

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15148

研究課題名(和文)植物型オートファゴソームのホスファチジル3リン酸分子イメージングと局在解析

研究課題名(英文)Molecular imaging of PI3P in the plant type autophagosome

研究代表者

大田 修平(Ota, Shuhei)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・特別研究員

研究者番号：20455926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー(ATG)は環境ストレスに応答する細胞内機構であり、真核生物において進化的に広く保存されている。オートファジー過程の上流においてはホスファチジルイノシトール3リン酸(PI3P)が重要な役割をもつ。酵母や哺乳類細胞での研究知見が蓄積されているが、藻類や植物における知見は限られている。本研究では、植物型オートファゴソームのPI3P分子の細胞内動態を明らかにすることを目的として、藻類細胞のPI3P分子の可視化系を確立し、間接蛍光抗体法、フリーズフラクチャー法、フローサイトメトリーによる細胞内動態および局在解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは細胞生物学や医学分野の主要なテーマとなり、近年、研究が加速的に進捗している。多くの研究ではモデル生物である酵母細胞や哺乳類細胞を使って研究が進んでいる。一方で、オートファジーは真核生物に普遍的にみられ、進化学的視点からの研究アプローチも重要であるが、植物や藻類に関する知見が乏しい。本研究では、オートファジー機構を包括的に捉えるために、真核生物のなかで研究が遅れている植物・藻類に着目した研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy (ATG) is an intracellular mechanism that responds to environmental stresses and is widely conserved evolutionarily in eukaryotes. Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) plays an important role upstream of the autophagy process. A number of studies on autophagy have been reported in yeast and mammalian cells, but knowledge in algae and plants is still limited. In this study, to clarify the subcellular dynamics of PI3P molecules in plant-type autophagosomes, I attempted to visualize PI3P in algal cells and analyzed their subcellular dynamics and localization by immunofluorescence microscopy, freeze-fracture replica labeling electron microscopy and flow cytometry.

研究分野：細胞形態・微細構造

キーワード：細胞形態 ストレス 分子イメージング 蛍光抗体法 電子顕微鏡法 フローサイトメトリー

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは栄養飢餓などのストレス応答時に見られる細胞質やオルガネラのバルク分解系の総称であり、タンパク質等をアミノ酸に分解しリサイクルする仕組みである。オートファジーは真核生物に進化的に広く保存されている。オートファジーには隔離膜を形成し、オートファゴソームと呼ばれる膜構造を形成するタイプのオートファジー（マクロオートファジーとよぶ）が知られている（図1）。

オートファゴソームはリン脂質二重層を2枚（内側と外側）もつ構造体である。外側のリン脂質二重層が液胞／リソソームと融合することにより、一重膜オートファジックボディーとなり液胞内消化が始まる。酵母細胞ではホスファチジルイノシトール3キナーゼ活性がオートファジーに必須であることが明らかにされ、その産物であるホスファチジルイノシトール3リン酸（PI3P）はオートファジーに関する細胞機能に重要な役割をもつ。

フリーズフラクチャー（凍結切断）レプリカ標識法を用いて PIP 分子可視化した先行研究では、PI3P の局在は哺乳類細胞と酵母細胞で異なることが明らかにされている²⁾。つまり、オートファジーは進化的に保存されているが、系統群によってオートファゴソーム形成機構が異なることが示唆された。申請者はこれまで緑色植物の一群である緑藻類を材料として栄養飢餓応答の研究を行ってきた^{3,4)}。例えば、緑藻類の主要系統群であるトレボウクシア藻類 *Parachlorella* を用いた硫黄飢餓におけるトランスクリプトーム解析では、中性脂質（トリアシルグリセロール）の蓄積にともない、オートファジー関連遺伝子の発現上昇が明らかになった³⁾。これは藻類が中性脂質を蓄積する過程においてオートファジーが重要な役割を担っていることを意味する。PI3P のオートファゴソームにおける膜面局在が酵母と哺乳類細胞で異なることに着目し、酵母あるいは哺乳類細胞から進化的に離れた系統群である植物の PI3P 分子動態を明らかにすることで、植物型のオートファゴソームの一端を理解する。

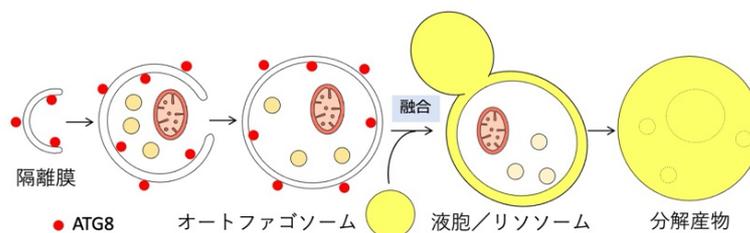


図1 オートファジー進行の過程を示す模式図

2. 研究の目的

植物型オートファゴソームにおける PI3P 局在は、酵母型、動物型、それとも両者と異なるタイプのいずれかになることが予想される。本課題の最終目標は、植物型オートファゴソームの PI3P 分子の細胞内動態を明らかにすることである。この目標達成のために下記の実験を行った。

(1) PI3P 分子可視化系の確立

脂質分子はタンパク質と異なり直接抗体で標識できない。このため、PI3P に特異的に結合する GST タグを付加した PX ドメインをもつタンパク質 (p40^{phox}) を利用し、膜上の PI3P 分子を認識した。さらに抗 GST 抗体（一次抗体）と二次抗体で標識し、PI3P のリン脂質膜上の局在を蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて観察した。酵母細胞や哺乳類細胞で報告されている方法を植物細胞に適用できるようにプロトコールを改変し、これにより緑藻クラミドモナスなどの藻類細胞で PI3P 分子の細胞内動態を調べた。

(2) PI3P 分子局在解析

上記の実験により明らかになった標識タンパク質量や抗体濃度の最適条件をもとにフリーズフラクチャー・レプリカ標識法を実施した。また、細胞内動態を定量的に調べるためにフローサイトメトリーを実施した。

3. 研究の方法

(1) 標識タンパク質の精製

藻類オートファゴソーム上の PI3P 分子の蛍光標識あるいは金コロイド標識系を確立した。PX ドメイン (Phox 相同性) をもつタンパク質にグルタチオン S 転移酵素 (GST) をタグとして付加したタンパク質 (p40^{phox}) をアフィニティークロマトグラフィー (GST GraviTrap) により精製した。タンパク質は SDS-PAGE により電気泳動して、目的の分子量のタンパク質が精製されているかどうかを確認した。

(2) PX-GST タンパク質特異性の確認

ホスファチジルイノシトールリン酸はそのリン酸基が付加する位置によって複数種の分子が知られている。15 種類のホスフォイノシチドとブランク（ネガティブコントロール）がニトロセルロース膜上に固定化された市販のメンブレンを利用し、そこに解析対象となるタンパク質 (p40^{phox}) を重層添加することによって特異的結合を解析する方法 (PIP ストリップアッセイ) により、標識すべき分子を特異的に標識しているかを確認した。

(3) PI3P 分子の局在解析、細胞内動態解析

間接蛍光抗体法による蛍光顕微鏡観察やフリーズフラクチャー・レプリカ標識法による電子顕微鏡観察により、植物型オートファゴソーム PI3P の局在や細胞内動態について解析した。並行して間接蛍光抗体法により調製した細胞試料をフローサイトメーターで解析することにより、細胞内の蛍光シグナルを定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 材料の選定

本研究では、藻類細胞を研究材料として実験を実施した。国立環境研究所微生物系統保存施設 (MCC-NIES) に維持されている緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* NIES-2235) や緑藻ムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata* NIES-35) を材料として研究を実施した。ストレス源として、重金属ストレスも対象に実験をおこなった。これは先行研究により、重金属のストレスによりオートファジーが惹起されることが報告されたことや⁵⁾、ムレミカヅキモのように MCC-NIES に維持されている重金属に感受性の高い試験株を随時利用することができるがあげられる。

(2) PI3P 分子認識タンパク質の精製

PI3P 分子を特異的に認識する phox ドメインを含むタンパク質 (p40^{phox}) を精製した。p40^{phox} は GST タグが N 末端に付加されており、GST 融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー (GST GraviTrap) により精製を行った。細胞ライセートおよび精製したタンパク質は SDS-PAGE 電気泳動し、目的の分子量のタンパク質であることを確認した。さらに PIP ストリップアッセイを実施し、精製タンパク質がさまざまな種類のホスファチジルイノシトールの中で PI3P 分子のみを特異的に認識することを確認した。本研究では本実験で精製したタンパク質に PI3P 分子を認識させ、以降の間接蛍光抗体法や免疫電子顕微鏡の実験を行った。

(3) 間接蛍光抗体法の実施

PI3P 分子認識タンパク質 (p40^{phox}) を介して、PI3P 分子を可視化する間接蛍光抗体法の実験系を確立した。p40^{phox} には GST タグが付加されており、一次抗体として、anti-GST 抗体を利用した系を検討した。二次抗体として FITC- goat anti-rabbit IgG 抗体を利用し、蛍光顕微鏡に

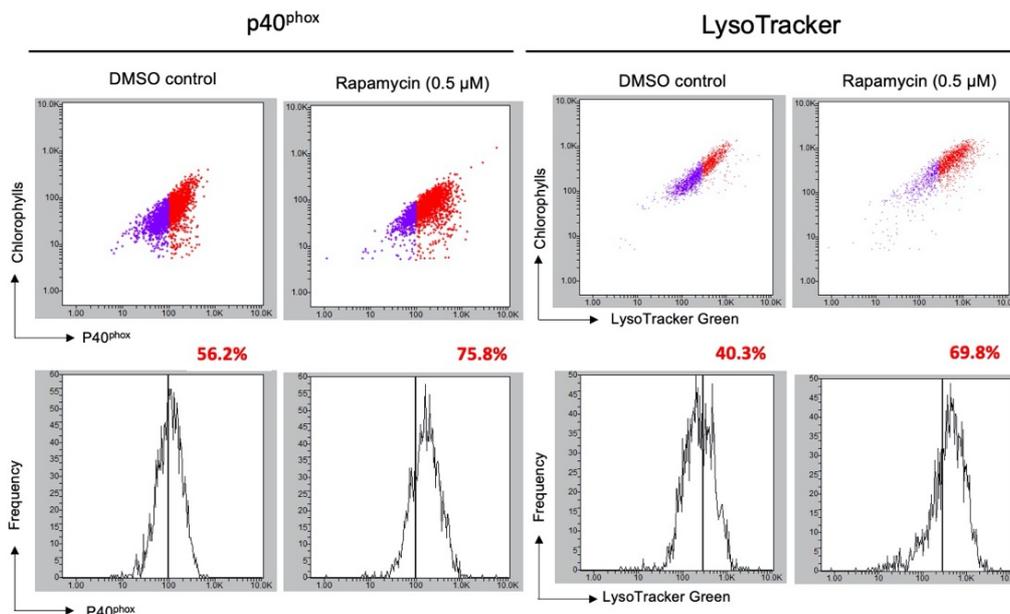


図2 フローサイトメトリーによる細胞内p40^{phox}とLysoTrackerの定量解析

コントロールとラバマイシン曝露区の例を表示した。p40^{phox}とLysoTrackerのシグナルを2Dプロット(上)と1Dプロット(下)で示した。数字(%)は任意の閾値以上にある細胞(赤ドット)の割合。

より観察を行った。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* NIES-2235)では細胞質部分に顆粒状の輝点が認められたほか、核の周縁部分にもシグナルが認められた。観察されたシグナルがPI3P分子の局在であるのかを確かめるために、リソソームマーカー (LysoTracker™ Green) による比較を実施した。また、蛍光抗体法を定量的に評価するためにフローサイトメトリーを実施した (図2)。

(4) フリーズフラクチャーの実施

本研究期間中 (2018年、2019年) に高知大学のフリーズフラクチャー装置を利用し、実験、観察を実施した。ストレス曝露した藻類細胞を液体窒素スラッシュ法により急速凍結固定し、凍結切断後にレプリカ膜 (カーボン薄膜) を作製し、透過型電子顕微鏡により観察した。レプリカ膜を作製する際は、通常のフリーズフラクチャー観察で行う方法に加え、免疫電顕法で観察するための sodium dodecylsulfate (SDS) 処理凍結切断レプリカ標識法の条件検討を実施した。

(5) リソソームマーカーによる蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリー

間接蛍光抗体法によるPI3P分子の局在を評価するために、LysoTracker™ Green を利用した生体染色を行い、蛍光顕微鏡観察で比較解析するとともに、フローサイトメトリーによる金属曝露時のリソソーム細胞内動態やPI3Pのシグナルの変化を調べた。オートファジーを惹起するラパマイシン曝露細胞の一例を図3に示す。

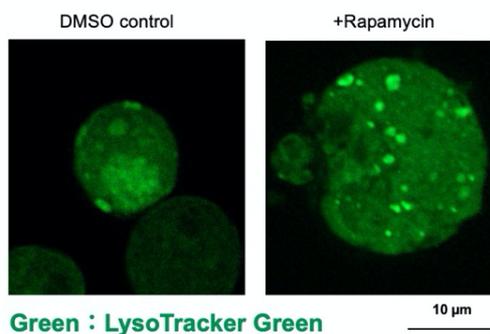


図3 LysoTracker 染色した蛍光顕微鏡写真
DMSOコントロールとラパマイシン曝露した細胞の例。
緑色シグナルが酸性コンパートメントの局在を示す。

引用文献

- 1) Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., Ohsumi, Y., 2001. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 153, 519–530. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.519>
- 2) Cheng, J., Fujita, A., Yamamoto, H., Tatematsu, T., Kakuta, S., Obara, K., Ohsumi, Y., Fujimoto, T., 2014. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat. Commun.* 5, 3207. <https://doi.org/10.1038/ncomms4207>
- 3) Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Takeshita, T., Bišová, K., Zachleder, V., Hattori, M., Kawano, S., 2019. The *Parachlorella* Genome and Transcriptome Endorse Active RWP-RK, Meiosis and Flagellar Genes in Trebouxiophycean Algae. *Cytologia (Tokyo)*. 84, 323–330. <https://doi.org/10.1508/cytologia.84.323>
- 4) Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bišová, K., Zachleder, V., Kawano, S., 2016. Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. *Sci. Rep.* 6, 25731. <https://doi.org/10.1038/srep2573>
- 5) Pérez-Martín, M., Blaby-Haas, C.E., Pérez-Pérez, M.E., Andrés-Garrido, A., Blaby, I.K., Merchant, S.S., Crespo, J.L., 2015. Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 14, 964–973. <https://doi.org/10.1128/EC.00081-15>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ota Shuhei, Yamaguchi Haruyo, Vanel Faustine, Fuchida Shigeshi, Koshikawa Hiroshi, Yamagishi Takahiro, Yamamoto Hiroshi, Kawachi Masanobu	4. 巻 68
2. 論文標題 Differential heavy metal sensitivity in seven algal species from the NIES culture collection based on delayed fluorescence assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 41～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pre.12403	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 Ota Shuhei, Morita Aya, Ohnuki Shinsuke, Hirata Aiko, Sekida Satoko, Okuda Kazuo, Ohya Yoshikazu, Kawano Shigeyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga <i>Haematococcus pluvialis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23854-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ota Shuhei, Kawano Shigeyuki	4. 巻 68
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructure and hyperspectral imaging of metabolite accumulation and dynamics in <i>Haematococcus</i> and <i>Chlorella</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 57～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfy142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ota Shuhei, Kawano Shigeyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Extraction and molybdenum blue-based quantification of total phosphate and polyphosphate in <i>Parachlorella</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e2539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.2539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大田 修平、河野 重行	4. 巻 29
2. 論文標題 クロレラ藻類バイオ：リン，デンブ，オイル，オートファジー	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 57～61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5685/plmorphol.29.57	査読の有無 無
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 大田 修平、河野 重行	4. 巻 95
2. 論文標題 藻類バイオマス評価：クロレラの物質生産能を電顕3Dとゲノムで解析する（特集 藻類に託す今後の産業創成戦略）	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 194～198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 井上瑛子、大田修平、松崎令、岡田昌樹、河地正伸	4. 巻 68
2. 論文標題 マイクロ流路チップ・セルソーターによる高脂質生産微細藻株の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 藻類	6. 最初と最後の頁 143～152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上瑛子、大田修平、松崎令、岡田昌樹、河地正伸
2. 発表標題 マイクロ流路チップ・セルソーターによる高オイル生産株の探索
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田修平、平川泰久、河地正伸
2. 発表標題 緑藻類ホスファチジルイノシトール3リン酸の細胞内動態と重金属感受性に対する影響
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田修平、淵田茂司、山口晴代、山岸隆博、山本裕史、越川海、河地正伸
2. 発表標題 フローサイトメトリーを利用した海底鉱物資源開発域における植物プランクトンへの影響評価技術の開発
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田修平、平川泰久、河地正伸
2. 発表標題 金属曝露ストレスによるホスファチジルイノシトール3リン酸の緑藻における細胞内動態
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田 修平、河野 重行
2. 発表標題 電顕3Dとハイパースペクトルで見るヘマトコッカス藻のカロテノイド分布とその動態
3. 学会等名 日本植物学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田修平、森田彩、関田諭子、大貫慎輔、平田愛子、奥田一雄、大矢禎一、河野重行
2. 発表標題 光刺激で応答するヘマトコッカス藻の細胞内色素とオイルの動態イメージング
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大田修平、森田彩、大貫慎輔、平田愛子、関田諭子、奥田一雄、大矢禎一、河野重行
2. 発表標題 ハイパースペクトルおよび凍結断面法によるヘマトコッカス細胞の色素とオイル顆粒の光応答動態解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第29回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大田修平、平川泰久、河地正伸
2. 発表標題 重金属暴露ストレス下で見られる緑藻のPI3P局在とLysoTracker局在の比較解析
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamagishi T., Ota S., Yamaguchi H., Koshikawa H., Tatarazako, N., Yamamoto H., Kawachi M.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 577
3. 書名 Ecotoxicological Bioassay Using Marine Algae for Deep-Sea Mining	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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