawa J, Ijuin T,
Takeuchi Y, Irino Y, Fukumoto M,
Takenawa T. *Cancer Res*. 74:
3054-3066 (2014)

〔学会発表〕(計3件)

1. 第66回日本細胞生物学会大会(2014年
6月11-13日、奈良)
若手最優秀発表賞選考会、ポスター
「神経細胞におけるイノシトールリン
脂質とオートファジー」長谷川 純矢、
吉森 保
2. Keystone Symposia
Autophagy: Fundamentals to Diseases
(May 23-28, 2014, Austin, Texas,
USA)
Poster
「Inositol polyphosphate 5-
phosphatase INPP5E regulates
autophagy in neural cells」
Junya Hasegawa, Tamotsu
Yoshimori
3. 第57回日本脂質生化学会(2015年5月
28,29日、東京)
シンポジウム「New comers in lipid
biology」
「イノシトールリン脂質とオートファ
ジー」長谷川 純矢

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 純矢 (**HASEGAWA JUNYA**)

大阪大学 生命機能研究科・助教

研究者番号: 00533788

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: