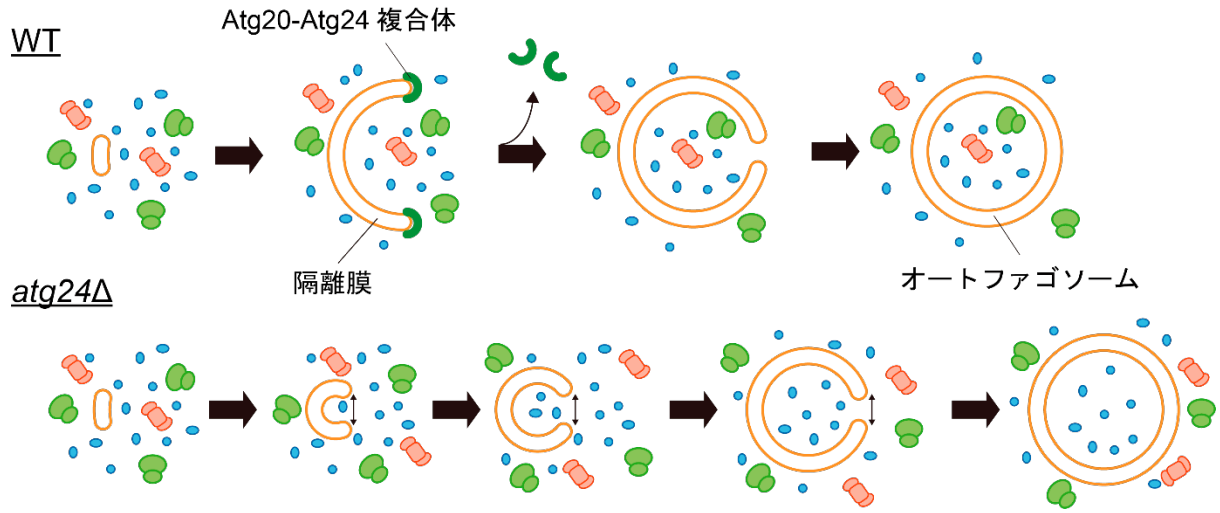
223　オートファジーにおける新たな基質選択機構の解明	小谷　哲也

【目的】オートファジーはタンパク質などの細胞質成分や細胞小器官を分解する機構であり、酵母からヒトに至るまで真核生物に広く保存されている。栄養飢餓などによりオートファジーが誘導されると、細胞質に「隔離膜」と呼ばれる扁平な小胞が現れる。隔離膜は細胞質の一部を取り込みながら球状へと伸張し、閉じることで、二重の膜構造を持ったオートファゴソームが形成される。完成したオートファゴソームは酵母の場合、液胞と融合し、液胞の内部にある分解酵素によってオートファゴソームの内容物が分解される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究により、オートファジーに関わる *ATG* 遺伝子／Atg タンパク質が同定され、オートファジーの分子機構の理解が飛躍的に進んだ。しかし、オートファゴソームの形成機構や分解基質の選択性決定機構にはまだ多くの謎が残されている。Atg20 - Atg24 複合体はミトコンドリアやペルオキシソーム、リボソーム、プロテアソーム、脂肪酸合成酵素のオートファジーによる分解に必要であることが報告されているが、Atg20 - Atg24 複合体の具体的な機能は明らかとなっていない。本研究では Atg20 - Atg24 複合体が隔離膜の開口端の曲率を認識して局在化し、開口端の大きさを維持あるいは拡張して、オートファゴソームへの巨大分子の取り込みを可能にしているという仮説を検証し、隔離膜の開口端の大きさ制御による基質選択という新たなメカニズムを提唱することを目的とした。

【方法】大きさの異なるモデル基質を用い、それらのオートファジーによる分解の効率を野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞とで比較し、基質の大きさが分解効率に与える影響を解析した。また、野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞においてオートファゴソームに取り込まれる細胞質成分を質量分析で同定し、量の比較を行い、Atg20 - Atg24 複合体依存的にオートファゴソームに取り込まれる因子の特徴を解析した。さらに Atg20 - Atg24 複合体の欠失または過剰発現がオートファゴソーム形成に与える影響について解析した。

【結果】本研究でのモデル基質を用いた解析やオートファゴソームに取り込まれる基質の網羅解析から、大きい分子ほど Atg20 - Atg24 複合体に強く依存してオートファゴソームに取り込まれることが示唆された。電子顕微鏡解析により *ATG24* 欠失細胞では隔離膜の開口部が狭くなることが明らかとなった。また、Atg20 - Atg24 複合体を過剰発現させると、オートファジーに欠損が生じた。隔離膜の開口端から Atg20 - Atg24 複合体が解離しにくくなり、開口部が閉じにくくなったことを示唆する結果を得た。

オートファゴソーム形成における Atg20 - Atg24 複合体の役割に関するモデル図



223. オートファジーにおける新たな基質選択機構の解明

小谷　哲也

東京工業大学 生命理工学院

Key words：オートファジー，オートファゴソーム，隔離膜，基質選択，出芽酵母

緒　言

オートファジーはタンパク質などの細胞質成分や細胞小器官を分解する機構であり、酵母からヒトにいたるまで真核生物に広く保存されている。栄養飢餓などによりオートファジーが誘導されると、細胞質に「隔離膜」と呼ばれる扁平な小胞が現れる。隔離膜は細胞質の一部を取り込みながら球状に伸張し、閉じることで、二重の膜構造を持ったオートファゴソームが形成される。完成したオートファゴソームの外膜が酵母の場合、液胞と融合し、オートファジックボディと呼ばれる内膜小胞が液胞内に放出される。その後、液胞の内部にある分解酵素によってオートファジックボディの膜とその内容物が分解される。オートファジーには、分解産物を栄養源として供給する以外にも、機能不全となった細胞小器官や細胞内に侵入した病原体の分解といった機能もあり、様々な疾患との関連も報告されている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究により、オートファジーに関わる *ATG* 遺伝子／Atg タンパク質が同定され、オートファジーの分子機構の理解が飛躍的に進んだ。しかし、オートファゴソームの形成機構や分解基質の選択性決定機構にはまだ多くの謎が残されている。

細胞質成分が無作為にオートファゴソームに取り込まれる場合を“非選択的オートファジー”、特定の分解対象が選択的に取り込まれる場合を“選択的オートファジー”と呼ぶ。出芽酵母におけるこれまでの研究により、Atg20 - Atg24 複合体（以下、Atg24 複合体）は、ミトコンドリアやペルオキシソームの選択的オートファジーに重要であるが、非選択的オートファジーには必要ないことが示された［1，2］。さらに最近、オートファジーによるリボソームやプロテアソーム、脂肪酸合成酵素の分解にも Atg24 複合体が重要であることが報告された［3，4］。これらは全て細胞質に豊富に存在する分子量 200 万以上の超分子複合体であり、リボソームについては、オートファゴソーム内に細胞質とほぼ同じ濃度で取り込まれていることが電子顕微鏡解析により示されている［5］。一方、Pgk1 など小さなタンパク質のオートファジーによる分解は、Atg24 複合体に依存しない。既知の選択的オートファジーにおいては、分解対象はそれぞれに特異的なレセプター分子に認識され、アダプター分子 Atg11 の働きを介してオートファゴソームに取り込まれるが、リボソーム、プロテアソーム、脂肪酸合成酵素の分解は Atg11 を必要としない。私たちは、最近、*ATG24* 欠失細胞において、数、サイズ共に、ほぼ正常にオートファゴソームが形成されること、それにもかかわらず、オートファゴソーム内にはリボソームがほとんど取り込まれていないことを明らかにした。さらに、Atg24 複合体は隔離膜の開口部にリング状に局在化することを発見した。Atg20 および Atg24 は共に、膜を曲げる、もしくは膜曲率を認識する Bin-Amphiphysin-Rvs167（BAR）ドメインを含む。Atg24 複合体は隔離膜の開口端の曲率を認識して局在化し、開口端の大きさを維持あるいは拡張して、オートファゴソームへの巨大分子の取り込みを可能にしている可能性が考えられる。本研究では、このような仮説を検証し、隔離膜の開口端の大きさ制御による基質選択という新たなメカニズムの提唱を目指す。

方法および結果

1.　オートファジーによるモデル基質の分解の Atg24 複合体の依存性

Atg24 複合体が伸張中の隔離膜の開口部の大きさを制御し、サイズ排除の原理に基づき基質を選別している可能性を

検証するため、サイズの異なる巨大分子複合体をモデル基質として用い、解析を行った。本研究ではモデル基質として *Aquifex aeolicus* 由来の RibH および *Listeria monocytogenes* 由来の Dps を用いた（図 1a)。それぞれ球状のホモ六十量体とホモ十二量体を形成することが知られている。これらの C 末端に GFP を融合し、オートファジーによる分解について解析した。GFP を融合すると、RibH - GFP 複合体は直径約 25 nm（リボソームとほぼ同じ大きさ)、Dps - GFP 複合体は直径約 20 nm の球状になると考えられる。RibH - GFP の分解について解析を行うと、野生型細胞でみられるオートファジーによる分解によって生じた GFP の断片が *ATG24* 欠失細胞ではほとんど見られなかった（図 1b)。このことから Atg24 複合体がないときには RibH - GFP はオートファゴソームに取り込まれないことが分かった。それに対し、Dps - GFP の場合、*ATG24* 欠失細胞でも野生型細胞に比べ欠損はあるものの、GFP の断片が検出され、Atg24 複合体がなくても Dps - GFP はオートファゴソームに取り込まれることが分かった（図 1c)。これらの結果から Atg24 複合体は大きな基質をオートファジーで分解するために必要な因子であることが示唆された。

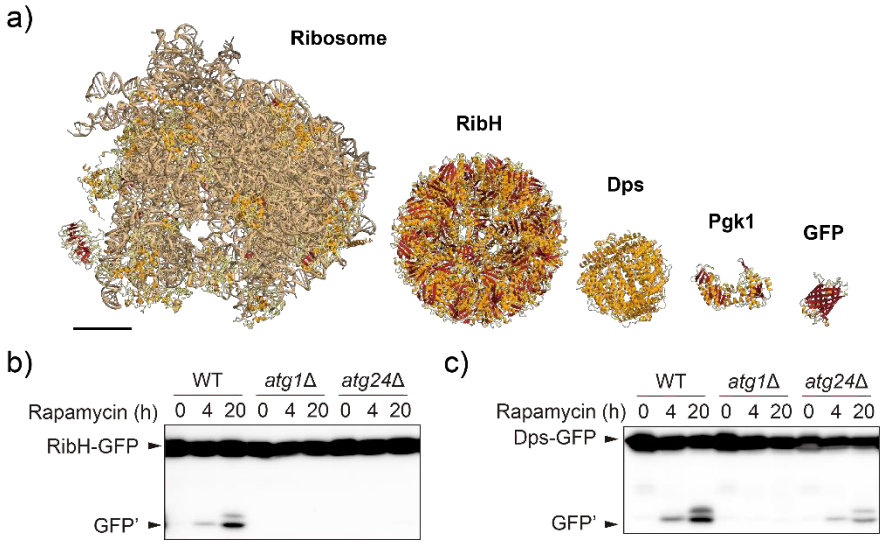


図 1. オートファジーによるモデル基質の分解の Atg24 複合体の依存性

a) Ribosome (PDBID : 4V7R)、RibH (PDBID : 5MPP)、Dps (PDBID : 2IY4)、Pgk1 (PDBID : 1FW8)、GFP（PDBID : 4KW4）の構造。スケールバー : 5 nm。

b、c) GFP を融合した RibH（b）もしくは Dps（c）を発現する各出芽酵母を対数増殖期中期まで培養後、ラパマイシンで処理した。細胞抽出液を SDS-PAGE で分離し、抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングにより、RibH - GFP、Dps - GFP の分解を解析した。GFP'はオートファジーによって RibH - GFP や Dps - GFP が分解された結果、液胞内に蓄積した GFP 断片を示し、オートファジーによる分解の指標となる。

2. Atg24 複合体依存的にオートファゴソームに取り込まれる細胞質成分の網羅解析

Atg24 複合体に依存してオートファジーによって分解される細胞質成分を網羅的に探索した。出芽酵母において液胞内酵素を不活性化すると液胞内にオートファジックボディが蓄積する。野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞において液胞内に蓄積させたオートファジックボディ内に含まれるタンパク質を質量分析により網羅的に同定し、比較することで、Atg24 複合体依存的にオートファゴソームに取り込まれる細胞質タンパク質を明らかにすることを試みた。まずオートファジックボディを蓄積させた液胞を遠心分離により単離し、液胞膜をフィルターで破砕後、さらに遠心分離を行いオートファジックボディが濃縮した沈殿を得た。この沈殿画分に Triton X-114 を加え、疎水性タンパク質を含む界面活性剤層と親水性タンパク質を含む水層に分離した。この水層にはオートファジックボディ内に取り込まれた細胞質タンパク質が濃縮されていると考え、この画分を質量分析に供した。結果をまとめたものを図 2 に示す。これまでの報告の通り、*ATG24* の欠失によりリボソームやプロテアソームが減少していた。これら以外に、*ATG24* の欠失によ

り減少したものには、リボソームに結合する因子や翻訳因子など、大きな複合体を形成すると考えられるものが多く含まれていた。さらに、Atg24 複合体に依存してオートファゴソームに取り込まれる因子として機能未知のタンパク質 X を同定した。このタンパク質 X は分子量が小さいが、細胞内では比較的大きな複合体として存在することを示唆する結果を得た。この網羅的解析からも Atg24 複合体は大きな基質をオートファジーによって分解するために必要な因子であることが示唆された。

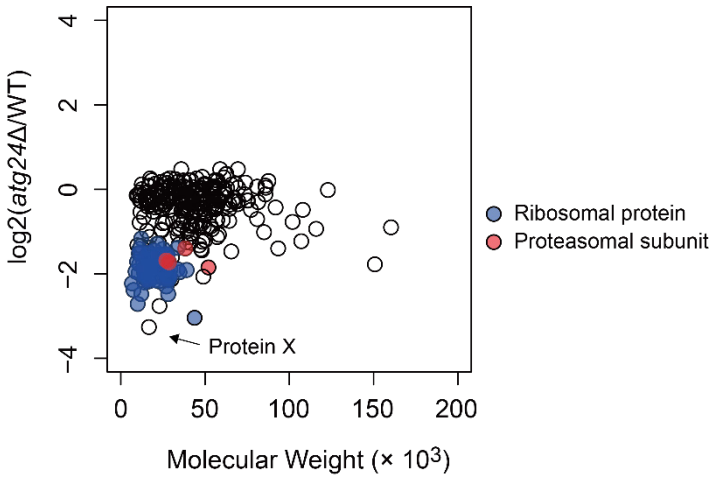


図 2. Atg24 複合体依存的にオートファゴソームに取り込まれる細胞質成分の網羅解析

野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞においてオートファジックボディを蓄積させた液胞を単離後、液胞膜を破砕し、遠心分離によりオートファジックボディが濃縮した沈殿を得た。さらに Triton X-114 処理を行い、水層画分に含まれるタンパク質を質量分析により同定した。それぞれのタンパク質について野生型細胞由来のサンプルに含まれる量に対する *ATG24* 欠失細胞由来のサンプルに含まれる量の比を縦軸に、分子量を横軸にプロットしたものを示す。

3. Atg24 複合体の欠失または過剰発現が隔離膜に与える影響

Atg24 複合体は伸張中の隔離膜の開口部に局在化し、大きな基質をオートファゴソームに取り込み分解するために必要であることから、Atg24 複合体が隔離膜の開口部を拡張もしくは大きく維持していると考えられる。そこで野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞での隔離膜の開口部の大きさを電子顕微鏡で観察した。どちらの細胞においてもリング状の膜構造体（オートファゴソームもしくは隔離膜）と C 字状の膜構造体（隔離膜）が観察され（図 3a）、*ATG24* 欠失細胞での C 字状の構造体の開口部の大きさは野生型細胞での大きさと比較して狭くなっていた（図 3b）。

次に Atg24 複合体の過剰発現がオートファゴソーム形成に与える影響について解析した。まずオートファジーの活性について解析したところ、Atg24 複合体の過剰発現細胞ではオートファジーに強い欠損を示した。さらにオートファゴソーム形成のどのステップに欠損があるのかを解析するために、隔離膜やオートファゴソームに局在化する Atg8 に GFP を融合し、蛍光顕微鏡で観察した。野生型細胞では隔離膜やオートファゴソームはリング状に観察されたが、Atg24 複合体を過剰発現すると、Atg8 陽性の伸びた構造体が蓄積することが明らかとなった（図 3c）。さらに Atg24 複合体を過剰発現した細胞を電子顕微鏡で観察すると、リング状の膜構造体とともに隔離膜と思われる C 字状の膜構造体が観察された（図 3d）。これらのことから Atg24 複合体を過剰発現すると隔離膜の伸張の途中で遅延していることが示唆された。

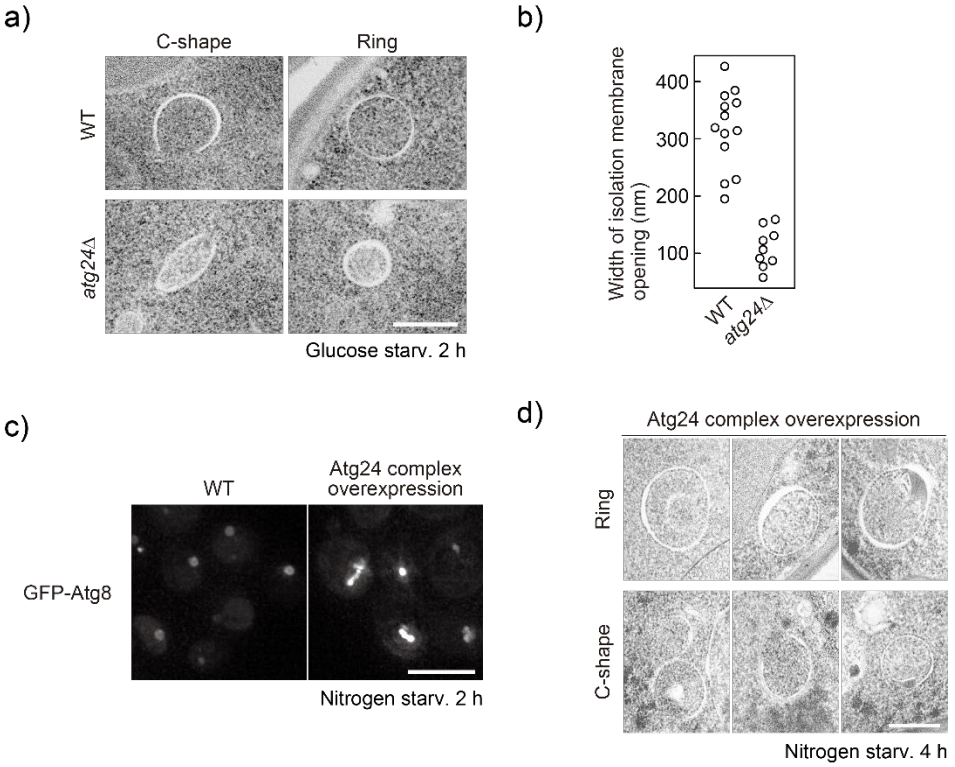


図 3. Atg24 複合体の欠失または過剰発現が隔離膜に与える影響

a) 野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞のオートファジー関連構造体（オートファゴソーム、隔離膜）を電子顕微鏡で観察した。炭素源をグルコースからグリセロールへと移行して 2 時間培養し、オートファジーを誘導した。スケールバー：500 nm。

b) C 字状の構造体の開口部を測定した結果を示す。

c) Atg24 複合体を過剰発現した細胞のオートファジー関連構造体を蛍光顕微鏡により解析した。窒素飢餓培地で 2 時間培養し、オートファジーを誘導した。Z 軸方向に 0.2 μm ごとに 25 枚撮影し、最大値投影処理を行った図を示す。スケールバー：5 μm。

d) Atg24 複合体過剰発現細胞において蓄積する構造体を電子顕微鏡で解析した。窒素飢餓培地で 4 時間培養し、オートファジーを誘導した。スケールバー：500 nm。

考　察

本研究の解析から、大きい分子ほど Atg24 複合体に強く依存してオートファゴソームに取り込まれることが示唆された。また、電子顕微鏡を用いた観察により、*ATG24* 欠失細胞では隔離膜の開口部が狭くなっていることが明らかとなった。これらの結果から Atg24 複合体が伸張中の隔離膜の開口部の大きさを維持あるいは拡張して、オートファゴソームへの巨大分子の取り込みを可能にしていると考えられる（図 4）。隔離膜の開口端は膜曲率が高く非常に不安定である。Atg24 複合体が存在しない場合には、不安定な領域をできるだけ狭くするために開口部が狭くなり、オートファゴソームから大きい分子が排除されていると考えられる。Atg24 複合体が分子サイズに基づく基質選択性をなくすことで、非選択的オートファジーにおける“非選択性”を付与していると言える。Atg24 複合体に依存して巨大分子を分解する生理的意義はまだよくわかっておらず、明らかにすることが今後の課題である。

Atg24 複合体の発現量が増えると、隔離膜の開口端が大きくなる可能性が考えられた。Atg24 複合体を過剰発現させた細胞では隔離膜が閉じ難くなっていることが示唆されたが、開口部が大きくなっているかについては野生型細胞との詳細な比較が必要である。隔離膜は開口端を拡げた状態で伸張したあと、最終的に開口端を狭め、口を閉じることでオートファゴソームが完成する。開口端が狭まるためには、Atg24 複合体が開口端から解離する必要があると考えられ

る。Atg24 複合体を過剰発現すると、Atg24 複合体の開口端からの解離が阻害され、開口端が狭まるのが遅延しているのではないかと考えられる。Atg24 複合体の隔離膜への結合と解離は厳密に制御されていると考えられるが、その詳細なメカニズムについてはまだ不明である。

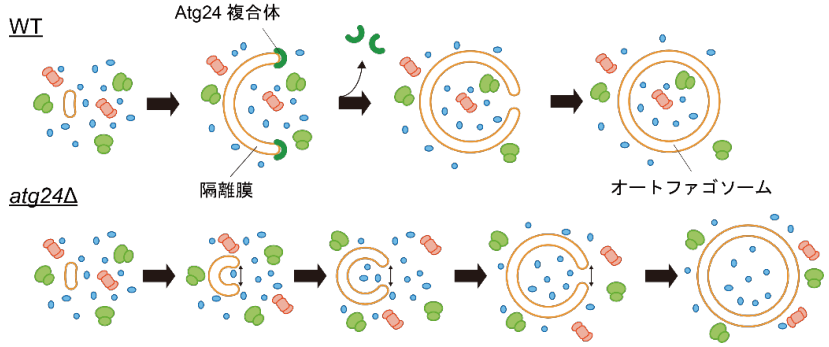


図 4. オートファゴソーム形成における Atg24 複合体の役割に関するモデル図
野生型細胞では隔離膜が伸張中、Atg24 複合体が隔離膜の開口端に結合することで開口端が拡がり、大きな分子をオートファゴソーム内に取り込むことが可能となる。その後、Atg24 複合体が開口端から解離し、開口端が狭まり、口が閉じることでオートファゴソームが完成する。*ATG24* 欠失細胞では開口端を拡げることができず、大きな分子のオートファゴソームへの取り込みが阻害される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京工業大学生命理工学院の中戸川仁准教授、東京工業大学科学技術創成研究院の田口英樹教授、丹羽達也助教である。

文　献

1) Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. J Biol Chem. 2002 Aug 16;277(33):30198-207. doi: 10.1074/jbc.M204736200. Epub 2002 Jun 4. PMID: 12048214; PMCID: PMC2754692.

2) Kanki T, Klionsky DJ. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. J Biol Chem. 2008 Nov 21;283(47):32386-93. doi: 10.1074/jbc.M802403200. Epub 2008 Sep 25. PMID:18818209; PMCID: PMC2583303.

3) Shpilka T, Welter E, Borovsky N, Amar N, Shimron F, Peleg Y, Elazar Z. Fatty acid synthase is preferentially degraded by autophagy upon nitrogen starvation in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 3;112(5):1434-9. doi: 10.1073/pnas.1409476112. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25605918; PMCID: PMC4321280.

4) Nemec AA, Howell LA, Peterson AK, Murray MA, Tomko RJ Jr. Autophagic clearance of proteasomes in yeast requires the conserved sorting nexin Snx4. J Biol Chem. 2017 Dec 29;292(52):21466-21480. doi: 10.1074/jbc.M117.817999. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29109144; PMCID: PMC5766950.

5) Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. J Cell Biol. 1992 Oct;119(2):301-11. doi: 10.1083/jcb.119.2.301. PMID: 1400575; PMCID: PMC2289660.