

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16478

研究課題名(和文)オートファジーにおける隔離膜伸長過程の多角的な微細構造解析

研究課題名(英文)Multidimensional and morphological analyses of the sequestering membrane formation in autophagy

研究代表者

田村 直輝(TAMURA, NAOKI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70745992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーとは飢餓ストレスなどに応答して細胞内の構成成分をオートファゴソームという隔離膜で包み込み分解する経路である。申請者はオートファジーにおける隔離膜形成過程の解明を目指し、特に高浸透圧ストレス下で誘導されるオートファジーに焦点を当てて研究を行った。結果として、高浸透圧ストレス下でp62とポリユビキチン鎖を中心とした非膜性オルガネラ(p62顆粒)が形成され、これをオートファジー隔離膜が特異的に認識し、リソソームで分解していることを明らかになった。さらに、電子相関顕微鏡法によりp62顆粒と別の非膜性オルガネラであるストレス顆粒の微細構造が異なってい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

本課題の成果は大きく二つあり、(1)高浸透圧ストレスによって誘導させるオートファジーの分子メカニズムを解明したこと、(2)複数の非膜性オルガネラの微細構造を明らかにしたことが挙げられる。ファスティングなどオートファジーを応用した健康療法が近年注目されており、今回明らかにした高浸透圧ストレス誘導性のオートファジーが新たな方法の一つになる可能性がある。また、(2)の非膜性オルガネラは筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患にも深く関与している構造であり、その微細構造の解明は学術面だけでなく医療面にも貢献できると思われる。今後の課題としては個体レベルでの解析が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is one of major pathways that intracellular components are encapsulated and degraded by a sequestering membrane called autophagosome in response to various stress including starvation. In order to elucidate the process of sequestering membrane formation in autophagy, I has focused on autophagy induced by hyperosmotic stress. As a result, it was revealed that a membrane-less organelle (p62 granule), mainly composed of p62 and poly-ubiquitin chains, is formed under hyperosmotic stress, which is specifically recognized by the autophagic sequestering membrane and transported into lysosomes for degradation. Furthermore, correlative light and electron microscopy method (CLEM) revealed that p62 granules show different morphology compared to stress granules, another membrane-less organelle formed under hyperosmotic stress.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 液-液相分離 非膜性オルガネラ 高浸透圧ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物で広く保存された液胞/リソソームによる細胞内分解機構であり、膜動態の違いにより数種の細区分が存在する。なかでも、二重の隔離膜が分解対象物を包み込むように伸長して分解する経路はマクロオートファジーと呼ばれる。遺伝学的または生化学的手法によりマクロオートファジーに関わる分子とその役割が同定され、形態学な解析から隔離膜の由来が小胞体であることが解明された。

しかし、オートファジーにおける分子メカニズムの解明が進む一方で、隔離膜の伸長過程の微細構造レベルの知見は多くない。なぜなら、直径 0.5 ~ 1 μm の隔離膜は蛍光顕微鏡や超解像顕微鏡の分解能では観察できず、また分解能の高い電子顕微鏡解析でも動的な隔離膜伸長の経時変化を追うことは難しいからである。隔離膜の伸長過程はオートファジーを理解する上で重要なポイントであり、その解明は学術的に意義が大きいと考えられる。

非膜性オルガネラは主に液-液相分離によって生じる限界膜を持たないオルガネラであり、核小体やストレス顆粒などがその代表格として知られている。なかでも、ストレス顆粒は筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患への関与が強く指摘されている。また、近年の研究からオートファジーのアダプターの一つである p62 が液-液相分離により液滴構造を形成することが報告されており注目を集めている。これら非膜性オルガネラは多くの疾患に関与することから、その性状の解明が急務の課題となっている。

2. 研究の目的

本課題は、(1) オートファジーにおける隔離膜形成過程の形態を明らかにすること、(2) 分解される標的の非膜性オルガネラ (p62 顆粒) の構造を微細構造レベルで解明すること、さらに (3) 3次元培養系を用いることで多細胞系も含めたより高次的なオートファジー隔離膜形成機序を理解することを目的とした。他の研究グループとの差別化を図るために、今回モニターするオートファジーは申請者が以前に報告した高浸透圧ストレス下で誘導されるオートファジー (高浸透圧ストレス誘導性オートファジー、Tamura et al. 2019 MCB) に焦点を絞ることにした。三つの目的を達成することでオートファジー隔離膜の形成過程に多角的にアプローチを行うことができ、オートファジー分野さらに非膜性オルガネラへの理解が深まることを期待した。

3. 研究の方法

研究目的の項で記述した三つの目的ごとにそれぞれ適切な研究方法を選択した。

(1) 隔離膜伸長過程の形態解析

ヒト培養細胞の実験系で、様々な抗体を用いて免疫染色することによりどの分子がどのタイミングで高浸透圧ストレス誘導性オートファジーに関与するかを明らかにした。また、ウェスタンブロット法によりどの分子が選択的にオートファジー経路で分解されるかを解析した。

(2) p62 顆粒の構造を微細形態解析

(1) の実験を進めていく過程で高浸透圧ストレス誘導性オートファジーは p62 およびポリクビキチン鎖 (K48 と K63) を中核とした非膜性オルガネラ (p62 顆粒) を選択的に分解していることが分かった。この高浸透圧ストレスに反応した p62 顆粒の形成過程を形態学的に解析するために生細胞のタイムラプス撮影を行った。また、電子相関顕微鏡法 (CLEM 法) を用いることで p62 顆粒と別の非膜性オルガネラであるストレス顆粒の微細構造の比較解析を行い、その違いを追求した。CLEM 法は共焦点レーザー顕微鏡により画像を習得した後に電子顕微鏡に供し画像を統合することで像を得た。

(3) 多細胞系における隔離膜の形態学的解析

(1) と (2) の研究課題ではヒトの培養細胞のみを使用したが、実際の個体において細胞は上皮などの多細胞系を構成している。そこで、市販のヒト 3 次元培養角膜上皮モデル (疑似非角化型重層扁平上皮) を使用することで、多細胞系における高浸透圧ストレス誘導性オートファジーのモニタリングを試みた。角膜上皮サンプルはストレス暴露後に固定し、OCT compound に包埋後、一般的な組織化学的解析に供した。

4. 研究成果

研究の方法と同様に三つの目的に分けて研究結果も記述する。

(1) 隔離膜伸長過程の形態解析

T24 細胞などのヒト培養細胞を高浸透圧ストレス (0.2 ~ 0.4 M のスクロースを培地に添加) に曝し、固定後様々な抗体による免疫染色を行った。結果、p62 およびポリクビキチン鎖 (K48 と K63 鎖) が顕著に細胞質中に集積しており、同じ場所にオートファジーの隔離膜マーカーである WIP1 や Atg16 が局在していることが分かった。以降、p62 陽性の顆粒を p62 顆粒と呼称する。また、ウェスタンブロット解析から、p62 以外に他のオートファジーアダプターである NBR1 と TAX1BP1 も p62 と同様にオートファジーで分解されていることが分かった。時系列的に並べると、高浸透圧ストレスに曝して最初に p62 と NBR1 が集積し、次いでポリクビキチン鎖と TAX1BP1

が同じ場所に集まり、最後にストレス暴露から 10 分後以降で隔離膜が形成されていることが分かった(図 2)。電子顕微鏡による解析でも同様の結果が得られており、ストレス誘導後 10 分後以降でしか隔離膜やオートファゴソームは観察されなかった。

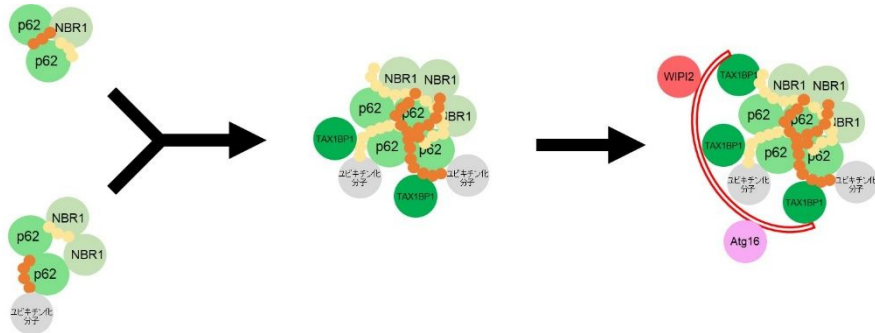


図 1. 高浸透圧ストレスで誘導されるオートファジーの模式図。様々な抗体を用いた免疫染色の結果から、まず p62 と NBR が顆粒 (p62 顆粒) を形成し、次いでポリユビキチン鎖や TAXBP1 が p62 顆粒に集積し、最後に WIPI2 や Atg16 などを含むオートファジー隔離膜が選択的に p62 顆粒を認識し、リソソームで分解が行われることが分かった。

(2) p62 顆粒の構造を微細形態解析

(1) の免疫染色の結果から p62 顆粒はストレス暴露後 1 分以内に形成されていることが分かった。これをさらに詳細に観察するために GFP を付加した p62 を細胞に発現させ、タイムラプス撮影により高浸透圧ストレスに応じた p62 の集積をモニターした。結果、GFP-p62 は 20 秒以内で細胞質中に集積しており、非常に迅速な反応であることが明らかになった(図 2)。

近年の研究から、p62 には *in vitro* で液-液相分離により液滴構造を形成する機能があることが明らかになっている。細胞質中で液滴構造が形成されると限界膜を持たないオルガネラ(非膜性オルガネラ)が形成される。そこで、高浸透圧ストレス下で形成された p62 顆粒が非膜性オルガネラであるかどうかを調べる為に CLEM 法を用いて観察を行った。このとき、比較対象として高浸透圧ストレス下で別の非膜性オルガネラとして形成されるストレス顆粒も同時に観察し、その形態を比較した。まず、高浸透圧ストレスに曝した細胞を固定し、膜透過処理後に p62 と G3BP1(ストレス顆粒のマーカー分子)をそれぞれ抗体により標識した後に、CLEM 法で解析した。結果、p62 顆粒は膜のない構造体として形成されており、ストレス顆粒と比較して電子密度が濃く、より円形の形態をしていた。また、隔離膜は p62 顆粒上のみに見られ、選択的にオートファジーにより分解されていることを示していた(図 3)。

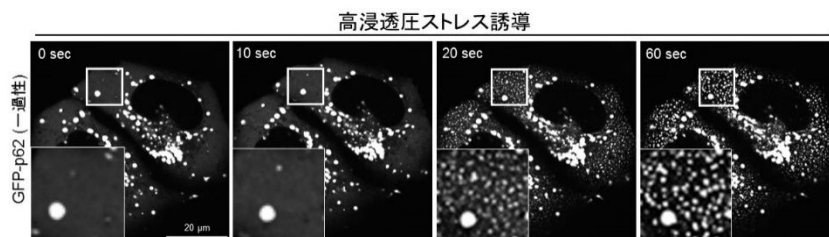


図 2. GFP-p62 のタイムラプス撮影像。GFP-p62 を発現した U2OS 細胞を 0.4 M ショ糖添加培地に曝し、タイムラプス撮影した。左下は白枠の拡大図で、小さい p62 顆粒がストレス誘導後短時間(20 秒以内)で多数形成されているのが分かる。

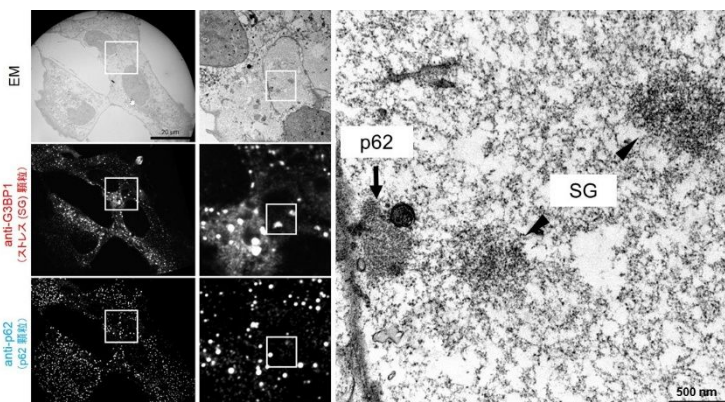


図 3. 内在性の p62 顆粒とストレス顆粒の CLEM 像。ARPE-19 細胞を 0.3 M ショ糖添加培地に 20 分曝し、固定後細胞膜処理を行い、各抗体で標識した後、電子顕微鏡で解析した。白枠内を拡大。p62=p62 顆粒、SG=ストレス顆粒

(3) 多細胞系における隔離膜の形態学的解析

高浸透圧ストレス下で見られる p62 顆粒の形成とオートファジーによる分解が培養細胞だけに限らず多細胞系で見られるのかを調べた。J-TEC 社(愛知県)から販売されているヒト3次元培養角膜上皮モデル(LabCyte CORNEA-MODEL)を購入し、管腔側にのみ高浸透圧ストレス(0.2~0.4 Mのスクロースを培地に添加)を付加したところ、培養細胞と同じように p62 顆粒が形成され、オートファジー隔離膜によって認識されていることが免疫染色および電子顕微鏡解析によって明らかになった(図4)。ただし、細胞にかかるストレスの強さが培養細胞の実験系と比較して減少しているようにみえた。今後、個体を用いた解析を行い、多細胞系におけるストレス耐性などを評価していきたい。

近年、ファスティングなどオートファジーを応用した健康療法が注目されている。今回明らかにした高浸透圧ストレス誘導性オートファジーは多細胞系でも保存されており、ヒトの個体におけるオートファジー誘導の新たな方法の一つとなる可能性がある。また、非膜性オルガネラは神経変性疾患を含む多くの疾患に関与することから、今回得られた非膜性オルガネラの形態学的知見は学術面だけでなく医療面にも寄与できることを期待したい。

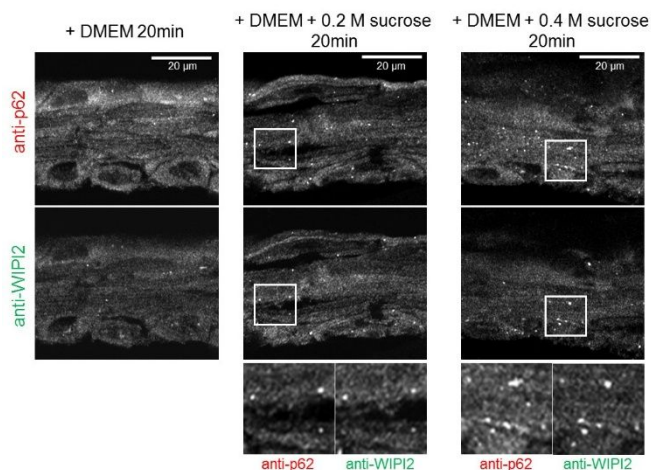


図4：ヒト角膜モデルにおけるオートファジー経路の誘導。ヒト角膜モデルの頂端側に各濃度のショ糖添加培地を20分間加え、固定後に樹脂へ包埋して各種抗体で免疫染色した。高張液中で p62 顆粒の形成と隔離膜分子の共局在が観察できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tamura Naoki, Kageyama Shun, Komatsu Masaaki, Waguri Satoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Hyperosmotic Stress Induces Unconventional Autophagy Independent of the Ulk1 Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00024-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00024-19	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 Sakai Shun-suke, Hasegawa Atsushi, Ishimura Ryosuke, Tamura Naoki, Kageyama Shun, Komatsu-Hirota Satoko, Abe Manabu, Ling Yiwei, Okuda Shujiro, Funayama Manabu, Kikkawa Mika, Miura Yoshiki, Sakimura Kenji, Narita Ichiei, Waguri Satoshi, Shimizu Ritsuko, Komatsu Masaaki	4. 巻 42
2. 論文標題 Loss of <i>Atg2b</i> and <i>Gskip</i> Impairs the Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool Size	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0002421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00024-21	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村直輝
2. 発表標題 高浸透圧ストレス変動に応答したp62顆粒およびストレス顆粒の形成
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村直輝
2. 発表標題 高浸透圧ストレス下における非膜性オルガネラの形成と分解
3. 学会等名 第66回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村直輝
2. 発表標題 高浸透圧ストレスに応答した非膜性オルガネラの形成・分解機序
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村直輝
2. 発表標題 高浸透圧ストレスに応答した非膜性オルガネラの形成・分解機序
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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