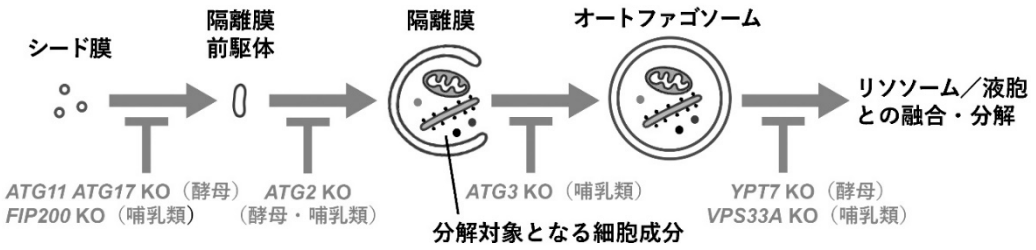
57　リピドミクスに基づくオートファジーの膜動態の解明	中戸川　仁

【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、COPⅡ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COPⅡ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繋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



57. リピドミクスに基づくオートファジーの膜動態の解明

中戸川　仁

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

Key words：オートファジー，オートファゴソーム，脂質，出芽酵母

緒　言

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 1）。分解対象は、タンパク質、RNA などの分子から、オルガネラのような構造体や細胞内に侵入した病原体まで、非常に多岐にわたる。こうした分解対象の多様性を反映して、オートファジーは様々な細胞の恒常性維持や機能制御に重要な役割を果たしており、種々の疾患との関連も明らかにされつつある。

オートファジーの研究は、大隅良典博士によるオートファジーに必須の *ATG* 遺伝子群の同定を発端に飛躍的に発展し、2016 年、同博士のノーベル賞受賞に至ったが、まだ未解明の重要課題が山積している。オートファゴソームの形成機構に関しては、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事柄が明らかとなっていない。膜の供給源は積年の疑問であり、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリアなど、複数のオルガネラが候補として挙げられてきたが、明確な答えは得られていない。各オルガネラの膜タンパク質がオートファゴソーム膜に移行することはなく、タンパク質をマーカーとして“膜の流れ”を追跡することは困難である。したがって、膜の由来を突き止めるには、膜の脂質組成に基づくプロファイリングが必要であると考えられる。

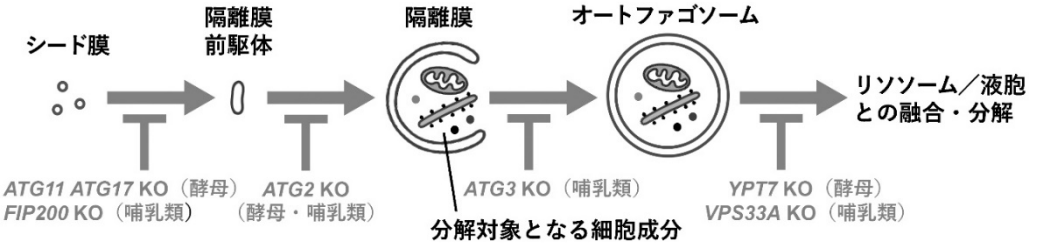


図 1. オートファジーの模式図

オートファジーが誘導されると、シード膜（Atg9 小胞）が隔離膜前駆体を経て隔離膜となり、隔離膜は球状に伸張して閉じ、オートファゴソームが完成する。この過程で分解対象となる細胞成分がオートファゴソーム内に隔離される。オートファゴソームが種々の分解酵素を含むリソソームあるいは液胞と融合し、隔離された細胞成分の分解が達成される。出芽酵母および哺乳類においてオートファゴソームの形成が各段階で停止する遺伝子破壊も合わせて示した。

一方で、オートファゴソーム膜の形成機構の理解には、膜形成を駆動する Atg タンパク質の分子機能の解明も必須である。我々のグループはこれまで、精製タンパク質と人工膜（small／giant unilamellar vesicles）からなる再構成系を用いて、Atg8 の脂質化反応（ホスファチジルエタノールアミンによる修飾反応）の分子機構や、脂質化された Atg8 の

分子機能（膜の繋留と半融合）などを明らかにしてきた。しかし、こうしたタンパク質の反応や機能は、膜の脂質組成に大きく依存することも明らかとなった。すなわち、膜形成のメカニズムを正しく理解するためには、細胞内でのオートファゴソーム形成において、Atg タンパク質が実際に作用する膜の脂質組成を知る必要がある。

以上で述べたように、オートファジーのメカニズムの研究は、脂質解析を中心に据えた新たな展開が不可欠な状況となっている。本研究では、我々のこれまでの研究基盤を活かし、オートファゴソーム膜とその前駆体のリピドミクスを基軸として、未だ多くの謎に包まれているオートファゴソーム形成機構の解明に突破口を開くことを目的とする。

方　法

本研究では、オートファジーの研究を先導してきた優れたモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、免疫沈降を中心とした生化学的手法により、オートファジーに関連する膜構造を単離し、質量分析によりそれらの脂質組成を決定する。また、変異解析および精製タンパク質と人工膜小胞を用いた試験管内解析系を駆使して、膜供給に関わると考えられてきた Atg タンパク質の機能を明らかにし、膜供給源および膜供給機構に関する知見を得る。さらに、蛍光タンパク質を融合した目的タンパク質を発現する酵母細胞を作製し、それらの細胞内での局在や移動を観察する。詳細な方法については、「結果および考察」の項にて都度述べることとする。

結果および考察

1. オートファジー関連膜の単離と解析

オートファゴソーム形成において“シード”となる Atg9 小胞の解析に着手した。Atg9 小胞は、膜貫通型膜タンパク質である Atg9 を含むゴルジ体から形成される直径 50 nm ほどの小胞であるが、その脂質組成は明らかにされていない。Atg9 に GFP および FLAG タグをタンデムに融合し、Atg9 小胞を単離する手法を確立した。図 2 に示したように、タグを付加していない Atg9 を発現する細胞から調整した標品（中央のレーン）と比較して、タグを付加した細胞から調整した標品に特異的なタンパク質のバンドが複数観察された（左レーン）。

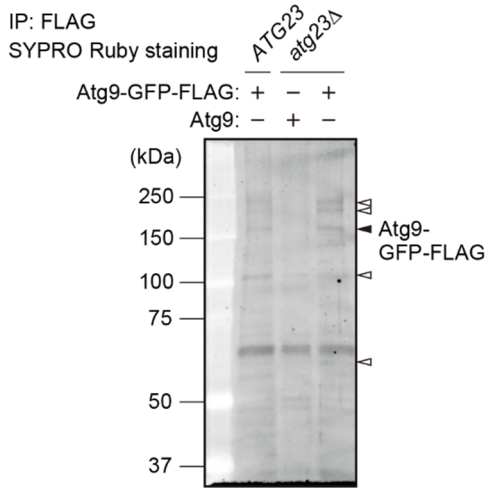


図 2. Atg9 小胞の単離

各出芽酵母を培養後、スフェロプラスト化し、ラパマイシンで 2 時間処理してオートファジーを誘導後、回収し、ポリカーボネートフィルターを通して破砕した。得られた酵母破砕液に抗 FLAG 抗体を結合させた磁性ナノビーズを加え、Atg9 小胞を結合させた。磁性スタンドを用いてビーズを回収後、緩衝液で洗浄し、FLAG ペプチド溶液を用いてビーズから Atg9 小胞を溶出した。得られた画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、SYPRO Ruby 試薬を用いて染色した。白色の矢頭は Atg9-GFP-FLAG を発現する細胞から調整した標品において特異的に見られたバンドを示している。

これらの標品に含まれるタンパク質を質量分析によって網羅的に決定した結果、Atg9 小胞の形成の場と考えられているゴルジ体およびエンドソーム以外のオルガネラタンパク質はほとんど検出されなかったことから、比較的高純度の Atg9 小胞標品が得られたものと考えられる。一方で、これらの標品には、Atg9 小胞として出芽する前の Atg9 を介してゴルジ体およびエンドソームが単離され、混入している可能性が残されている。そこで、Atg9 小胞の形成に必要な *ATG23* を欠損した細胞（ゴルジ体およびエンドソームに Atg9 が蓄積する）から同様にして Atg9 を免疫沈降し、質量分析をおこなったところ、野生型細胞からの単離標品では検出されなかったゴルジ体タンパク質 Tvp15 およびエンドソームタンパク質 Vps21 が検出された。実際にこれらタンパク質に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合し、赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した Atg9 との共局在を調べたところ、野生型細胞においては Atg9 とこれらタンパク質の共局在はほとんど見られなかったが、*ATG23* 欠失細胞では Atg9 とこれらタンパク質の共局在が高頻度に観察された（Tvp15 の結果のみ図 3 に示した）。これらの結果から、これらのタンパク質は Atg9 小胞形成の場に存在するが、Atg9 小胞にはほとんど含まれないことが示唆された。野生株において Atg9 小胞を免疫単離後、これらのタンパク質に付加した別のタグを利用してゴルジ体／エンドソームを免疫除去することでさらに高純度の Atg9 小胞が得られるものと期待される。

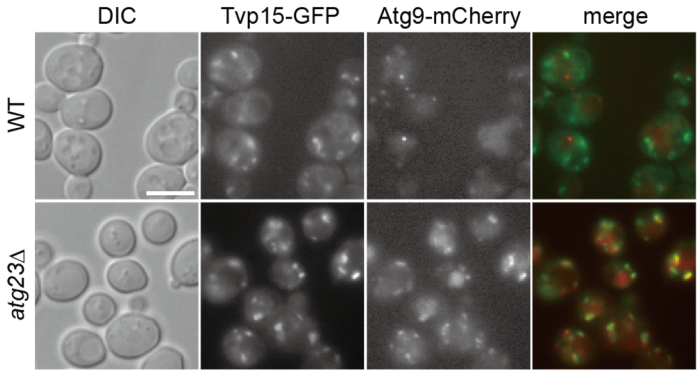


図 3. Atg9 と Tvp15 の細胞内局在

Tvp15-GFP および Atg9-mCherry を発現する各出芽酵母細胞を培養し、蛍光顕微鏡観察をおこなった。DIC : 微分干渉顕微鏡像。Merge : 2 つの蛍光像を重ね合わせたもの。スケールバー : 5 μm。*ATG23* 欠失細胞（*atg23Δ*）においては Atg9-mCherry が野生型細胞（WT）よりも大きな輝点を形成し、これらは Tvp15-GFP の輝点（ゴルジ体）と良く共局在した。

本研究では、隔離膜前駆体の単離もおこなった。これまでの私たちの研究により、*ATG2* 遺伝子を欠失させると隔離膜前駆体が蓄積すること、隔離膜前駆体は Atg9 小胞同士の融合を経て形成されること、隔離膜前駆体は Atg9 小胞には含まれない Atg8（正確にはホスファチジルエタノールアミンと結合した Atg8）を含むことが明らかとなった（未発表データ）。そこで、Atg9-FLAG と GFP-Atg8 を共発現する *ATG2* 破壊細胞をラパマイシンで処理し、上記と同様にして抗 FLAG 抗体結合ビーズを用いて最初の免疫単離をおこなった。*ATG2* 破壊細胞には Atg9 小胞も存在するため、この段階では隔離膜前駆体と共に Atg9 小胞も（そしてわずかにゴルジ体およびエンドソームも）混在している。この標品に対して、抗 GFP 抗体結合磁性ナノビーズを用いて GFP-Atg8 を標的として二段階目の操作をおこない、隔離膜前駆体を単離した。GFP および FLAG タグをタンデムに融合した Atg9（Atg9-GFP-FLAG）を発現する *atg11Δ atg17Δ* 細胞（隔離膜前駆体が形成されない変異細胞）に対して同様の操作をおこない、単離される Atg9 小胞を比較対象とした。それぞれから得られた標品を SDS-PAGE に供し、Sypro Ruby でタンパク質のバンドを可視化した（図 4）。これらの標品を質量分析に供し、含まれるタンパク質を網羅的に同定した結果、隔離膜前駆体の標品に含まれ Atg9 小胞に含まれないタンパク質を Atg8 の他に複数同定することができた。隔離膜前駆体についても、質量分析による脂質成分解析をおこなうに足る純度の標品が得られたものと考えている。

研究期間の 1 年間ではオートファジー関連膜の脂質解析まで到達することはできなかった。しかし、上記の通り、Atg9 小胞および隔離膜前体に関しては準備が整ったと考えており、これらの脂質組成は間もなく明らかになると期待している。

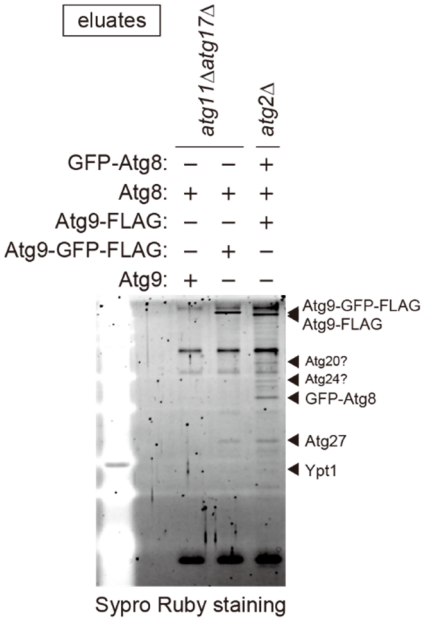


図 4. 隔離膜前駆体の単離

各出芽酵母を培養後、スフェロプラスト化し、ラパマイシンで 1 時間処理した後、破砕し、抗 FLAG 抗体結合磁性ナノビーズを用いて免疫単離をおこなった。FLAG ペプチド溶液を用いて得られた溶出画分に抗 GFP 抗体結合磁性ナノビーズを加え、Atg9 小胞（中央のレーン）および隔離幕前駆体（右レーン）を単離した。Atg9 および Atg8 にタグを付加していない細胞から調整したサンプルをビーズに非特異的に吸着するタンパク質を表すコントロールとした（左レーン）。各標品に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、SYPRO Ruby 試薬を用いて染色した。

2. COPⅡ小胞はオートファゴソーム形成における膜供給源の 1 つである

本研究期間中に、オートファゴソームへの脂質供給源と供給機構に関する重要な知見が得られたので合わせて報告する。COPⅡ小胞は小胞体からゴルジ体への物質輸送に関わる輸送小胞である。COPⅡ小胞の形成はオートファゴソームの形成に重要であること、COPⅡ小胞形成の場である ER exit site がオートファゴソーム形成の場と近接していることなどから、COPⅡ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可能性が以前より議論されてきたが、実験的な証拠は提示されていなかった。私たちは、積荷タンパク質 Axl2（膜貫通型膜タンパク質）を COPⅡ小胞に高度に積み込ませることができる実験系を利用して、この積み荷タンパク質が小胞体から COPⅡ小胞を経由して隔離膜に移行することを蛍光顕微鏡および免疫電子顕微鏡解析によって明示することに成功した。すなわち、COPⅡ小胞がオートファゴソームを形成するための膜供給源の一つであることを示した［1］。オートファジー誘導時には特殊な COPⅡ小胞が形成される可能性も考えられる。本研究においてオートファジー関連膜の脂質組成解析をおこなう上で、COPⅡ小胞も重要なターゲットとして加えるべきであることが示された。

3. Atg2 の膜繋留機能と脂質輸送活性の発見

オートファゴソーム形成に重要なAtg2の分子機能はこれまで未知であった。私たちは出芽酵母からAtg2を単離し、試験管内で解析することにより、Atg2に2つの膜結合ドメインがあること、これらの膜結合ドメインを使ってAtg2は2つの人工膜小胞を繋ぎ合わせる機能を有していることを明らかにした。さらに、細胞内においては、Atg2は隔離膜前駆体および隔離膜を小胞体に繋ぎ留める役割を果たしていることが示唆された [2]。前述したCOPⅡ小胞の隔離膜前駆体／隔離膜への融合とこのようなAtg2の機能との関係の解明が今後の課題である。

一方で、共同研究者である微生物化学研究所の野田展生博士のグループは、Atg2には脂質分子を膜から引き抜き、別の膜に輸送する活性（脂質輸送活性）があることを示した [3]。すなわち、Atg2によって形成される小胞体と隔離膜との接触部位において、COPⅡ小胞を介した膜輸送とAtg2による脂質分子の直接輸送が起きている可能性が考えられる。これら2つの輸送機構の関係の解析も今後の課題である。また、このようなAtg2の分子機能を正しく理解するためにも、小胞体および隔離膜前駆体／隔離膜の脂質組成を決定することが重要である。

共同研究者・謝辞

本研究において、タンパク質の質量分析は横浜市立大学先端医科学研究センター 木村弥生准教授に依頼した。

文　献

1） Shima T, Kirisako H, Nakatogawa H. COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. J Cell Biol. 2019 May 6;218(5):1503-1510. doi: 10.1083/jcb.201809032. Epub 2019 Feb 20.

2） Kotani T, Kirisako H, Koizumi M, Ohsumi Y, Nakatogawa H. The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. Proc Natl Acad Sci USA. 2018 Oct 9;115(41):10363-10368. doi: 10.1073/pnas.1806727115. Epub 2018 Sep 25.

3） Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. Nat Struct Mol Biol. 2019 Apr;26(4):281-288. doi: 10.1038/s41594-019-0203-4. Epub 2019 Mar 25.