

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04371

研究課題名(和文)オートファジーにおける膜形成過程の統合的理解と制御剤探索

研究課題名(英文) Mechanistic insight into how the autophagosomes form and searching for the drug regulating autophagy

研究代表者

濱崎 万穂 (Hamasaki, Maho)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30455216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞された大隅良典先生が見つけられたオートファジーは、細胞が飢餓など非常事態に陥った際に生き延びようとするための機構である。例えば、細胞が飢餓に陥ると、その場を生き延びるために細胞質やオルガネラなどの一部を分解し再利用して必要なものを作り出すことで生き延びる。その際に、直径1μmのオートファゴソームというオルガネラにより行われる。オートファジーの本格的な研究が始まって20年強経つが、未だに緊急事態にできるこのオルガネラがどうできてくるのか詳細なメカニズムがわかっていない。本課題では細胞内でどのようにオートファゴソームが作り出されるのか、多面的に解析をする。

研究成果の概要(英文)：Autophagy, found by Dr. Ohsumi who won the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine, is a cellular degradation system that can be induced by stress such as starvation. When cells are starved, part of cytosol and organelles are degraded and recycles to survive by forming organelles called "autophagosomes". Autophagosomes have a diameter of 1μm and do not always exist in the cell, they forms when degradation is required. It has been over 20 years since autophagy related genes were identified yet how the autophagosomes are formed is unclear. Aim of this research is to characterize how the autohpagosome forms in detail.

研究分野：細胞生物

キーワード：オートファジー 小胞体 ミトコンドリア 薬剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

細胞内大規模分解系であるオートファジーは、発生、癌、神経変性疾患や感染症の抑制など様々な疾患に関与することが明らかになってきた。オートファジー誘導時に分解ターゲットを包み込む膜オルガネラ、オートファゴソーム、が形成されるがその形成過程の詳細はまだ明らかになっていない。必要時に突如できるオートファゴソームの膜形成機構は細胞生物学的にも非常に興味深く、小胞体やミトコンドリア等他のオルガネラの関与が明らかとなってきたことで、多面的なアプローチでなにか起こっているか解析が進められる状況となった。

2. 研究の目的

本研究計画では、我々が明らかにしたオートファゴソーム形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位であることを受け、なぜそこで起こるのか、どういう機構で膜形成が起こるのかを解明するため、統合的な解析を展開することで、膜形成の詳細を明らかにすることを目的とした。また、多様な疾患との関わりがわかってきた今、オートファジーを制御する薬剤の単離は急務であると考え遂行した。

3. 研究の方法

(1) 小胞体・ミトコンドリア接触部位は生化学的に単離が可能なので、単離しマス解析にかけ、形成場がなぜそこでできるのかの謎に迫るために新規関連因子の同定を行い、解析した。同様に小胞体からの輸送がオートファゴソーム形成に必要だということを以前報告しているので、輸送に関わる因子からオートファジーに関係するものの同定を試みた。

(2) 形成場の詳細構造の解析のため、CLEM (correlative light and electron microscopy) 法を用いて解析を試みた。

(3) オートファジーを制御する薬剤のスクリーニングから候補に挙がっているものが本当に効果があるのか様々なオートファジーアッセイを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小胞体・ミトコンドリア接触部位から

単離された候補因子はいくつも取れており、小胞体に影響を及ぼすものや TFEB に影響を及ぼすものなど様々であった。詳細な影響や作用機序を現在解析中である。

小胞体からの輸送に必要な因子の中からオートファジーに影響を及ぼすものをスクリーニングした結果、幾つかの候補が上がっているが、その中の一つをノックダウンすると、上流のオートファジー関連因子 (Atg) がオートファゴソーム形成初期構造に來られなくなることがわかった。Atg はほとんどが細胞質に局在し、飢餓などオートファジーが誘導された時に形成場にきて小さなドットになるが、どのように連れて來られるか謎であった。こ

の新規候補因子により、オートファゴソーム形成の最初に必要な Atg を連れてくる可能性がでてきた。その因子のノックダウンではオートファジーは抑制され、その後に必要な Atg も來られなくなっていた。新規候補因子は酵素活性を持っており、その酵素活性を潰すとノックダウンと同様の結果が得られたことから、その酵素活性が大事であることが明らかとなった。

現在、詳細をつめているところである。

また、どういった小胞体がオートファゴソーム形成に必要なかも調べた。オートファゴソームは曲率を好むようで、小胞体の中でもトライポッドを作っているジャンクションで形成が行われていることが明らかとなった。そのジャンクションが保たれないと、正常なサイズのオートファゴソーム形成も行われなことがわかってきている。詳細をつめ報告できる状態にする予定である。

(2) オートファゴソームは細胞質やオルガネラを包み込み分解する経路だと紹介したが、形成される数としてはそれほど多くない。また、オートファゴソーム自身は直径 1um ほどで、細胞質をやみくもに探すのは困難である。蛍光タンパク質を Atg につけることで、形成場の観察はできるが、蛍光顕微鏡の分解能が 100-200um なので、他のオルガネラとの詳細な関係など、オートファゴソーム膜が形成される詳細の観察は難しい。膜自身を観察するには、電子顕微鏡の分解能が必要である。そこで、この二つの利点を組み合わせたのが、CLEM 法になる。蛍光顕微鏡で観察した場所を電子顕微鏡で観察することができる。

まずは CLEM 法を確立する必要があったので、オートファゴソーム膜上に局在する LC3 で観察を行った。結果として、LC3 がドットになっている箇所を電子顕微鏡で捉えられ、脂質2重膜を2つもつオートファゴソームを観察できたが、問題点も出てきた。それは、オートファゴソームは最終的に分解酵素をもつリソソームと融合するので、リソソームライクな構造体もみえてしまった。他の Atg で試しても同じだった。運ばれる量が少なくてであろうと思われる以前に報告した小胞体・ミトコンドリア接触部位に局在する Atg14 と Syntaxin17 で行った結果、オートファゴソーム、オートリソソームを捉えることができた。ただ、少しリソソームにも運ばれるのか、100% 観察したところがオートファゴソームという確立には至らず、改善が必要となる。電子顕微鏡の切片を作った後の染色などのステップで、どうも消失していた蛍光が戻る、というのが問題なので、GFP など一度消失したら蛍光が PH が戻っても戻らないような蛍光タンパク質が必要となりそうだと考えている。CLEM 法自身は分解コンパートメントでなければきちんと相関できているので問題ないかと思う。オートファゴソーム形成初期の膜構造体を観察したいので、脂質2重膜が2層ある構造体、のようなわかりやすいものではなくするため、相関効率が上がらないとどの構造体が本物かわからないので、早急に解決したいと考えている。この方法は非常に有用なので、初期構造、小胞体との関係を明らかにするために今後も続ける。

(3)オートファジー活性を促進するもの、抑制するものを我々のもつオートファジー活性を測定する方法で大阪大学の薬剤ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

これまでに使われている促進剤 Torin や抑制剤パフィロマイシンを指標にした。その結果、それらと同等かそれ以上に効果がありそうな薬剤の候補がいくつか取れてきた。現在オートファゴソーム初期形成に必要なAtgらの局在をみて解析を進めている。

それとは別に、理研の長田先生との共同研究で、Atg16 に特異的にくっつく薬剤のスクリーニングを以前行い、その候補が取れてきていた。その薬剤をかけると、LC3-II が異常に溜まることわかった。それは、オートファゴソームの分解が阻害されて溜まっているのではなく、LC3-IIがオーバープロダクションされていることがわかった。薬剤を使っても通常のオートファゴソーム形成は阻害されるわけではなく、LC3-II だけが異常に溜まる。興味深いことに、溜まっている場所はゴルジと綺麗に共局在した。薬剤をかけた後に wash-out した結果、ゴルジの溜まりは解消されオートファゴソームが形成されたことから、溜まった LC3-II はデッドエンド構造ではなくファンクショナルであると考えている。LC3-IIは細胞質局在型である LC3-I が脂質修飾をうけて膜結合型の LC3-II になるのだが、どこでその修飾が行われるのか明らかにされていなかった。薬剤を用いた研究からその修飾サイトが明らかになったかもしれない。現在論文投稿準備中である。

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 6 件)

1. Ubiquitination of exposed glycoproteins by SCF^{FBXO27} directs damaged lysosomes for autophagy. Yoshida Y, Yasuda S, Fujita T, Hamasaki M, Murakami A, Kawawaki J, Iwai K, Saeki Y, Yoshimori T, Matsuda N, Tanaka K. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 8;114(32):8574-8579
2. Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of Streptococcus pyogenes. Lu SL, Kawabata T, Cheng YL, Omori H, Hamasaki M, Kusaba T, Iwamoto R, Arimoto H, Noda T, Lin YS, Yoshimori T. PLoS Pathog. 2017 Jul 6;13(7):e1006444
3. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. Yamashita SI, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, Yoshimori T, Sakai Y, Mihara K, Kanki T. J Cell Biol. 2016 Dec 5;215(5):649-665

4. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Hepatology. 2016 Dec;64(6):1994-2014
5. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, Noda T, Yoshimori T. J Cell Sci. 2016 Oct 15;129(20):3781-3791
6. Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome. Hasegawa J, Iwamoto R, Otomo T, Nezu A, Hamasaki M, Yoshimori T. EMBO J. 2016 Sep 1;35(17):1853-67

[学会発表](計 17 件)

1. Kentaro Yamamoto, Ryohei Miyoshi, Tamio Saito, Hiroyuki Osada, Junya Hasegawa, Tamotsu Yoshimori, Maho Hamasaki, Chemical activation of LC3 conjugation system uncover the new insight of LC3 lipidation site, Gordon Research Conference, Italy (2018.3.20)
2. Maho Hamasaki, 18 years in autophagy: mechanistic insight of canonical autophagy and lysophagy, IBP CAS, 中国 (2018.3.14)
3. Kentaro Yamamoto, Ryohei Miyoshi, Tamio Saito, Hiroyuki Osada, Junya Hasegawa, Tamotsu Yoshimori, and Maho Hamasaki. Chemical activation of LC3 conjugation system uncover the new insight of LC3 lipidation site. Gordon Research Conference "Autophagy in Stress, Development and Disease", Lucca, Italy (2018.3.18-23)
4. 濱崎 万穂, ゼノファジーとリソファジー。オートファジーの解析法と最新の話。第 33回 Wako ワークショップ, 東京 (2017.11.16)
5. 濱崎 万穂, 生活習慣病とリソファジー, 第 2 回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会 (2017.9.6)
6. Hamasaki M, Teranishi H, Ueda H, Oe Y, Nezu A, Yoshimori T. Characterization of membrane trafficking in autophagy and mechanistic insights into lysophagy. 第 69

- 回日本細胞生物学会大会. 仙台国際センター, 仙台 (2017.6.14).
7. 濱崎 万穂, オートファジーってなんだ?、市民公開セミナー、東京 (2017.1.15)
 8. 濱崎 万穂, 寺西 宏文, 吉森 保, 意外と大事なリソファジーの意義とメカニズム. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜 (2016.11.30)
 9. Maho Hamasaki, Hiroyuki Ueda, Yukako Oe, Akiko Nezu, Tamotsu Yoshimori, Autophagosomes formation takes place at ER-Mitochondria contact sites. EMBO Workshop “Organelle contact sites: Intracellular communication and role in disease”. Chia, Italy (2016.9.17).
 10. 濱崎 万穂, 大江 由佳子, 上田 洋行, 今井 健太, 根津 亜希子, 吉森 保, 小胞体におけるオートファゴソーム形成のイメージング解析、第68回日本細胞生物学会大会,京都(2016.6.17)
 11. 濱崎 万穂, オートファジー ～生命を支える細胞内大規模分解系の分子機構と疾患における役割～、第20回 大阪小児骨系統疾患研究会 (2016.2.20)
 12. M. Hamasaki, H. Teranishi, I. Maejima T. Yoshimori, Lysophagy: novel selective autophagy eliminating damaged organelles and suppressing diseases. . 2015 cell biology ascb annual meeting: Minisymposium 15: Endo-Lysosome Trafficking in Development and Disease. Sandiego, USA (2015.12.15).
 13. Maho Hamasaki, Correlative studies on autophagy proteins using 3D electron microscopy with precise spatial information. JST CREST-PRESTO joint international symposium, Structural Biological Dynamics: From Molecules to Life with 60 trillion Cells. Tokyo (2015.11.5)
 14. Maho Hamasaki, Insight into the molecular mechanism and the role of autophagy, IRB Spain (2015.9.16)
 15. 濱崎 万穂, 吉森 保, オートファジー～生命を支える細胞分解系の分子機構と疾患における役割～. 第34回日本糖質学会年会、東京(2015.8.2)
 16. Maho Hamasaki, The study on the autophagosome formation site. MRC Laboratory of Molecular Biology. Cambridge, UK (2015.4.22)
 17. 濱崎 万穂, 光顕で観察した部位を電顕でみてみよう～ナノスケール CLEM 法の紹介～. 大阪大学 共同研機器分析セミナー . 大阪 (2015.4.16)
- [図書](計 0 件)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/>
6. 研究組織
 - (1)研究代表者
濱崎万穂(HAMASAKI, Maho)
大阪大学,生命機能研究科,准教授
研究者番号:30455216