

研究報告書

「ナノスケール細胞内位置情報・3次元超微細膜構造を基盤とするオートファジータンパク質ネットワークの相関構造解析」

研究タイプ: 通常型

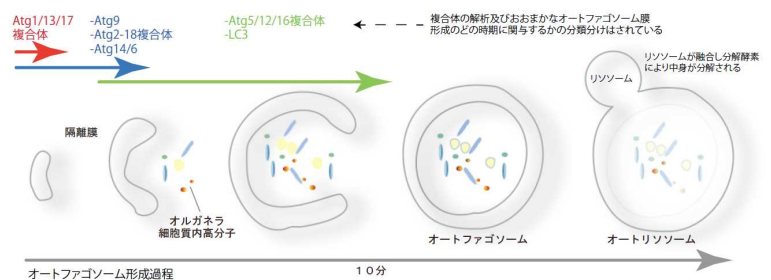
研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 濱崎 万穂

1. 研究のねらい

全ての真核細胞は、飢餓時や不要物除去が必要な際に、自己の細胞質やときにはオルガネラまでをリソソームに運び分解・再利用するオートファジーと呼ばれる機構を持つ。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病気での重要な役割を担うことが分かり注目を集めている。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平の2重の脂質膜を持つ膜が出現し、伸張しながらオルガネラや細胞質等を取り囲みオートファゴソーム(AP)が形成され、分解酵素を持つリソソームと融合して内容物が消化される。AP は他のオルガネラと異なり必要時に初めて膜形成が起こるため、どこでどのように膜が形成されるのか興味深く解明されていない点が多い。1993年にオートファジーに関する一連のタンパク質群 Atg が、申請者が学位を取得した大隅良則研究室において酵母で発見されたことで、その実態や生理的病理的意義の理解が急速に進んだ。約30個見つかった Atg たんぱく質は、幾つかの機能ユニットに分かれ、相互に作用しながら協働して AP の形成に働いている。Atg たんぱく質個々の構造解析や分子生物学的解析はこれまで盛んに行われてきたが、これらがいつ、どこで、どのような相互作用を持ち強調して AP 膜を形成するのかは未だ明らかにされていない。

本研究のねらいは、AP 膜形成機構の全容解明に少しでも近づくため、様々なイメージングツールを駆使することで特に AP 形成場に着目し研究を行った。



2. 研究成果

(1) 概要

オートファゴソーム(AP)膜の形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位で起こることがわかったが、更に詳細な解析を行うため、いくつかのイメージングツールや生化学的手法を用いることで行った。

a) オートファゴソーム形成場の膜動態の詳細な解析

オートファゴソーム形成場を改良された CLEM (Correlative light and electron microscopy) に tomography を組み合わせることで小胞体・ミトコンドリア接触部位との関係性を探るべく観察を行った。改良型 CLEM では、 x, y の位置のみならず z 情報もナノスケールで位置を合わせることができる。トモグラフィーは、3D 情報が得られるため、構造物がチューブの形態なのか小胞なのか等クリアにできる。また、オートファゴソーム形成場である小胞体・ミトコンドリア接触部位と Atg 因子との関係性を光学顕微鏡を用いて行った。様々な Atg 因子が小胞体・ミトコンドリア接触部位とどのような関係にあるのか最上流因子を主に解析した。

b) オートファゴソーム形成に関わる新規因子の探索

小胞体・ミトコンドリア接触部位は生化学的単離が可能なため、オートファジー誘導時の小胞体・ミトコンドリア接触部位を単離しプロテオミクス解析を行った。また、オートファジーは細胞内膜動態の一種なので、小胞体からの輸送経路に関与する因子と AP 膜形成の関与を調べることで新たな因子のスクリーニングを行った。

c) 未知の構造体であるプレオートファゴソーム構造(PAS)の同定

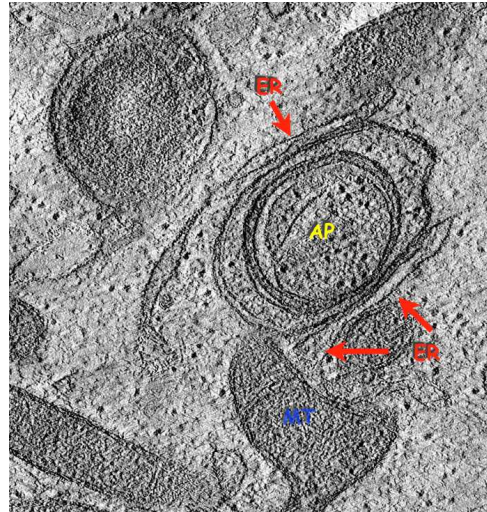
CLEM の手法で、酵母のオートファゴソーム初期形成場の観察も行った。酵母では、すべての Atg が集積する PAS (Pre-autophagosome structure) が液胞そばに形成されるがその詳細は未だわかっておらず、CLEM 及びトモグラフィーを用いることでどのようなものなのか解析した。

(2) 詳細

a) オートファゴソーム形成場の膜動態の詳細な解析

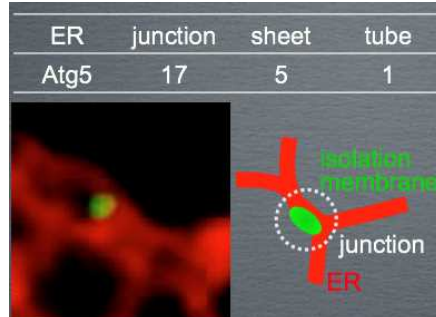
AP 膜形成場である小胞体・ミトコンドリア接触部位と AP 膜との関係を CLEM にトモグラフィーを組み合わせた手法で観察を行った。その際に AP 膜形成の比較的初期に関わる因子である PI3 キナーゼ複合体の因子を用いた。その結果、AP 膜はほぼ ER よりにできており、ミトコンドリアと接触している AP はみられなかった。

このことは、AP 膜形成により関わっているのは小胞体だと推測されるがなぜ小胞体・ミトコンドリア接触部位で形成されるのかは今後の課題として残る。次に、AP 膜形成の最上流因子らの観察を行った。オートファジー誘導シグナルを細胞が感知するまでは、ほとんどの Atg タンパク質は細胞質に存在する。しかしながら、オートファジー誘導が起こると輝点が形成される。PI3 キナーゼ複合体の因子らによりその輝点が小胞体・ミトコンドリア接触部位と判明したが、その更に上流にいる因子(Ulk1, Atg9)の輝点も小胞体・ミトコンドリア



接触部位に来ることがわかった。Atg9 は 30 以上ある Atg の中で唯一の膜タンパク質として知られ、20–30nm の小胞にのっていることがわかっている。Atg9 の詳細な挙動を観察し、小胞体・ミトコンドリア接触部位に長く存在するものと短く存在するものがあることがわかった。また、Atg9 は小胞だけではなくリサイクリングエンドソームにも存在することがわかっている。リ

サイクリングエンドソームとAP膜形成場との間の輸送に必要なドメインも明らかにした。また、小胞体よりAP膜が形成されるため、小胞体の形態変化がもたらすAP膜形成への影響を観察した。形成開始後10秒ほどでAP形成は小胞体のジャンクション(トライポッド形成されている箇所)に局在し、形成が終わるまでそこに留まることが観察された。小胞体は脂質を産生する場所でもあるため、脂質の供給を得ているのか、あるいは、小胞体のジャンクションは動きが少なくAP膜形成の間そのような場所が必要なのかは定かではない。ジャンクションをより安定的に保つために必要なタンパク質があり、それが局在するところでAP膜が形成されることから、今後理由を明らかにしていきたい。また、AP膜は完成後分解酵素をもつリソソームと融合するわけだが、リソソームがどのようにAP膜形成途中のものではなく完成したAPを認識するのかわかっていなかった。そこには新規の因子であるフォスファターゼ INPP5Eが関与することがわかった。この仕事は採択者主体で行ったわけではないが関与しているので記述する。この因子はリソソーム側の制御をしており、リソソーム膜上のPI3, 5P2を減らすことでアクチンが安定化し融合することが可能になることが解明された。AP膜形成は完成するまで小胞体・ミトコンドリア接触部位で行われるが、リソソームとの融合には形成部位から移動する。AP膜形成完成後新たな因子がきてその移動を促すのか等考えらえるがこれも今後の課題である。

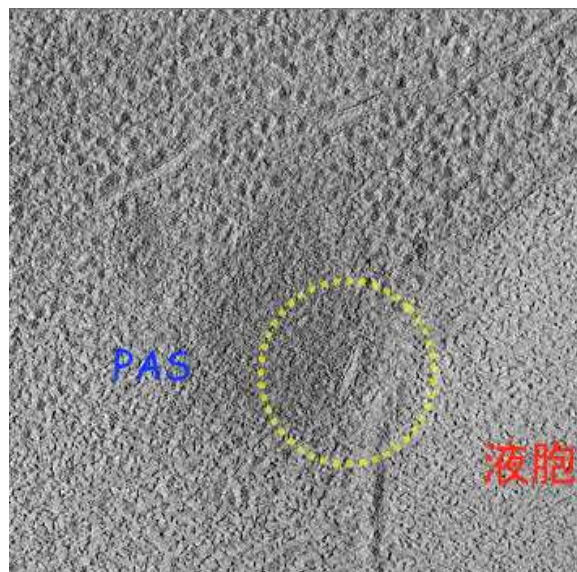


b) オートファゴソーム形成に関わる新規因子の探索

APとリソソームの融合に関わる因子、あるいはAP膜形成に関わる新たな因子探しをするために、概要に書いたスクリーニングを行った。その中で、AP膜形成に関与する最上流因子の局在に影響を示す因子が見つかった。その因子がないと、最上流因子らが小胞体・ミトコンドリア接触部位にこられないことがわかった。詳細解析は現在行っている最中である。

c) 未知の構造体であるプレオートファゴソーム構造(PAS)の同定

オートファジーは酵母から哺乳類まで保存されている。2001年に大隅先生らが全てのAtg因子が局在する輝点、プレオートファゴソーム構造(PAS)を報告したが、どのような構造をとっているのか明らかにされていなかった。そこでCLEM及トモグラフィーを用いることで、どのような構造体があり、AP膜形成がどのように行われるのか解析した。その結果、液胞膜近くに細胞質を排除したグレーの構造物がみえた。タンパク質の集まった構造体はこのようなグレーに見えることからタンパク質が集積した場所であることがわかる。また、小さな2重膜のかげらがそのグレー構造に沿って出現している様子も観察された。そしてその膜は液胞側で見られることが多く、グレーの構造と液胞の間



で AP 膜が形成されることが示唆された。

3. 今後の展開

さきがけの援助のおかげで小胞体・ミトコンドリア接触部位と AP 膜形成機構の理解を飛躍的に進めることができた。なぜ小胞体・ミトコンドリア接触部位なのかはまだ解明しきれないので今後進めていくことで意義がわかると AP 膜の起源にもつながり非常に興味深い。大きな展望は AP 膜形成における膜動態の全容解明だが、まずは小胞体の形態関与等含め論文としてまとめていく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さきがけに採択して頂けたおかげで、阪大内に場所を提供して頂きラボを立ち上げさせてもらえた。さきがけの資金の支援によりそれが可能となり、立ち上げにはそれなりの時間がかかったが、色々学ぶことができた。ただ振り返ると、総括が最初の年にオンサイトに来てくださった時に頂いた助言を生かしきれなかったと感じる。自分のことをメインに進めるということに重きをおけなかった。独立したわけではないので、他の学生の世話もあり、どの学生にどのテーマをやってもらうか等含めた采配も甘かったので勉強にはなった。自分が実験を卒業し学生の面倒をみる、という役割にまわる時期と重なり、起動に乗る前にさきがけスタートとなった。今振り返るとそういう状況がわかるが当初は見えてなかったように思う。色々未熟だったがさきがけのおかげで今後の研究を行う上でのノウハウを学ばせて頂く機会となった。また、資金のみならず、採択された他の研究者及びアドバイザーの先生方との出会いは今後の糧にしかならない。おかげさまで、採択者内で共同研究も始まり是非成果として報告できるよう引き続き継続していく。新たな共同研究も始められる可能性もあり、細胞生物学のみやってきた人生で構造生物学の方らと出会えたことは非常に有用だと感じている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

光学顕微鏡と電子顕微鏡を使ってオートファゴソーム(AP)の形成機構を調べるというとても興味深いテーマの研究である。小胞体(ER)とミトコンドリアが接触している部分から AP の膜形成が行われること、AP 形成に関係する因子が ER とミトコンドリアが接触している AP 形成部位に局在していることを明らかにした。光学顕微鏡・電子顕微鏡相関法(CLEM)と電子線トモグラフィーによる3次元超微細膜構造観察による解析に力を入れたところが研究のユニークな点であり、細胞生物学的には進展があった。

簡単なテーマではないので、今後、他の手法を持った研究者と協力して進めていくのがのぞましい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, Noda T, Yoshimori T. [Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation.](#) J Cell Sci. 2016 Oct 15;129(20):3781–3791.
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.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(口頭発表)

第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016.11.30

第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016.6.17

ASCB annual meeting, San Diego, 2015.12.15

IRB cell biology seminar, Barcelona, 2016.9.16

第34回日本糖質学会年会、東京、2015.8.2