

【目的】 オートファジーは、酵母からヒトに至るまで真核生物に共通して備わる細胞内の主要な分解機構である。オートファジーによる分解の対象は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜胞内に隔離され、哺乳類においてはリソソーム、植物や酵母においては液胞に輸送され、分解される。オートファゴソームは、必要に応じて、非常にユニークかつダイナミックなプロセスを経て、全く新規に形成される (図)。オートファゴソームの形成機構に関しては、大隅良典博士らが同定した Atg タンパク質の解析や、小胞体等のオルガネラの関与を中心に研究が進められてきたが、「オートファゴソームが細胞内の何を膜の供給源とし、どのような機構で形成されるのか」という極めて基本的な問題が明らかとなっていない。また、これまで、人工膜小胞を用いて Atg タンパク質の機能解析が進められてきたが、正しい理解のためには実際に Atg タンパク質が機能する膜の脂質組成を知ることが重要である。本研究では、こうした問題の解明に向けてオートファゴソーム膜やその前駆体膜の脂質組成を決定することを目的とした。また同時に、膜の供給源および供給機構を解明するための細胞生物学的解析および生化学的解析もおこなうこととした。

【方法】 オートファゴソームは、Atg9 を含むゴルジ体由来の小胞が“シード”となり、これが他の 10 数種の Atg タンパク質の働きにより“隔離膜前駆体”へ変換され、いずれかのオルガネラから膜の供給を受けて隔離膜が伸張し、形成される (図 1)。特定の遺伝子の欠損細胞をアミノ酸飢餓やラパマイシン処理などのオートファジー誘導条件に置くことで、各オートファゴソーム関連膜を蓄積させ (図)、細胞分画およびこれらの膜に局在するタンパク質を標的とした免疫単離により、各膜標品を調整し、質量分析により脂質組成を決定する。さらに、同条件の細胞から、膜供給源として有力な小胞体などのオルガネラを上記と同様の生化学的手法により単離し、脂質組成を決定する。これらの脂質組成とオートファゴソーム関連膜の脂質組成を比較解析することで、膜の供給源となっているオルガネラを特定する。また、膜供給に関わると考えられる Atg タンパク質に着目し、その分子機能を解析することで膜供給機構の解明を目指す。

【結果】 本研究期間の 1 年間で、シード小胞 (Atg9 小胞) および隔離膜前駆体の単離法を確立し、これらの質量分析による脂質組成解析のための準備が整えることができた。また、単離した Atg9 小胞のプロテオーム解析の結果をもとに、Atg9 小胞の純度を向上するための新たな情報を得た。一方で、COP II 小胞がオートファゴソーム形成における膜供給源であることを明らかにし、脂質組成解析の対象に COP II 小胞も加えるべきであることを示した。加えて、機能未知であった Atg2 タンパク質に隔離膜前駆体を小胞体に繫留する機能があることを示し、さらに Atg2 には膜から脂質分子を引き抜き他の膜へと輸送する活性があることも明らかにした。このような Atg2 の機能の発見は、オートファゴソーム形成における膜伸張機構の解明の鍵となると期待され、試験管内で Atg2 の機能をさらに解析するためには、オートファジー誘導条件での小胞体および隔離膜前駆体の脂質組成を決定することが重要であることが示唆された。

オートファジーの模式図

