

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03154

研究課題名(和文) ナノスケール解析技術を用いた生体膜脂質の分布・動態に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Cell biological study for the distribution and dynamic of lipid in the biological membrane with nano-scale analyzing techniques

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：二重膜構造のautophagosomeが中心的な役割を担うmacroautophagyにおいてOshのautophagyへの関与を検討した。全てのOsh1-Osh7を欠損した酵母細胞のautophagic活性は抑制されていた。さらにOsh5pを欠損した酵母細胞ではautophagosomeの形成が抑制され、またOsh4pを欠損した酵母細胞では液胞内のautophagic body (autophagosomeの内膜)が蓄積していた。以上の結果から、autophagosomeの形成にはOsh5pが、液胞内でのautophagic body膜の崩壊にはOsh4pが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Autophagyは、初期胚発生、細胞変性抑制、細胞内侵入細菌分解、選択的基質分解、がん抑制、炎症制御などの機能を持つことが判明してきた。しかし、autophagosomeがどこで形成、膜脂質の由来は何か、というような基本的なことがわかっていない。今回の研究で得られた成果はautophagyにおける脂質動態の解明に大きく貢献し、オートファジー全容の解明への新たなアプローチを提供する。さらにオートファジー機能の欠陥を原因とする疾患の病態の解明、その成果に基づく新たな医薬品の開発も期待され、ライフイノベーション推進への寄与は大きい。

研究成果の概要(英文)：Autophagy has crucial roles in the intracellular metabolisms of various molecules including proteins, nucleotides, and lipids. We investigated roles of lipids transporter Oshp, which can transport PtdSer and PtdIns(4)P between the membranes of intracellular organelles, in the autophagy process of yeast cells. We found that the defect of the autophagic activity in the all osh genes (osh1-osh7)-knocked out yeast. It was found that no autophagosome was detected in osh5-deleted mutant and accumulated autophagic bodies in the vacuole in osh4-deleted mutant when autophagy was induced. We suggest that Osh5p and Osh4p have roles in the autophagosome formation and in the degradation of autophagic body in the vacuole, respectively, by transporting PtdSer and PtdIns(4)P between the organelle membranes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質 電子顕微鏡 急速凍結 フリーズフラクチャー 微細分布 オートファジー

## 様式 C-19、F-19-1 (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（偏在性）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、あるいは脂質の偏在性の結果からもたらされる細胞内の微小環境への影響はわかっていない。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

代表者らは、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。代表者らの現在までの研究では、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した。本研究では、オキシステロール結合タンパク質（oxysterol-binding protein: OSBP）の酵母ホモログである Osh のオートファジーでの役割を検討した。

### 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(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、ホンスファチジルセリン（PtdSer）および PtdIns(4)P の輸送に関するオキシステロール結合タンパク質（oxysterol-binding protein: OSBP）の酵母ホモログである Osh のオートファジーでの役割を検討した。

酵母には野生株 SEY6210 および Osh1-Osh7 をそれぞれノックアウトした変異株を用い、YPD 培養溶液内、30℃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（S(-CN)）で 5 hr 培養を行なった。オートファジー活性は GFP-Atg8 の分解を指標として評価を行った。つまり、オートファジーが誘導されると GFP-Atg8 は液胞内に運ばれ分解を受ける。オートファジーが正常に誘導されるとウエスタンブロッティング（WB）によって単離された GFP バンドが抗 GFP 抗体により検出される。また PtdSer および PtdIns(4)P 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(4)P および PtdSer の標識を行なった。

### 4. 研究成果

抗 GFP 抗体を用いた WB により、野生株（WT）ではオートファジー誘導により GFP バンドが検出されたが、全 *osh* 遺伝子をノックアウトした株（*osh1-osh7Δ*）ではオートファジーを誘導

しても GFP バンドは検出されなかった。それぞれの *osh* 遺伝子をノックアウトした株では、*osh4Δ* と *osh5Δ* 株で GFP のバンドがほぼ消失した。以上のことから、オートファジー活性には Osh4p および Osh5p が重要な役割を持つことがわかった。QF-FRL 法を用いた検討では、*osh1-osh7Δ* 株ではオートファジーを誘導しても、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観察されなかった。さらに QF-FRL 法を用いた PtdSer および PtdIns(4)P の標識により、*osh5Δ* 株ではオートファゴソームがほとんど無く、存在したとしても小さく、内膜も外膜も薄く弱々しいものであった。また、PtdSer の標識の WT 株のオートファゴソーム膜よりも極端に減少していた。このことから、オートファゴソームの形成には Osh5p が重要な働きをしており、特に Osh5p による PtdSer の輸送がオートファゴソームの形成に不可欠であることが示唆された。また、*osh4Δ* 株においては、細胞質にオートファゴソームが WT 株と変わりなく観察された。さらにタンパク質分解酵素の阻害薬である PMSF 非存在下においても、液胞内のオートファジックボディーが蓄積していた。また、オートファジックボディー膜における PtdIns(4)P の標識は WT 株と比較して増加し、PtdSer 標識は減少した。以前の我々の報告では、液胞内のオートファジックボディー膜での PtdIns(4)P 標識はオートファゴソーム膜より減少し、PtdSer 標識は増加していた。液胞内には PtdSer を特異的に分解するリパーゼである Atg15p が存在し、液胞内でオートファジックボディー膜の特異的な分解を行なっていることが示唆されている。*osh4Δ* 株ではオートファジックボディーの元となるオートファゴソームの内膜への PtdSer の輸送が抑制され、オートファジックボディー膜での PtdSer の減少が起こり、その結果、液胞内でのオートファジックボディーの蓄積が起こったと考えられる。これらの結果から、Osh4p はオートファゴソームの内膜への PtdSer の輸送に重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muramoto Moe, Mineoka Nanaru, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Masatani Tatsunori, Fujita Akikazu	4. 巻 1866
2. 論文標題 Coordinated regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylserine levels by Osh4p and Osh5p is an essential regulatory mechanism in autophagy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184308 ~ 184308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2024.184308	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, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Masatani Tatsunori, Xuan Xuenan, Fujita Akikazu	4. 巻 160
2. 論文標題 Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in Toxoplasma gondii revealed by nanoscale analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-023-02218-0	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 Muramoto Moe, Yamakuchi Yuki, Konishi Rikako, Koudatsu Shiomi, Tomikura Hiromu, Fukuda Kayoko, Kuriyama Sayuri, Kurokawa Yuna, Masatani Tatsunori, Tamaki Hisanori, Fujita Akikazu	4. 巻 1867
2. 論文標題 Essential roles of phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatases Sac1p and Sjl3p in yeast autophagosome formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159184 ~ 159184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2022.159184	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 Yamakuchi, Y., Kurokawa, Y., Konishi, R., Fukuda, K., Masatani, T., Fujita, A.	4. 巻 595
2. 論文標題 Selective increment of phosphatidylserine on the autophagic body membrane in yeast 's vacuole.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2197-2207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14167	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 Koudatsu, S., Masatani, T., Konishi, R., Asada, M., Hakimi, H., Kurokawa, Y., Tomioku, K., Kaneko, O., Fujita, A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glycosphingolipid GM3 is localized in both exoplasmic and cytoplasmic leaflets of Plasmodium falciparum malaria parasite plasma membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94037-3	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 Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Tomioku, K., Tanabe, K., Fujita, A.	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 Histochem. Cell Biol.	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 -

1. 著者名 Konishi, R., Kurokawa, Y., Masatani, T., Tomioku, K., Xuan, X., Fujita, A.	4. 巻 100
2. 論文標題 Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living Toxoplasma gondii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur. J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口優希、黒川夕奈、向達汐美、福田佳代子、正谷達膳、藤田秋一
2. 発表標題 酵母細胞でのオートファジーにおけるオートファジックボディーの選択的崩壊機構とオートファジックボディー膜におけるホスファチジルセリンの選択的増加
3. 学会等名 第96回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向達 汐美, 正谷 達膳, 小西 里可子, 黒川 夕奈, 山口 優希, 富奥 甘奈, 福田 佳代子, ハキミ ハッサン, 麻田 正仁, 金子 修, 藤田 秋一
2. 発表標題 ヒトmalaria原虫Plasmodium falciparumでのラフト主成分の糖脂質GM3の局在
3. 学会等名 第96回 日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口優希、黒川夕奈、向達汐美、福田佳代子、正谷達膳、藤田秋一
2. 発表標題 酵母細胞でのautophagosome膜およびautophagic body膜における膜脂質の微細分布解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向達汐美、正谷達膳、小西里可子、黒川夕奈、山口優希、富奥甘奈、福田佳代子、Hakimi Hassan、麻田正仁、金子修、藤田秋一
2. 発表標題 ヒトmalaria原虫Plasmodium falciparumの細胞膜ではラフト主成分の糖脂質GM3は内葉と外葉の両方に局在する
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021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 急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法を用いた酵母細胞膜におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PI(4,5)P2)の局在解析による、PI(4,5)P2生成の制御機構の解明
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学 共同獣医学部 分子細胞生物学 藤田秋一研究室  
<https://www.facebook.com/profile.php?id=100057246648140>

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	正谷 達膳  (Masatani Tatsunori)  (70614072)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授    (13701)	

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