

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15056

研究課題名(和文)脂質ドメイン形成の情報伝達機序および生理的意義の解明

研究課題名(英文) Study of signal transduction and physiological role for the formation of lipid domains

研究代表者

藤田 秋一 (Fujita, Akikazu)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：60282232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：全ての生物は細胞から出来ている。細胞は主に蛋白質、脂質、糖および遺伝子から構成されている。最近の分子生物学の飛躍的な発展により、DNA・RNAと蛋白質についての知見は急速に増加している。しかしながら、生体膜を構成する主成分である膜脂質(脂質二重層)に関しては有力な解析技術が少ないために、まだまだ未知の点が多く残されている。私たちは脂質を観る新たな技術(QF-FRL法)を開発し、電子顕微鏡を用いて生体膜における微細構造レベルでの膜脂質の分布解析を可能にした。QF-FRL法を用いることにより、ホスファチジルイノシトール4リン酸が物質代謝に重要なオートファジーで重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは脂質を観る新たな技術(急速凍結・凍結切断レプリカ標識法)を開発し、電子顕微鏡を用いて生体膜における微細構造レベルでの膜脂質の分布解析を可能にした。この技術は膜脂質の機能解明に大きく貢献し、生命機能解明への新たなアプローチを提供できると考えている。さらにこのアプローチによりもたらされた知見は、脂質代謝異常をはじめ様々な疾患の原因や病態の解明に役立つものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns(4)P) itself has been found to serve as an essential signalling molecule in the cell organelles where it is involved in the control of membrane trafficking, and signal transduction pathways, via direct interaction with PtdIns(4)P-binding protein. To completely understand the autophagy, it is important to determine the localization of PtdIns(4)P in the autophagosome. To analyze the distribution of PtdIns(4)P at a nanoscale, we employed the quick-freezing and freeze-fracture replica labeling (QF-FRL) method. We found that the localization of PtdIns(4)P in the luminal leaflet in the biological membrane. We also showed using mutant yeast cells that PtdIns 4-kinases Pik1p and Stt4p have essential roles in the autophagosome formation and autophagosome-vacuole fusion in yeast, respectively.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質 脂肪 微細局在 電子顕微鏡 オートファジー 酵母 急速凍結 凍結切断

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜には数千種類にも及ぶ脂質分子が存在し、非対称で不均一な分布を示すことが提唱されている。特に細胞を形つくる細胞膜は、細胞外から細胞内への情報の伝達に重要な役割を担い、細胞内情報伝達の中心的な働きをされると考えられている。また、各細胞内小器官でも独自の脂質組成を保っていることが知られ、それぞれの細胞内小器官での、時間的、空間的な各小器官のダイナミックな活動を反映していると考えられている。しかしそのような膜脂質分布・動態の生理的意義、種々の病態との関わりについてはあまり理解が進んでいない。その大きな原因が膜脂質解析法の不備にあると考えられる。

2. 研究の目的

我々は上記の問題点を克服し、脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の非対称性分布、不均一分布の意義を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (Quick-freezing & freeze-fracture replica labeling method: QF-FRL) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示してきた。本研究では QF-FRL 法の利点を最大限に生かし、その適用範囲を飛躍的に拡張する技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

最近、細胞内の物質代謝に重要な役割を担う自食作用 (オートファジー) に、ホスホイノシチドの PtdIns(3)P が必須であることが示されている。そこで、本研究では、同じホスホイノシチドである PtdIns(4)P およびその産生に関与するリン酸化酵素である PtdIns 4-kinase のオートファジーにおける酵母細胞での役割について解析を行った。

酵母には野生株 SEY6210 を用い、YPD 培養溶液内、30 °C で培養した。オートファジーの誘導は、窒素源を取り除いた培養溶液 (SC(-N)) で 5 hr 培養を行なった。

4. 研究成果

(1) PtdIns(4)P を標識するためのプローブの樹立

Phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns(4)P) の標識には、Eschelon 社の抗 PtdIns(4)P 抗体を用いた。抗 PtdIns(4)P 抗体の PtdIns(4)P への特異性は、各種ホスホイノシチドを含むリポソームのレプリカを用いて確認した (図 1)。抗 PtdIns(4)P 抗体は主に PtdIns(4)P に結合するが、PtdIns(4,5)P₂ にも結合することがわかった。PtdIns(4,5)P₂ への非特異的結合を抑制するために、PtdIns(4,5)P₂ に特異的に結合する Phospholipase C (PLC) δ の PH ドメインを用いた。つまり、PLCδ1-PH ドメインであらかじめブロッキングすることにより、PtdIns(4,5)P₂ への非特異的結合を抑制することを試みた。あらかじめ PLC δ1-PH ドメインを処置した PtdIns(4,5)P₂ を含むリポソームでは抗 PtdIns(4)P 抗体の非特異的結合は十分抑制することがわかった (1)。以下の実験では、抗 PtdIns(4)P 抗体の標識を行う時は、PLC δ1-PH ドメインでブロッキングして行うことにより PtdIns(4)P の特異的標識を観察することとした。

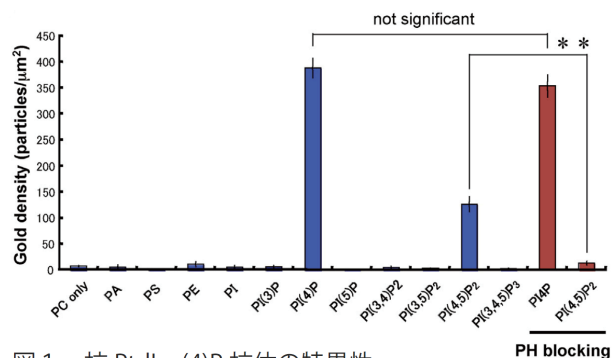


図 1 抗 PtdIns(4)P 抗体の特異性
各種ホスホイノシチドを含むリポソームにおける
標識密度の比較

(2) 酵母オートファゴソームにおける PtdIns(4)P の微細局在

SC(-N)培養溶液で 5 hr 培養した酵母のレプリカ標本では、細胞質内に多くのオートファゴソームと液胞内にオートファジックボディーが観察された。こ

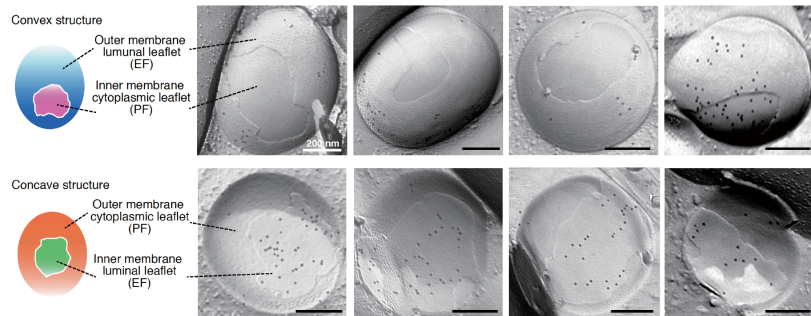


図2 酵母のオートファゴソームにおける PtdIns(4)P の局在

これらの構造はオートファジーを誘導していないコントロールの酵母では観察されなかった。オートファジー誘導細胞のレプリカを抗 PtdIns(4)P 抗体で標識すると、哺乳類培養細胞 Huh7 細胞 (2) のオートファゴソームとは異なり、二重膜の内膜と外膜共に、PtdIns(4)P の標識は主に外葉に局在することがわかった (図2)。

(3) 酵母オートファジーにおける PtdIns 4-kinase の役割

酵母には、PtdIns(4)P の産生に参与する酵素、つまり PtdIns 4-kinase (PI 4-K) が 3 つ存在する。それらは Pik1, Stt4, Lsb6 である。これらの PI 4-K の内、Pik1 および Stt4 では致死となるため温度感受性株を作成した。以下の実験では、これらのノックアウトあるいは温度感受性酵母株を作成することにより、オートファジーにおける PI 4-K の関与を検討した。Lsb6 をノックアウトした Lsb6 Δ 株では、オートファジー誘導によって野生株と同様にオートファゴソームとオートファジックボディーが観察された。しかし、Pik1 と Stt4 の温度感受性株 (Pik1^{ts} と Stt4^{ts}) では、38 °C で培養した状態、つまり Pik1 および Stt4 の酵素活性が抑制した状態では、両 PI 4-K 共にオートファジーが抑制された。オートファジーを誘導したそれぞれの株のレプリカを電子顕微鏡で観察したところ、26 °C で培養した正常な酵素活性を示す Pik1^{ts} および Stt4^{ts} 株においては、オートファゴソームとオートファジックボディーが野生株と同様に観察された。一方、38 °C で培養した Pik1^{ts} 株では、オートファゴソームおよびオートファジックボディーは全く観察されなかった。これに対して、38 °C で培養した Stt4^{ts} 株においては、オートファゴソームは観察されたものの、オートファジックボディーはほぼ完全に

観察されなかった (図3)。これらのことから、酵母が持つ PI 4-K の内、Pik1 はオートファゴソームの形成に、Stt4 はオートファゴソームと液胞の融合に参与することが示唆される。

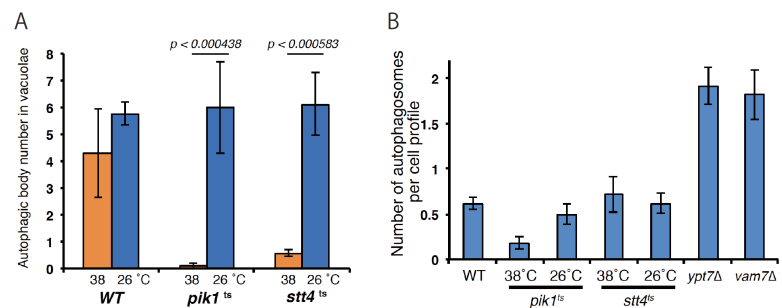


図3 酵母のオートファジーにおける PtdIns 4-kinase の役割

本研究では、酵母のオートファジーにおいて、PI 4-K の Pik1p および Stt4p が必須の役割を担うことが明らかになった。さらには、Pik1p はオートファゴソームの形成に、Stt4p はオートファゴソームと液胞の膜の融合に参与することが示唆された。これらの

ことは、遺伝子の解析だけでなく、QF-FRL法という免疫電顕法を併用することにより明らかとなった。我々の開発してきたQF-FRL法が、オートファジーの機序解明に向け大きな役割を担うと考えられる。

<引用文献>

(1) Yoshida, A., Shigekuni, M., Tanabe, K. and Fujita, A. Nanoscale analysis reveals agonist-sensitive and heterogeneous pools of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1858, 1298-305, 2016. 【査読有】

(2) Kurokawa, Y., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Hayashi, H., Tanabe, K. and Fujita, A. Phosphatidylinositol 4-phosphate on Rab7-positive autophagosomes revealed by the freeze-fracture replica labeling. *Traffic* 20, 82-95, 2019. 【査読有】

(3) Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., Fujita, A. Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* 1864, 1214-1225, 2019. 【査読有】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

(1) Tsuji, T., Cheng, J., Tatematsu, T., Ebata, A., Kamikawa, H., Fujita, A., Gyobu, S., Segawa, K., Arai, H., Taguchi, T., Nagata, S., Fujimoto, T. Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* in press, 2019. 【査読有】

(2) Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., Fujita, A. Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* 1864, 1214-1225, 2019. 【査読有】

(3) Kurokawa, Y., Yoshida, A., Fujii, E., Tomioku, K., Hayashi, H., Tanabe, K., Fujita, A. Phosphatidylinositol 4-phosphate on Rab7-positive autophagosomes revealed by the freeze-fracture replica labeling. *Traffic.* 20, 82-95, 2019. 【査読有】

(4) Tsuji, T., Fujita, A., Fujimoto, T. Immunoelectron Microscopy of Gangliosides. *Methods Mol. Biol.* 1804, 231-239, 2018. 【査読有】

(5) Tomioku, K.N., Shigekuni, M., Hayashi, H., Yoshida, A., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., Fujita, A. Nanoscale domain formation of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma and vacuolar membranes of living yeast cells. *Eur. J. Cell Biol.* 97, 269-278, 2018. 【査読有】

(6) Yoshida, A., Hayashi, H., Tanabe, K., Fujita, A. Segregation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into distinct microdomains on the endosome membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, 1880-1890, 2017. 【査読有】

(7) Yoshida, A., Shigekuni, M., Tanabe, K., Fujita, A. Nanoscale analysis reveals agonist-sensitive and heterogeneous pools of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858, 1298-1305, 2016. 【査読有】

〔学会発表〕(計 1件)

(1) 黒川夕奈、林宏樹、富奥甘奈、藤田秋一. オートファゴソームにおけるホスファチジルイノシトール4リン酸(PI(4)P)の微細局在. 第191回 日本獣医学会学術集会(つくば市).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。