

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12608
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K18339
研究課題名(和文)オートファゴソーム形成中間体の隔離膜凹面によるカーゴ集積機構についての解析

研究課題名(英文) Analysis of cargo accumulation mechanism to concave face of the isolation membrane

研究代表者
山崎 章徳 (Yamasaki, Akinori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：80623884
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：選択的オートファジーのモデル経路である、出芽酵母の液胞加水分解酵素輸送経路であるCvt経路のカーゴApe1を用いてカーゴ集積機構の解析を行った。オートファゴソーム前駆体をミミックするようなGUVを用いたオートファゴソームへの取り込み過程のin vitro再構成実験から、Ape1が野生型で液滴の性質を持つときはApe1の表面に沿ってGUV膜が屈曲しGUV内部に取り込まれる様子が観察されたが、Ape1が凝集化しているとGUV膜の屈曲は起こらなかった。このことから、カーゴの状態が"適切"であることが隔離膜の屈曲を引き起こし、またオートファゴソームへの取り込みにも重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は選択的オートファジーにされるカーゴの状態がオートファゴソーム前駆体の屈曲と取り込みに重要であることを見出した。ヒトにおいて選択的オートファジーは細胞内ホメオスタシスを保つために非常に重要な働きを行っており、その破綻は様々な疾病、特に神経での破綻は神経変性疾患を引き起こすことが示唆されている。このことから本研究から得られた選択的オートファジーに関する知見は、神経変性疾患を始めとする疾患群を克服するための足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I investigated the mechanism how autophagic cargos accumulates to concave face of the isolation membrane by using Ape1 which is a primary cargo of model selective autophagy pathway, Cvt pathway. From in vitro reconstitution assay of cargo incorporation into autophagosome, wildtype Ape1 with the selective autophagy receptor Atg19 induced to bend Atg8-GUV membrane. However, it never occurred with aggregated Ape1 mutant P22L. This result suggests that cargo property is important for bending of the isolation membrane and cargo incorporation into autophagosome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：選択的オートファジー オートファジー オートファゴソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、細胞内のオルガネラや蛋白質などをリソソームへ輸送あるいは分解するメカニズムである。このうちオートファゴソームと呼ばれる膜小胞が形成されて進行する経路をマクロオートファジーと呼び、酵母から哺乳動物まで普遍的に観察され、30種を超える実行因子も進化的に保存されている。オートファジーによる蛋白質やオルガネラの分解はホメオスタシスの維持に非常に重要であり、その破綻は様々な疾病を引き起こすことが知られている。出芽酵母においてオートファゴソームの形成ステップは、Pre-Autophagosome Structure (PAS) と呼ばれるコンパートメントを出発点として、御椀型の構造の隔離膜と呼ばれる中間体の形成を経て、直径 500 nm 程度の球状の小胞 (オートファゴソーム) が形成されて完了する。オートファゴソーム膜形成に必要な因子の一つにユビキチン様蛋白質 Atg8 が含まれる。Atg8 は、プロテアーゼ Atg4 により C 末端のアルギニン残基が切断され、露出したグリシン残基が隔離膜上のホスファチジルエタノールアミンに共有結合する (Atg8-PE)。Atg8-PE は隔離膜の伸張に必須であり、Atg8-PE の形成阻害によりオートファゴソームの形成も阻害される。

マクロオートファジーには、飢餓に应答してオートファゴソーム形成が開始され、ランダムに細胞内のコンポーネントを取り込んで分解するバルクオートファジーと、細胞の必要に応じて不必要なカーゴをオートファゴソームに取り込んで特異的に分解する選択的オートファジーが存在する。選択的オートファジーの特徴として、特定のカーゴを認識する受容体が存在することが挙げられる。これら受容体には、カーゴの認識部位に加えて、Atg8 と相互作用する部位を必ず備えている。カーゴと結合した受容体が隔離膜上の Atg8-PE にリクルートされることにより、

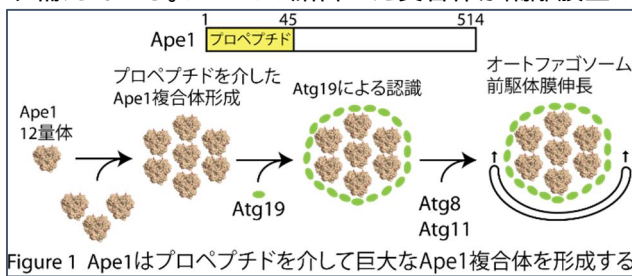


Figure 1 Ape1はプロペプチドを介して巨大なApe1複合体を形成する

選択的オートファジーに特徴的な選択的なカーゴ分解が成し遂げられる。

凝集性蛋白質を取り込む選択的オートファジーのモデルとして、出芽酵母で液胞加水分解酵素を輸送する Cvt 経路がよく調べられている。Cvt 経路とは、出芽酵母の細胞質中の液胞加水分解酵素をカーゴとする選択的オートファジー経路である (Fig. 1)。Cvt 経路のカーゴ

の一つアミノペプチダーゼ Ape1 は、Ape1 複合体を自己会合によって形成する。

Atg19 は Ape1 の選択的オートファジー受容体であり、Atg19 が認識した Ape1 複合体の周りにオートファゴソーム様小胞 Cvt 小胞が形成される。隔離膜は曲率を持った御椀型をしており、Atg8-PE は隔離膜の全面に形成されている。そのため選択的オートファジーにおいて受容体がランダムに結合すれば、御椀型の凸面に結合したカーゴを認識した受容体はオートファゴソームに取り込まれずに分解されないはずである。しかしながら出芽酵母の選択的オートファジーの一つ Cvt 経路のカーゴ Ape1 は非常に効率的に分解される。このことから、受容体は隔離膜の凹面に選択的に局在するメカニズムが存在することが考えられた。

2. 研究の目的

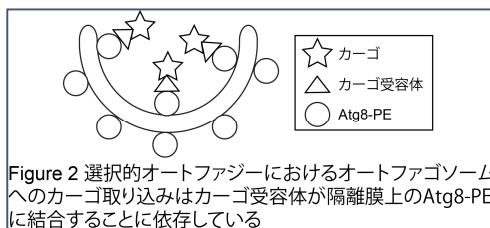


Figure 2 選択的オートファジーにおけるオートファゴソームへのカーゴ取り込みはカーゴ受容体が隔離膜上のAtg8-PEに結合することに依存している

選択的オートファジーのオートファゴソームへのカーゴ取り込みは隔離膜上の Atg8-PE に依存している。もしカーゴが隔離膜表面の Atg8-PE にランダムに集積するのであれば常に未輸送のカーゴが一定量存在するはずであるが、実際には効率的にカーゴ分解を受けることから、隔離膜凹面へのカーゴ集積機構の存在は強く示唆されるものの、実際に観察された例はない。そこで本研究では Cvt 経路の Ape1 を

モデルカーゴとし、隔離膜凹面へのカーゴ集積機構の分子機構を解明することを目的とする。まず Ape1 複合体の性質を詳しく調べた。

3. 研究の方法

3-1. Ape1 複合体の性質の解析

Ape1 複合体の性質を *in vitro*, *in vivo* 両面から調べた。*In vitro* においては、大腸菌で発現させた Ape1 を用いて実験に用いた。*In vivo* においては C 末端に mCherry を付加した Ape1 を顕微鏡観察に用いた。

3-2. Atg19 の Ape1 複合体への局在解析

Atg19 の Ape1 複合体に対する局在を *in vitro* および *in vivo* の顕微鏡観察により調べた。

3-3. *in vitro* での Atg8-GUV を用いた Ape1 複合体との取り込み実験

巨大単一膜小胞 (GUV) と呼ばれるリポソームに Atg8 を共有結合させ、Atg19 と Ape1 液滴を加えて顕微鏡観察で調べた。

4. 研究成果

4-1. Ape1 複合体は液滴の性質を持つ

Ape1 は翻訳後速やかに 12 量体を形成し、その後 Ape1 の N 末端領域のプロペプチドを介して自

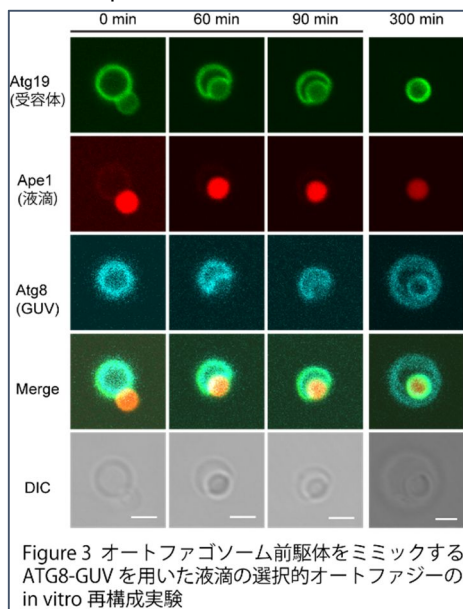
己会合し、巨大な Ape1 複合体を形成する。これまでの Ape1 の解析から、精製した Ape1 が球状の構造体を形成することが明らかとなっていた (Yamasaki et al., Cell Rep 2016)。In vitro 実験により、mCherry を付加し精製した Ape1 を用いて Ape1 が形成する構造体の顕微鏡観察を行った。その結果、構造体同士が融合する様子が観察された。さらに FRAP 実験により構造体の蛍光をブリーチすると、時間経過とともに蛍光の回復が観察された。この結果は構造体を形成する Ape1 分子とバッファ内の Ape1 分子が交換されていることを意味している。これらの結果は、Ape1 が形成する構造体が液体の性質を持つ液滴状構造体(液滴)であることを示唆している。酵母細胞内の Ape1 複合体についても同様の実験を行い、Ape1 複合体についても同様の液体の性質を持つことが明らかとなった。これらの結果から、Ape1 複合体は液滴であることが示唆された。

次に Cvt 経路で輸送されない変異体である P22L 変異体について、液滴を形成するかを調べた。すると Ape1 P22L 変異体は、球形の液滴ではなく不定形の構造体を形成した。この構造体を構成する Ape1 は野生型 Ape1 液滴のような流動性を持たないことから凝集体を形成することが示唆された。

4-2. Atg19 は Ape1 液滴の表面に局在する。

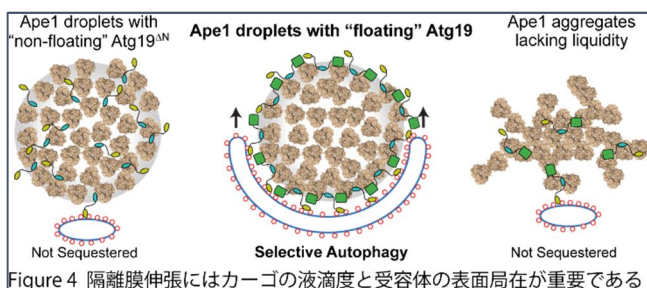
Atg19 は Ape1 液滴の表面に局在するのか、内部に局在するのかは明らかとなっていなかった。そこで in vitro 実験により、Ape1 液滴に mClover3 を付加した Atg19 を加えて顕微鏡観察を行った。その結果、野生型の Atg19 は Ape1 液滴の表面に局在したが、Ape1 との結合に必要な最小領域である Atg19 のコイルドコイル領域は Ape1 液滴の内部に浸潤した。Atg19 のどの領域が Ape1 液滴への表面局在に必要なのか部位欠損変異体を用いて調べたところ、Atg19 の N 末端領域を欠損すると Ape1 液滴内に浸潤する様子が観察された。In vivo において、通常時の Ape1 複合体は 150 nm 程度の大きさのため、蛍光顕微鏡では Atg19 の Ape1 複合体に対する詳細な局在の様子を観察することは難しい。一方、Ape1 を過剰発現させると Ape1 複合体の大きさが増大し、数 μm の大きさで観察される。この巨大化した Ape1 複合体に対し Atg19 の局在を調べると、in vitro での結果と同様に野生型の Atg19 は Ape1 複合体の表面に局在し、N 末端を欠損すると内部に浸潤する様子が観察された。これらの結果から、Atg19 は Ape1 液滴に対して表面局在性を持ち、その表面局在は N 末端領域によって規定されることが示唆された。

4-3. Ape1 液滴は隔離膜を押し出す形で隔離膜凹面に局在化する。



Ape1 液滴が隔離膜とどのように相互作用し、どのように隔離膜が伸長し Cvt 小胞に取り込まれるのかを調べるために、巨大単一膜小胞 (GUV) と呼ばれるリボソームを用いた in vitro 再構成実験系を構築した。PE を含んだ GUV を用い、Atg8-PE を形成させた Atg8-GUV を調製する。マイクロピペットにより Atg19 と Ape1 液滴を加えて顕微鏡観察を行った。その結果、Atg19 存在下で Ape1 液滴と Atg8-GUV はテザリングを起こした (Fig.3)。その後時間経過と共に Atg8-GUV の膜が内側に向けて貫入していき、最終的には Ape1 液滴は完全に内部に取り込まれた。一方、Ape1 P22L 変異体による凝集体は Atg8-GUV とテザリングは起こすものの、Atg8-GUV の膜変形は起こさなかった。同様に Ape1 液滴への表面局在を失い、液滴内部に浸潤する Atg19 N 末端欠損変異体も Atg8-GUV とテザリングは起こすが、膜変形は起こさなかった。これらの結果は、Atg8-GUV の内部への取り込みは選択的オートファジー受容体である Atg19 の表面局在が必要であることを示唆している。

4-4. 結論



以上の結果から、隔離膜の伸張に関するモデルを構築した (Fig. 4)。流動性を持つカーゴの表面に十分な密度で選択的オートファジー受容体が結合している場合には、隔離膜の曲率を生み出すことで、隔離膜がカーゴを包み込むように伸長することが可能となる。一方で、カーゴ上での受容体密度が十分でない場合や、凝集体の場合には隔離膜は伸張が出来ない。よって、このモデルから同時にカーゴの隔離膜凹面局在機構はカーゴの液滴の性質と、選択的オートファジー受容体の表面局在に依存して生み出されることが考えられる。

よって、このモデルから同時にカーゴの隔離膜凹面局在機構はカーゴの液滴の性質と、選択的オートファジー受容体の表面局在に依存して生み出されることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Liu Xiao-Man, Yamasaki Akinori, Du Xiao-Min, Coffman Valerie C, Ohsumi Yoshinori, Nakatogawa Hitoshi, Wu Jian-Qiu, Noda Nobuo N, Du Li-Lin	4. 巻 7
2. 論文標題 Lipidation-independent vacuolar functions of Atg8 rely on its noncanonical interaction with a vacuole membrane protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 NA-NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.41237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki Akinori, Watanabe Yasunori, Noda Nobuo N.	4. 巻 1880
2. 論文標題 Structural Studies of Selective Autophagy in Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8873-0_4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki Akinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 429
2. 論文標題 Structural Biology of the Cvt Pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Mol Biol	6. 最初と最後の頁 531 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2017.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki Akinori, Alam Jahangir Md., Noshiro Daisuke, Hirata Eri, Fujioka Yuko, Suzuki Kuninori, Ohsumi Yoshinori, Noda Nobuo N.	4. 巻 77
2. 論文標題 Liquidity Is a Critical Determinant for Selective Autophagy of Protein Condensates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1175.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.12.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Akinori Yamasaki
2. 発表標題 Functional and Molecular Insights into Selective Autophagy of Phase Separated Cargo
3. 学会等名 The China-Japan-Korea Symposium on Autophagy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎章徳
2. 発表標題 液液相分離するカーゴに対する選択的オートファジーの分子機構
3. 学会等名 第11回オートファジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎章徳
2. 発表標題 液液相分離するカーゴに対する選択的オートファジーの分子機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Yamasaki, Xiao-Man Liu, Li-Lin Du, Nobuo N. Noda
2. 発表標題 Identification of helical AIMS as a novel type of Atg8-interacting motif
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎章徳
2. 発表標題 脂質化に依存しない Atg8の機能および新規ヘリックス様 Atg8結合モチーフの解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akinori Yamasaki
2. 発表標題 Functional and Molecular Insights into Selective Autophagy of Phase Separated Cargo
3. 学会等名 Keystone Symposia in Snowbird Biomolecular Condensates: Phase Separated Organizers of Cellular Biochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Yamasaki
2. 発表標題 Liquidity is a critical determinant for selective autophagy of protein condensates
3. 学会等名 International Symposium on Autophagy 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎章徳, Jahangir Md. Alam, 能代大輔, 平田恵理, 鈴木邦律, 大隅良典, 野田展生
2. 発表標題 液滴の選択的オートファジーにおける分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立大学法人 東京工業大学
<https://www.titech.ac.jp>
東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター 大隅研究室
<http://www.ohsumilab.aro.iri.titech.ac.jp>

当科研費の支援により出版された論文の紹介記事
日本経済新聞 (https://www.nikkei.com/article/DGXLRS527487_T20C20A1000000/)
日経バイオテク (<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/20/02/13/06553/>)
時事通信ニュース (<https://sp.m.jiji.com/article/show/2333795>)
Yahooニュース (<https://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20200129-00000002-jij-soci>) (*リンク切れのため現在は閲覧不可)
PHYS.org (<https://phys.org/news/2020-02-autophagy-degrades-liquid-dropletsbut-aggregatesof.html>)
Science Daily (<https://www.sciencedaily.com/releases/2020/02/200213141524.htm>)
東工大ニュース (<https://www.titech.ac.jp/news/2020/046184.html>)
JSTプレスリリース (<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20200129/index.html>)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----