

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18489

研究課題名(和文)オートファゴソーム膜形成ダイナミクスの四次元トモグラフィー解析

研究課題名(英文)Analysis of dynamics of autophagosome formation by electron tomography

研究代表者

垣花 太一 (Kakihana, Taichi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：60746907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜オルガネラであるオートファゴソームは小胞体とミトコンドリアの接触部位から膜形成されることやゆりかご構造の小胞体に近接して形成が観察されていた。そこで、小胞体膜形態形成を担う分子とオートファゴソーム形成の関係に着目した。小胞体形態形成分子とオートファジーとの関係を固定試料や生細胞を用いて解析した結果、候補分子を絞ることに成功した。今後、結果を論文として報告したい。

研究成果の概要(英文)：Autophagosome is known to be formed at mitochondria associated ER membrane and cradle structure of ER was observed nearby. This time we attempted screening of ER shapers in autophagosome formation. As a result, we succeeded in hitting a candidate. Therefore, we are now preparing to report our findings.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 小胞体

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物に普遍的に存在する細胞内大規模分解システムであり、飢餓時には激しく誘導され生存に必要な栄養源確保を行うことが最も良く知られているが、最近の研究から発生・分化から、がん、神経変性、糖尿病等の抑制まで多岐に亘る機能を持つことが分かってきた。我々は、早くからは乳類オートファジーの膜動態の分子基盤解明を進め、オートファゴソーム形成の場がミトコンドリアと小胞体の接触部位であること(Nature, 2013)や、オートファゴソーム膜形成の場でゆりかご構造の小胞体を観察していた(Nat Cell Biol, 2009)。一方で、オートファゴソーム膜形成の足場となる小胞体の、膜形態形成や動態がいかに関与するかは全く未知であった。

小胞体膜形態形成を担う小胞体膜タンパク質が近年複数報告され、小胞体膜に特徴的な編み目構造とシート構造が相互に動的に変化することによって維持されていることが明らかとなってきた。Climp63 は、小胞体内腔側にもつコイルドコイルモチーフを介してホモ二量体を形成することで、粗面小胞体に豊富なシート状の小胞体構造形成を担う(Cell, 2010)。一方、Reticulon-4A は、小胞体膜の湾曲形成を促進することで滑面小胞体に見られるチューブル状構造形成やシート状小胞体膜の縁部の湾曲維持を担う(Cell, 2006)。最後に Atlastin1 は、サイトゾル側に GTP 結合モチーフをもち、GTPase 活性とホモ二量体形成能に依存して小胞体膜同士の間でホモ典型的な膜融合を促し、チューブル状小胞体膜同士を結ぶネットワーク構造の形成を担う(Cell, 2009、Nature, 2009)。

表 小胞体形態形成分子の機能

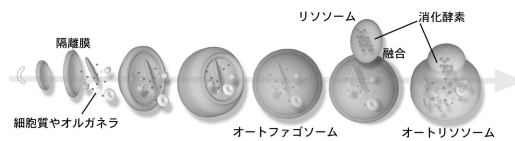
形態形成分子	形成構造	模式図
Climp63	シート 	
Reticulon4 A	チューブル シートの縁部 	
Atlastin1	チューブル同士の結合 	

2. 研究の目的

細胞内大規模分解システムであるオートファジーは、膜オルガネラであるオートファゴソームの膜形成から駆動するダイナミックなシステムである(図1)。オートファジーの分子メカニズムに関しては多くの知見が得られているが、オートファゴソーム膜形成初期の膜動態は限られた瞬間のイベントであるため、これまでは技術的な限界から不可能と考えられてきた。

本研究計画では、研究室で所有する最新の光学顕微鏡とトモグラフィー電子顕微鏡を用いて、膜構造の形成開始から成熟までをナノスケールで三次元的かつ経時的に追跡することを目的とした。さらに、最近我々は、オートファゴソーム膜形成が行われる小胞体の形態的特徴を新規に見出すことができた。そこで、小胞体を中心とするオルガネラ形態ダイナミクスがオートファジーを制御するという全く新しい制御メカニズムを明らかにすること、さらに、オートファゴソーム膜形成の場である小胞体の形態を明らかにすることで、オートファゴソーム膜形成初期の微細な構造解析が可能になると考え、研究の目的とした。

図1. オートファジーの模式図



3. 研究の方法

(1)小胞体形態形成分子発現の条件検討

小胞体形態形成を担う分子を発現するプラスミドを導入することで、人工的に小胞体の形態改変した細胞を作成する。個々の小胞体形態形成分子について、過去の知見と一致する結果を再現できるように発現量などの条件検討をおこなう。

(2)小胞体形態形成とオートファジー分解標的の同定

小胞体形態改変細胞を用いて、オートファジー活性への影響を評価する。評価方法は、隔離膜マーカーである ATG5 の輝点の顕微鏡観察、ウェスタンブロッティングによるオートファジー分解基質の分解量の定量、選択的オートファジー分解基質を用いた分解速度の定量である。

4. 研究の成果

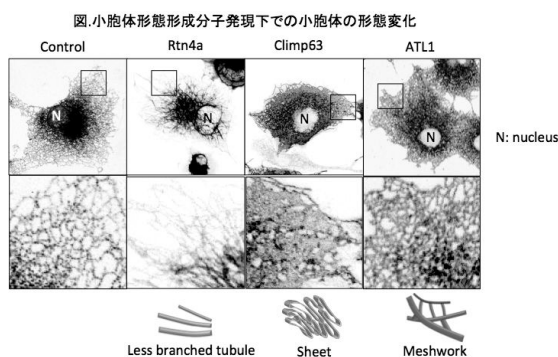
(1)小胞体形態形成分子発現の条件検討

小胞体形態形成分子の発現量依存的に、小胞体の形態を人工的に改変する実験系を構築した。ほ乳類細胞である COS7 細胞に対して、各種小胞体形態形成分子のプラスミド (Mock, Climp63, Reticulon-4A, Atlastin1) を導入した。形態変化を Wide-Field 蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、過去に報告された形態変化の表現型を再現することができた(図2)。

(2)小胞体形態形成とオートファジー分解標的の同定

隔離膜マーカーである YFP-ATG5 の安定発現 COS7 細胞株を用いて、小胞体形態形成

分子発現プラスミド導入によって小胞体形態を人工的に改変し、栄養飢餓処理後固定し



た。得られた細胞を上述の蛍光顕微鏡下で観察し、YFP-ATG5 の輝点の一細胞当たりの数を定量することで、小胞体形態形成によるオートファゴソーム膜形成活性への効果を評価した。その結果、Atlastin1 発現細胞で YFP-ATG5 輝点数が増加すること、Reticulon-4A 発現細胞では、Mock とほとんど同程度、Climp63 発現細胞では輝点の減少が見られた。このことから、オートファゴソーム膜形成へ小胞体形態や動態が影響を与えることが示唆された。

続いて、一連の小胞体形態分子発現プラスミドをヒト培養細胞である HEK293A 細胞へ導入し、通常培地もしくは栄養飢餓培地培養下で、リソソームの ATPase 阻害剤 BafilomycinA1 存在 / 非存在下で 2 時間処理し、ウェスタンブロッティングによりオートファジーの活性を LC3-II や p62 の蓄積により評価した。その結果オートファジー活性は、Climp63 発現細胞で減少、Reticulon-4A 発現細胞で増大、Atlastin1 発現細胞では Mock 細胞と同等であった。この結果は YFP-ATG5 の輝点形成を評価した結果と異なる。その理由として、小胞体形態変化をもたらすオートファジー活性への効果は、オートファジー全体というより、選択的なオートファジー基質の分解に関与しているのではないかと考えた。

オートファジーには、細胞質成分を非選択的に分解するオートファジーとユビキチン化タンパク質やミトコンドリアなどを選択的に分解する選択的オートファジーが存在することから、選択的オートファジーへの小胞体形態形成分子の影響も評価する必要があった。特に、最近の知見から、小胞体形態形成に関わる FAM134B が、小胞体そのものを分解する選択的オートファジーの一つである ER-Phagy を誘導することが明らかとなっていた (Nature, 2015)。

そこで、我々が解析を行ってきた分子に加え、幾つかの小胞体形態分子について、選択的オートファジーへの関与について、解析を行った。その結果、これまで報告のない分子で、選択的オートファジーに関わる分子を同定することができた。その分子について、ノックアウト細胞やノックダウン実験の系を

構築することに成功し、過剰発現下とは逆の結果を得ることができた。その分子がオートファゴソームマーカーである LC3 や PI3 Kinase 複合体の構成分子である ATG14L の輝点とよく共局在することを観察することができた。また重要なことに、選択的オートファジーの促進とは対照的に、飢餓誘導性のオートファジーの活性にはほとんど影響は見られなかった。このことから、選択的オートファジーを特異的に促進していることが示唆された。

以上の結果から、小胞体膜形態形成分子が飢餓誘導オートファジーや選択的オートファジーの活性調整に関与することを示唆する結果を得ることができた。これらの結果を論文としてまとめ報告するとともに、より詳細な特徴を解析するために、トモグラフィ CLEM (光電子相関顕微鏡法) 解析などを行い、明らかにしたいと考えている。

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)

Janine Kirstein, Daisuke Morito, Taichi Kakihana (Co-First author), Munechika Sugihara, Anita Minnen, Mark S Hipp, Carmen Nussbaum Krammer, Prasad Kasturi, F Ulrich Hartl, Kazuhiro Nagata, Richard I Morimoto

“Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments”

The EMBO Journal (2015) 34, 2334-2349
DOI 10.15252/embj.201591711

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣花 太一 (KAKIHANA, Taichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60746907

(2)研究分担者

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者