

52. オートファゴソーム形成の膜動態と分子機構の解明

濱崎 万穂

大阪大学 大学院医学系研究科 遺伝医学講座 遺伝学教室

Key words : オートファジー, ER, Mt, 分子機構, 細胞内分解

緒言

細胞内大規模分解系であるオートファジーは、飢餓時のエネルギー源確保による生存維持や細胞内浄化による発がん、神経変性疾患、炎症性疾患、感染症、生活習慣病等の疾患発症の抑制など多岐に亘る重要な役割を担い注目を集めている。オートファジーが誘導されると、細胞質で膜オルガネラであるオートファゴソーム (AP) が新規に形成される。我々は、細胞生物学の大きな謎であった AP 膜の形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位 (ER-Mt CS) であると最近同定した¹⁾。AP 膜形成は複雑でダイナミックな過程であるが、最も重要な形成初期の実態がこれで明らかになることが期待される。

本研究では、最新のイメージング法や生化学を駆使して AP 膜形成の最初期過程の解明を目指した。まずこれまで網羅的に解析されていなかった全ての Atg が ER-Mt CS に局在するか検討を行った。その結果をふまえて唯一の膜タンパク質である Atg9 の挙動を動画観察した。Atg9 は小さい小胞に乗って細胞質をうごめいているとの報告がある。詳細を追うために撮影感度を短くすることで小胞の動きを追った。また、なぜ AP 形成が ER-Mt CS で行われるのかを解明するため生化学的単離を試みた。一年かかったが毎回同じように精製できる条件を見つけることができた。現在その精製産物でプロテオミクス解析を行っている。

方法および結果

1. イメージングを用いたオートファゴソーム (AP) 膜形成過程の解析

1) 光学顕微鏡を用いたオートファゴソーム初期形成場の解析

これまで AP 膜形成場を同定するために、ER、Mt、Atg の 3 色同時ライブセルイメージングを行ってきた。同時であることの重要性は、ER も Mt もまた Atg も多少なりとの動きがあり、1 秒以下の差であっても 3 者が同時にその場にいるかを証明することが困難になるからである。カメラ 1 台で 3 色をとる場合、フィルター切り替えにかかる時間で同時と証明できなくなるため、3 台カメラを取り付けることでその問題点を解消した。まず、固定細胞で ER、Mt と全ての Atg の局在を観察した。次に特に AP 膜形成初期に関与する Atg の KO 細胞を用いて他の初期因子の局在への影響を観察した。それらの結果から初期因子も ER-Mt CS に来ることが明らかとなった。次に小胞に乗っている唯一の膜タンパク質である Atg9 との詳細な関係を知るために、動画観察を行った。3 色同時で行っていたが、Atg9 の数が多いこと、動きが細かく、より明瞭に観察するために、2 色での観察に切り替えた。Atg5 は AP のでき始めから AP 膜が完成するまで局在するタンパク質で、形成完成後外れることがわかっている。Atg5 が局在するところが 98 % ER-Mt CS であったことを以前に報告したので、その後の動画解析は Atg5 を用いて行った。その結果、Atg9 小胞も ER-Mt CS に向かっており、また、その場に留まるものと出たり入ったりしているタイプがあることがわかった (図 1)。

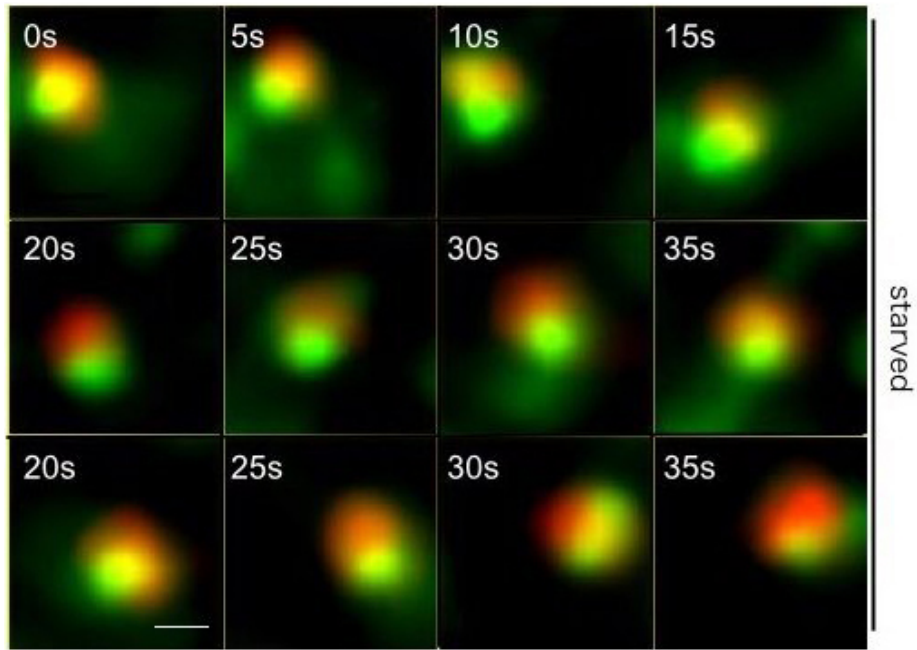


図1. オートファゴソーム初期形成場の動画の展開図

オートファゴソーム形成場（赤）と上流因子（緑）の動画を5秒おきに観察した。2色は30秒以上一緒に局在するのが観察された。Scale bar: 1 μ m.

2) 光顕・電顕相関法による AP 膜形成場の解析

光顕・電顕相関法を用いて AP 膜形成場の膜構造の解明を試みた。この手法は光顕で観察した箇所を電顕で観察する手法で、オートファジーのように細胞内のそれほど多くない箇所ではしか形成されないような現象を観察するのに優れている。観察対象に選んだ箇所として、Atg5 の局在しているところ、あるいは他の初期形成に関わる Atg が局在する場を電顕観察した。その結果、AP が Mt よりに形成されることはなく、常に ER 側で AP 膜形成が行われていることが明らかとなった（図2）。

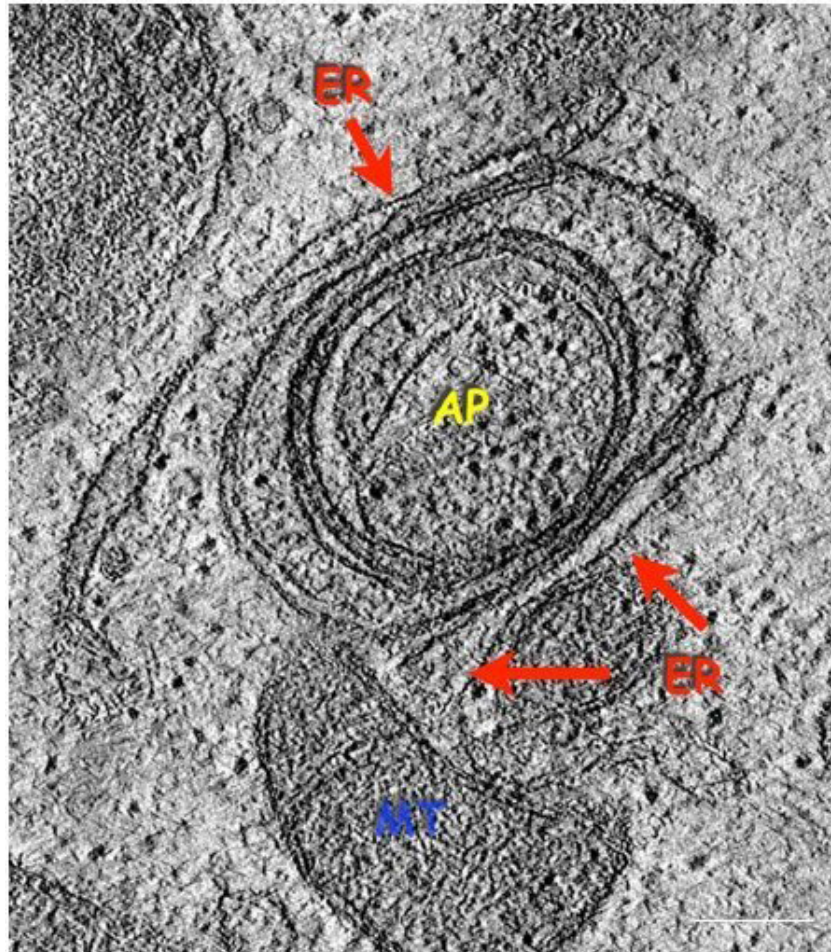


図2. オートファゴソーム形成場の電顕像

オートファゴソーム形成場における小胞体、ミトコンドリア、オートファゴソームの関係性が観察される。Scale bar: 100 nm.

これらは AP 膜がどこからどのように出来るのかという長年の謎解きの一歩になる。また、フォスファターゼの網羅的解析 siRNA 解析から INPP5E が AP とリソソームとの融合に必要なことが明らかとなった。融合がいなくなったことでオートリソソームになれず、AP が溜まっていた²⁾。このフォスファターゼがなくなると PI3P が作られず融合に必要なアクチンポリマーが出来ない。これらはフォスホイノシチドとアクチンのオートファジーにおける新たな役割の発見につながった。

3) ER-Mt CS の単離およびプロテオミクスによる解析

なぜ AP 膜形成が ER-Mt CS で起こるのかの手がかりを得るために生化学的単離を試みた。超遠心で分けられることの報告があり、我々も試していたが、プロテオミクス解析を行うには再現性が重要となるため、まずは綺麗な ER-Mt CS の単離を試みた。色々試したが最終的には細胞破碎で誤差が出ていることがわかったため、そこを一定にできるようなビーズを用いた破碎方法に変え、再現性よく ER-Mt CS 分画を精製することが可能となった。プロテオミクス解析を九大の松本先生にお願いし、現在結果を待っているところである。

考 察

本研究により、謎のまだ多い AP 膜初期形成過程の分子機構の解明が進んだ。多くの初期 Atg が ER-Mt CS に局在し、また、唯一の膜たんぱく質である Atg9 でもその挙動がみられたのは大きい。オートファジーの分子機構の解明は、その生理機能の検証にも役に立つ。我々が最近みつけたダメージを受けたリソソームの除去にオートファジーが関

わるリソファジーは、生活習慣病に関わる可能性を秘めているため注目を得ている。現在、リソファジーの系での仕事も活発に行っているが、分子機構の結果を元に工夫している実験も多くある。本研究はイメージングをベースにしているが、オートファジーはある特定の場所で起こる現象で、また数がすごく多いわけでもないの、生化学的解析では見えてこない現象を捕まえることができると考えている。ER-Mt CS に局在したと観察出来ても必ず細胞質にも局在をするため、画像解析を駆使しないと観察しづらい。また、脂質合成に関与する因子のオートファジー機構への関与は、PI3P がなぜ必要かという分子機構の解明につながった。病気の原因因子ともなっているため、今後も分子機構の解明を基盤とし、オートファジーの生理学的意義の解明にもつなげていきたいと考える。本研究を援助下さった上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

共同研究者

本研究のプロテオミクスの共同研究者は、九州大学・生体防御医学研究所プロテオミクス分野の松本雅記先生及び中山敬一先生である。

文 献

- 1) Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):389-93. doi: 10.1038/nature11910. Epub 2013 Mar 3. PMID: 23455425.
- 2) Hasegawa J, Iwamoto R, Otomo T, Nezu A, Hamasaki M, Yoshimori T. Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome. *EMBO J*. 2016 Sep 1;35(17):1853-67. doi: 10.15252/embj.201593148. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27340123.