

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03935

研究課題名(和文) 脂質分布ナノスケール解析技術確立による生体膜脂質トポロジー形成の生物学的意義解明

研究課題名(英文) Understanding the biological significance of the topological distribution of biological membrane lipids by the nanoscale lipid distribution analyzing technique

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内の物質代謝、特に飢餓時に重要な役割を担っている。オートファゴソームの形成と物質分解に関するリソソームへの融合はオートファジーの中心的役割を持ち、その形成および融合調節機序の解明はオートファジーの調節機構を明らかにする上で重要である。オートファゴソームの形成には、他の細胞内小器官と同様に脂質二重層が重要な働きをする。本研究では、オートファゴソームを形成する膜にイノシトールリン脂質の一つであるイノシトール4リン酸 (PI4P) およびホスファチジルセリンが特異的に局在し、オートファゴソームの形成にPI4Pを産生するPI 4-キナーゼが強く関与する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

自食作用(オートファジー)は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病など神経変性疾患や、癌、老化などに強く関与することが知られる。オートファジーの中心的機序を担うオートファゴソーム形成と物質分解に関するリソソームへの融合機構の解明は、オートファジー活性の調節の理解に大きな役割を担う。オートファゴソームの形成およびそれとリソソームへの融合機序には、脂質が特に重要な働きを担うと考えられている。本研究では、各種脂質の微細局在を検討することにより、オートファジーにおける各種脂質の役割を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：Autophagy has important roles to control the nutrient metabolisms in cell, especially while the cell starvation. The autophagosome formation and its fusion to the lysosome have essential roles for the autophagy and it must be important to interpretate their mechanisms for understanding the control mechanisms of the autophagy. The lipid bilayers are important for the formation of the autophagosome same as other intracellular organelles inside cell. In this study, we found that phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylserine were specifically localized in the membrane of the autophagosome in mammalian and yeast cells and phosphatidylinositol 4-kinases were involved in the formation of the autophagosome and the fusion to the lysosome/vacuole.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質 自食作用 電子顕微鏡 ナノスケール イノシトールリン脂質 微細局在 情報伝達機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜をはじめ、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官の構造の維持には、脂質二重層からなる生体膜が重要な役割を果たす。生体膜には多種多様な脂質分子が存在し、数千種類あると言われている。生体膜の膜脂質は、脂質二重層の内葉と外葉で異なる組成を示すこと、二次元的にも不均一で偏った分布を示す場合があることが提唱されている。しかし、このような膜脂質の非対称性分布や不均一分布は、ほとんどが生化学的手法あるいは人工膜を用いて解析されてきたものであり、実際生きた細胞において起こっているのかは不明な点が多く、その生物学的な意味はわかっていない。その最大の原因は蛋白質に比較して脂質を解析するための方法が極めて限られていることにある。

2. 研究の目的

申請者らは、生体膜での脂質の局在をナノスケールで明らかにすることが、膜脂質の非対称性分布、不均一分布の生物学的意義を解明するために不可欠であると考え、そのための方法の開発に努めてきた。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) によって膜脂質を物理的に固定し、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、生体膜、特に酵母細胞での自食作用 (オートファジー) に際し形成されるオートファゴソーム膜と、その結果、形成される液胞内でのオートファジックボディー膜における各種リン脂質の微細局在を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者らの研究成果を含め、現在までの検討により、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 および PtdIns(4)P が必須であることが示されている。そこで、本研究では、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および Phosphatidylserine (PtdSer) の酵母細胞での役割について検討を行った。

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。PtdSer の標識には QF-FRL 法を用いた。加圧凍結装置 (HPM010) および金属圧着法を用いることにより、培養した酵母細胞のペレットを急速凍結した。凍結した酵母細胞は、凍結切断装置 (BAF400) を使用することにより、酵母細胞のレプリカ標本を作成し、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および PtdSer の標識を行なった。

4. 研究成果

(1) PtdSer を標識するためのプローブの樹立

PtdSer に特異的に結合することが知られている Evcctin-2 の PH ドメイン (Evcctin-2-PH) を利用した。Evcctin-2-PH とグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) の融合蛋白質 (GST-Evcctin-2-PH) を *E.coli* 内に発現させ、常法により GST-Evcctin-2-PH を精製し、その特異性を各種リン脂質を含むリポソームのレプリカを用いて確認した。その結果、PtdSer を含むリポソームのレプリカのみの特異的な標識が見られたが、他のリン脂質を含むリポソームのレプリカにはほとんど

標識は確認できなかった(図1)¹。また、wild-typeの出芽酵母細胞では、細胞膜、小胞体膜、核膜、液胞膜、ミトコンドリア膜の細胞質側の leaflet (内葉) に GST-Evectin-2-PH の標識が確認できたが、PtdSer 合成酵素の Cho1p を欠損させた酵母細胞においては、GST-Evectin-2-PH の標識は確認できなかった¹。以上のことから、GST-Evectin-2-PH をプローブとして利用することにより、生体膜の PtdSer を特異的に標識できることが確認できた。

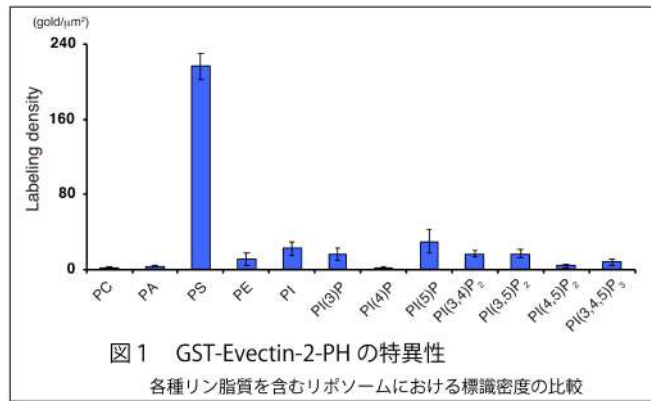


図1 GST-Evectin-2-PH の特異性
各種リン脂質を含むリボソームにおける標識密度の比較

(2) 酵母細胞のオートファジー誘導時のオートファゴソームにおける PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および PtdSer 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。以前の報告の通り、PtdIns(3)P および PtdIns(4)P はオートファゴソームの内葉と外葉の両方において、主に外葉に局在することが確認できた(図2)。一方、オートファジー誘導細胞のレプリカを GST-Evectin-2-PH で標識すると、オートファゴソームの二重膜の内葉と外膜共に、PtdSer の標識は内葉と共に外葉にも局在することがわかった(図2)。

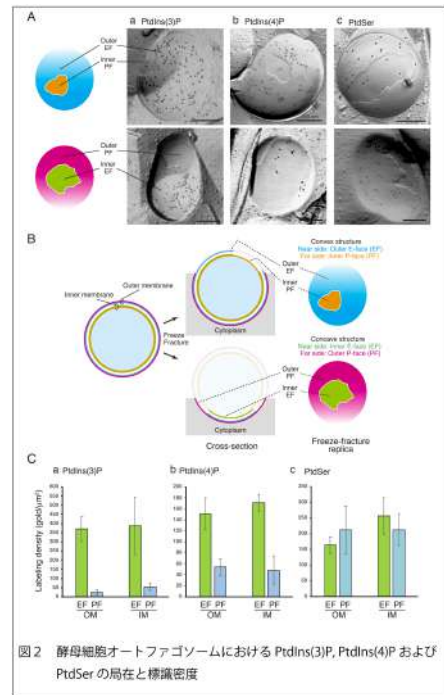


図2 酵母細胞オートファゴソームにおける PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および PtdSer の局在と標識密度

(3) 酵母細胞の液胞内のオートファジックボディーにおける PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および PtdSer の微細局在

オートファゴソームの外膜は液胞膜と融合し、内葉は液胞の管腔側に移動し、オートファジックボディーになる。以前の報告の通り、PtdIns(3)P はオートファジックボディーの外葉に主に局在した。一方、PtdIns(4)P はオートファジックボディーの内葉、外葉のどちらにも局在は見られなかった。また、PtdSer の標識はオートファジックボディーの内葉と外葉の両方に局在した(図3)。このことはオートファゴソームの内葉の内葉と外葉の両方に PtdSer が局在することとよく一致する。

一般的に、PtdSer は生体膜の内葉に局在することがわかっており、実際に本研究においても、wild-type の酵母細胞での PtdSer は、細胞膜、ゴルジ体、ミトコンドリア、液胞、小胞体を構成する生体膜で

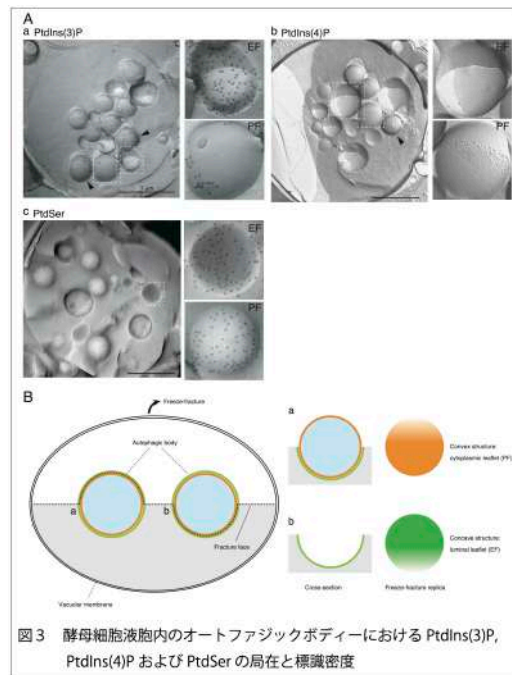


図3 酵母細胞液胞内のオートファジックボディーにおける PtdIns(3)P、PtdIns(4)P および PtdSer の局在と標識密度

は内葉に局在した。今回の実験で、PtdSer がオートファゴソームおよびオートファジックボディーでは内葉に加えて外葉にも局在することが初めて明らかとなった。今後、外葉に局在する PtdSer の生理的意義を検討する計画である。

<引用文献>

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.* 116, 13368-13373, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji Takuma, Cheng Jinglei, Tatematsu Tsuyako, Ebata Aoi, Kamikawa Hiroki, Fujita Akikazu, Gyobu Sayuri, Segawa Katsumori, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko, Nagata Shigekazu, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 116
2. 論文標題 Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13368 ~ 13373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1822025116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurokawa Yuna, Konishi Rikako, Yoshida Akane, Tomioku Kanna, Futagami Taiki, Tamaki Hisanori, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 1864
2. 論文標題 Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji Takuma, Fujita Akikazu, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Immunoelectron Microscopy of Gangliosides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 231 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8552-4_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurokawa Yuna, Yoshida Akane, Fujii Emi, Tomioku Kanna, Hayashi Hiroki, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4 phosphate on Rab7 positive autophagosomes revealed by the freeze fracture replica labeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Traffic	6. 最初と最後の頁 82 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tra.12623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa Yuna, Masatani Tatsunori, Konishi Rikako, Tomioku Kanna, Xuan Xuenan, Fujita Akikazu	4. 巻 152
2. 論文標題 Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 365 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01814-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomioku Kan-na, Shigekuni Mikiko, Hayashi Hiroki, Yoshida Akane, Futagami Taiki, Tamaki Hisanori, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 97
2. 論文標題 Nanoscale domain formation of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma and vacuolar membranes of living yeast cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 269 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2018.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Tomioku, K., Tanabe, K., Fujita, A.	4. 巻 1862
2. 論文標題 Microautophagy in the yeast vacuole depends on the activities of phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Biomembrane	6. 最初と最後の頁 183416-183416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konishi Rikako, Kurokawa Yuna, Tomioku Kanna, Masatani Tatsunori, Xuan Xuenan, Fujita Akikazu	4. 巻 100
2. 論文標題 Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151149 ~ 151149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2020.151149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa Yuna, Konishi Rikako, Tomioku Kanna, Tanabe Kenji, Fujita Akikazu	4. 巻 156
2. 論文標題 The distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the budding yeast plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-01989-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒川夕奈、林宏樹、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川夕奈、小西里可子、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 酵母および哺乳類オートファジーにおけるホスファチジルイノシトール 4 キナーゼの役割
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西里可子、黒川夕奈、富奥甘奈、藤田秋一
2. 発表標題 免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜における脂質分子の微細局在
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者詳細 - 藤田 秋一 - 鹿児島大学
http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100005509_ja.html

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
研究 分 担 者	叶内 宏明 (Kanouchi Hiroaki) (10351884)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	

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
---------	---------