

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650066

研究課題名(和文) ミクロオートファジーによる新規エンドサイトーシス経路の研究

研究課題名(英文) Endocytic pathway involving microautophagy in animals

研究代表者

和田 洋 (Wada, Yoh)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50212329

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)：エンドサイトーシスはシグナルの受容、栄養供給を通じて、様々な生理機能に必須な役割を果たす。初期胚では「ミクロオートファジー」とよばれるユニークなメカニズムでエンドサイトーシスが進行する。初期胚と似た性質をもつ空腸上皮細胞での膜ダイナミクスを明らかにするため、GFP融合エンドソームタンパク質を発現するマウスを作成し、オルガネラダイナミクスを検討した。腸管特異的に膜融合装置を欠損するマウスでは、細胞微細構造が異常になり、出生後、成長の遅延が見られた。増殖因子の受容と応答の制御は疾病に直接間接に関与することから、加齢に伴う腸上皮の増殖など、興味深い研究を展開する基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Endocytic pathway plays essential roles in signal transduction, although its significance in a multi-cellular context remains largely unknown. In rodent perigastrulation embryos, signalling molecules as well as maternal nutrients must cross a tightly sealed epithelium, visceral endoderm, to reach the embryo proper, implicating importance of endocytosis. We found that the endocytic delivery in VE proceeds by microautophagy: large vacuoles engulf incoming pre-vacuolar endosomes without forming a continuous membrane. This unique membrane dynamics is quite different from the canonical endosome-lysosome traffic that involves the fusion of two distinct membranes. Microautophagic delivery is also implicated in food absorption in illium. Loss of the autophagic machinery resulted in mild retardation in weight-gain of newborn animals. We are also interested in proliferation profiles of gut epithelium at later stages, which are highly dependent on proper regulation of multiple signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス シグナル伝達 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞は、細胞内に多彩な膜系オルガネラを発達させ、生命機能の維持に必要な物理化学反応の区画化(コンパートメンテーション)を行っている。オルガネラは相互に膜と内容を交換し合う、ダイナミックなシステムを形成している。私たちはエンドソーム・リソソームの膜ダイナミクスに注目し、生理的な意義を多細胞生物の高次機能発現との関連で明らかにする研究を展開してきた。

最近、私たちはリソソームがエンドソームを「飲み込む」現象を見出した。通例の膜オルガネラの相互作用では、オルガネラ同士の膜が接触したのち、膜の融合がおき、連続した膜を成すことでオルガネラの融合が起きる。私たちの見出した「飲み込む」反応では、エンドソームが大きなリソソームに接触したあと、リソソームの膜が内腔へ陥入しながらエンドソームをリソソーム内へ取り込んでいき、リソソーム内で膜ごと分解することによってオルガネラの合体が起きる。この反応は「マイクロオートファジー」として知られていたが、動物細胞での記載がほとんどなく、メカニズム、生理的な意義ともまったくわかっていない。

2. 研究の目的

私たちは、マウス初期胚の臓側内胚葉(VE)とよばれる吸収上皮細胞でのエンドサイトーシスを観察してマイクロオートファジーを見出している。本研究では、消化管、腎、毛様体などの吸収上皮細胞に着目し、これらの組織でのマイクロオートファジーの有無を検討する。VEでのマイクロオートファジーにmVam2, rab7などの機能が必須であることを見出している。細胞表層と細胞内膜を結びエンドサイトーシス経路が活性化されると、

表層の膜が中へ運び込まれ、分布が偏ることになる。特に活発にエンドサイトーシスを行う吸収上皮細胞の場合には偏りが顕著になることが予想される。マイクロオートファジーによるオルガネラ融合ではリソソーム膜も同時にリソソームに運び込まれることから、過大な細胞内膜の効率的な消化に寄与すると考えている。

そこで、活発なエンドサイトーシスが起きている消化管に着目し、消化管吸収上皮細胞の膜ダイナミクスを解析し、マイクロオートファジーの生理的な意義を検証する

3. 研究の方法

バルクのエンドサイトーシス活性としてFITC-dextran, TRITC-dextranをpulse labelで取り込ませ、chase期の挙動を蛍光顕微鏡で観察する。受容体依存エンドサイトーシスはFITC-transferinを用いる。

固定標本によるスチルイメーজのコンフォーカル顕微鏡観察、デコンボリューション顕微鏡下でのライブイメージングによってエンドサイトーシス経路の可視化をする。さらに電子顕微鏡による微細構造観察を行う。「運ばれるもの」を追跡するに加えて、「運ぶ膜」の動態を観察する。リソソーム膜に局在するLamp1にmonomeric RFP、エンドソーム膜に局在するsyntaxinにGFPを連結し、トランスジェニックマウス、あるいはトランスジェニックES細胞を確立する。胚培養、細胞培養により「運ばれるもの」と「運ぶ膜」を実時間で追跡することにより、オルガネラ膜がどのようなダイナミクスで変容していくのかを明らかにする。

4. 研究成果

マウス空腸上皮組織におけるエンドサイトーシス経路の解析を進めた。空腸上皮組織

を構成する細胞は明確な細胞極性を持ち、頂端面から活発なエンドサイトーシスを行う。エンドソームマーカーで確認したところ、頂端面の形質膜直下の膜系は EEA1 をはじめとするタンパク質をもっており、初期エンドソームの性質を、核周辺のオルガネラはリソソームの性質をもつことが確認できた。

エンドソーム間の膜輸送を担う分子である syntaxin のダイナミクスを可視化するため GFP との融合タンパク質として発現させることとした。空腸上皮細胞や、VE のように高度に分化した細胞でトランスジーンを発現させるため、syntaxin の構造遺伝子 200-kb を BAC 上で改変し、トランスジェニックマウスを得たところ、真正の syntaxin と同様の遺伝子発現プロファイルを示す個体が得られた。

しかしながら腸管での GFP-syntaxin の発現量はそれほど多くはなく、現有の顕微鏡でトレースすることは感度の問題で困難であり、エンドサイトーシスの実態をライブイメージングすることには未だに成功していない。

そこで、機能に関する側面からの研究を推進している。syntaxin の遺伝子破壊マウスを作成し、その表現型を解析したところ、null allele をホモに持つ個体でも出生すること、出生後の成長にも野生型と差が見られないことがわかった。さらには腸管の細胞形態は変化せず、この組織において syntaxin の機能は必須ではないと考えられる。

一方、腸上皮で低分子量 GTPase rab の機能を喪失させたところ、エンドソームの形態が異常となり、ミクロオートファジー経路に異常が生じていることが考えられた。rab の欠失は胎生致死となるため、腸管のみで遺伝子欠損が起きるように、flox allele と Villin-Cre を組み合わせることによって消化管上皮特異的な遺伝子欠損を導入した。このような遺伝学的な操作の上で得られた遺伝子改変マウスを解析したところ、空腸上皮での膜ダイ

ナミクスの異常は新生仔の発育に影響しており、出生後の体重増加が野生型に比べて低下する。糞便に明らかな異常は見られていない。

空腸の細胞は、成体になっても増殖と死を繰り返す、ダイナミックな組織である。この増殖制御には Wnt や BMP をはじめとする増殖因子のバランスが重要である。ミクロオートファジーを伴うエンドサイトーシス経路は初期胚 VE において Wnt、Bmp の制御に関わる。したがって、加齢に伴うシステム的な生理との関連に関してさらなる観察が必要である。今後のこのような研究は、消化管腫瘍の発生機序の解明とあらたな治療戦略の開発などにつながると期待できる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., and Yasukawa, J. (2016). Membrane dynamics in mammalian embryogenesis: Implication in signal regulation. Birth defects research Part C, Embryo today : reviews 108, 33-44.

Sun-Wada, G.H., and Wada, Y. (2015). Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. Biochim Biophys Acta 1847, 1166-1172.

Kawamura, N., Sun-Wada, G.H., and Wada, Y. (2015). Loss of G2 subunit of vacuolar-type proton transporting ATPase leads to G1 subunit upregulation in the brain. Scientific reports 5, 14027.

Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014). Role of autophagy in embryogenesis. Curr Opin Genet Dev 27C, 60-66.

Matsumoto, N., Daido, S., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Futai, M., and Nakanishi-Matsui, M. (2014). Diversity of proton pumps in osteoclasts: V-ATPase with a3 and d2 isoforms is a major form in osteoclasts. *Biochim Biophys Acta* 1837, 744-749.

Kurauchi-Mito, A., Ichihara, A., Bokuda, K., Sakoda, M., Kinouchi, K., Yaguchi, T., Yamada, T., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., and Itoh, H. (2014). Significant roles of the (pro)renin receptor in integrity of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 37, 830-835.

Wada, Y., Sun-Wada, G.H., and Kawamura, N. (2013). Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy* 9, 252-254.

Wada, Y., and Sun-Wada, G.-H. (2013). Positive and negative regulation of developmental signaling by the endocytic pathway. *Curr Opin Genet Dev* 23, 391-398.

Wada, Y. (2013). Vacuoles in mammals: A subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *BioArchitecture* 3, 13-19.

Kinouchi, K., Ichihara, A., Sano, M., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Ochi, H., Fukuda, T., Bokuda, K., Kurosawa, H., Yoshida, N., *et al.* (2013). The role of individual domains and the significance of shedding of ATP6AP2/(pro)renin receptor in vacuolar H(+)-ATPase biogenesis. *PLoS One* 8, e78603.

[学会発表](計4件)

Yoh Wada, Minako Aoyama, Nobuyuki Kawamura, and Ge-Hong Sun-Wada
Microautophagy, a unique membrane dynamics,

in rodent visceral endoderm is involved in the regulation of canonical Wnt pathway and morphogenesis. *Endoderm Lineages in Development and Disease Keystone Symposium February 8, 2015 - February 13, 2015 - Keystone Resort - Keystone, Colorado, USA*

Ge-Hong Sun-Wada, Hiroyuki Tabata, Nobuyuki Kawamura and Yoh Wada Embryonic defect in *ATP6Voc* mutant mice lacking the vacuolar-type H⁺-ATPase *c* subunit *Keystone Symposium February 8, 2015 - February 13, 2015 - Keystone Resort - Keystone, Colorado, USA*

Nobuyuki Kawamura, Ge-Hong Sun-Wada, and Yoh Wada Upregulation of Vacuolar-type ATPase *G1* Subunit by a Genetic Loss of Subunit *G2* in Neuron *15th IUBMB International Conference Oct 21-Oct 25, 2014 Taipei, Taiwan*

Yoh Wada Microautophagic delivery to Lysosomes regulates patterning of BMP signals in mouse gastrulae *Mouse Molecular Genetics 18-21 September 2013 Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK*

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 洋(WADA, Yoh)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号: 50212329