

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02399

研究課題名(和文) 脂質からみたオートファジーの膜動態

研究課題名(英文) Membrane dynamics of autophagy from the lipid perspective

研究代表者

堀江 朋子(川俣朋子)(Horie, Tomoko (Kawamata Tomoko))

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70435527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内分解システムである。オートファジーは膜に関連した事象であり、脂質の理解は、オートファゴソーム膜の形成とその分解の両プロセスを解析するために不可欠である。本研究では、オートファジー関連膜の脂質組成と、液胞における膜分解の分子機構を解明することを目的とした。本研究では、オートファジー関連膜を精製し、その脂質組成を決定した。また、オートファジー関連膜を分解するリパーゼであるAtg15の生化学的解析により、液胞内で起こる脂質分解を再構成し、その分子機構を解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーの研究はこれまでオートファジーを制御するAtgタンパク質の解析が主流であったが、オートファジーの理解には、本来脂質を考慮しながら解析しなくてはならない。本研究は、脂質側の解析をすすめ脂質情報を明らかにした。得られた脂質情報は、オートファジーの膜形成を理解する上で大きな基礎データとなり得るだけでなく、生体膜における膜新生の普遍的理解につながる可能性がある。また、脂質分解は生体膜を破壊する危険なステップであるため、厳密な制御がなくてはならない。Atg15の生化学的解析から得られた結果は、液胞/リソソームを介した脂質代謝生物学として、新しい概念を生み出すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular degradation system. Autophagy is a membrane-related event, and an understanding of lipids is essential for both the formation and degradation of autophagic processes. This study aimed to elucidate the membrane composition of autophagy-related membranes and the molecular mechanism of membrane degradation in the vacuole. In this study, autophagy-associated membranes were purified, and their lipid composition was determined. In addition, biochemical analysis of Atg15, a lipase that degrades autophagy-related membranes, successfully recapitulated the lipid degradation in the vacuole and elucidated the molecular mechanism.

研究分野：オートファジー

キーワード：脂質 分解 リピドーム解析 Atg15 リパーゼ 酵母

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に保存された自己分解システムである。オートファジーが誘導されると隔離膜が細胞質成分を取り囲み、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームは、外膜と内膜の二重膜から構成されており、外膜は液胞/リソソームと融合する。一方、内膜やそれに含まれるタンパク質、オルガネラ等は、液胞/リソソーム内の種々の加水分解酵素により分解される。オートファジーの分子メカニズムは、Atg タンパク質等の機能解析を通じて明らかになりつつあるが、それらの因子がどのように膜動態を制御しているのかについてはほとんど解明されていない。外膜と内膜には異なる Atg タンパク質が局在することから、外膜と内膜は質的に非対称であると考えられているが、それぞれを構成している膜脂質の情報は全くわかっていない。オートファジー関連膜の単離・精製ができないこと、また微量なオルガネラの定量・定性的な脂質解析技術がこれまで不十分であったことから、脂質からみたオートファジーの膜動態解析はほとんど手付かずのままであった。

オートファゴソーム膜とオートファゴソームに内包されたオルガネラ膜は、最終的には液胞/リソソームに運ばれ、そこで分解される。オートファジーは膜現象であり、オートファジーの最終段階を正常に完了させるためには膜脂質は適切に分解されなければならない。膜脂質の分解が破綻すると、膜脂質や膜脂質由来の代謝物が液胞/リソソームに異常に蓄積することになり、液胞/リソソームの機能全体が低下してしまう可能性が高い。脂質分解は、リパーゼの生化学的な理解が必須であるが、これまで液胞/リソソームにおける膜脂質のリパーゼの分子機構については、これまであまり報告がない。酵母では、液胞リパーゼとして唯一同定されている Atg15 についての生化学的な解析が進んでいない。Atg15 だけで膜脂質分解は可能なのか、他のリパーゼは存在しないのか、どうやって Atg15 が膜脂質を分解するのかについては不明なままである。また膜脂質が分解された後の過程についても、理解が進んでおらず、膜脂質分解後の中間代謝物、最終産物、再利用過程や細胞内の脂質代謝への影響については、ほとんどわかっていない。

モデル生物である出芽酵母は、これまで真核生物のオートファジー研究を先導してきた。酵母は液胞が大きく見やすい。酵母のオートファジーの発見は、栄養飢餓時に液胞内にオートファゴソームの内膜構造体であるオートファジックボディが容易に観察できたことが端緒となったという歴史がある。また、酵母の液胞は単離が可能で純度よく精製できる。私は、研究開始前までに、オートファジックボディの精製にほぼ成功していた。そのため、オートファジックボディの脂質組成を調べることが初めて可能になった。また、オートファジックボディを精製できたことにより、Atg15 のネィティブな基質として利用できると考えた。よって、液胞内の脂質分解評価系を確立するために重要な基質の材料が整ったため、精製が難しいとされる Atg15 が用意できれば、液胞内の膜脂質分解過程が解明できる状況であった。

2. 研究の目的

私は以下の2つの課題に取り組んできた。

(1) オートファジー関連膜の脂質組成解析

オートファジーを誘導した細胞からオートファジックボディを含む液胞を単離し、そこからオートファジックボディと液胞膜画分を精製し、脂質組成を解析する。単離したオートファジックボディには、基質として含まれるオルガネラ膜も含まれている。そこで、単離したオートファジックボディから、オートファジックボディ膜だけを精製する手法を確立し、脂質組成を解析する(図1)。

(2) Atg15 による膜脂質分解の *in vitro* 再構成系の確立

最終的な目標は、活性のある Atg15 を精製し、Atg15 による膜脂質分解を再現する系を構築する。最終的には、基質としてオートファジックボディを用い、Atg15 によるオートファジックボディ膜崩壊を再現し、そのメカニズムを明らかにする(図2)。

3. 研究の方法

(1) について

詳細は図1に記した。酵母から、ステップ1によりオートファジックボディを単離する。次に、ステップ2により、オートファジックボディ膜のみを精製する。精製したオートファジックボディ膜と液胞膜について、脂質組成を TLC またはリピドーム解析により解析する。

(2) について

詳細は図2に記した。活性のある Atg15 の精製を試みる。Atg15 は、半減期が短いタンパク質で

あることが報告されており、また、細胞での発現量もごくわずかである。そこで、様々なタンパク質発現系を用いて Atg15 の発現と単離に挑戦する。具体的には、1. 大腸菌の発現系を利用した精製、2. mRNA から合成する、試験管内タンパク質合成系（無細胞（セルフリー）タンパク質合成系）での精製、3. 酵母で過剰発現系を利用した精製、などを試す。また、精製時の条件検討についても調べる。還元剤、プロテアーゼ阻害剤、人工シャペロン、界面活性剤などを試し、活性をもつ Atg15 の単離の最適化を行う。

4. 研究成果

(1) オートファジー関連膜の脂質組成解析

図1のステップ2にある、オートファジックボディ膜のみの精製が非常に困難であった。2つの異なるストラテジーで膜脂質のみの精製を試みた結果、片方のストラテジーでのみ、精製することに成功したが、実際には一年半もの歳月を費やした。どちらのストラテジーに関しても、2つの問題が発生した。精製のために用いる担体（レジン）等に非特異的に吸着してしまう膜脂質を排除できないこと、また、精製を進めると、次第に収量が減っていき、リポドーム解析に十分量を確保できないことなどが挙げられた。そのため、原因を

突き止め解決するため試行錯誤を続けた。最終的には、非特異的に吸着する脂質に関しては、適切なコントロールを置くこと、また、多くの失敗をもとに少しずつ改善策を重ね、分離と洗浄方法などに関して非特異吸着を最小限に抑えるために不可欠な実験上のノウハウを突き止めることができた。収量の問題に関しては、培養スケールを数倍にすることにより解決し、大幅な改善が見られた。以上の結果から、最終標品について脂質組成解析を行った。その結果、オートファジックボディ膜で優位に多いリン脂質種を見出すことに成功し、膜の組成について考察を進めた。（論文投稿準備中）

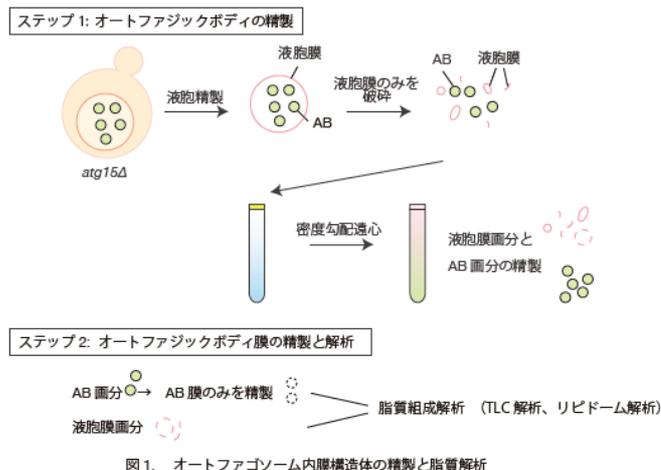


図1. オートファゴソーム内膜構造体の精製と脂質解析

(2) Atg15 による膜脂質分解の in vitro 再構成系の確立

3. 研究の計画(2)にあるように、活性のある Atg15 の精製を試みた。Atg15 は非常に不安定であり、また凝集しやすい性質をもつため、精製が非常に困難であった。方法(2)で提案した様々な手法を用いて

Atg15 の精製を試みたが、研究開始から2年ほど経過しても、活性のある Atg15 を安定して精製することができなかった。そこでその原因は、Atg15 側に問題があるのか、オートファジックボディを用いるリパーゼ評価系そのものに問題があるのかを見極めることにした。Atg15 の精製を一旦中断し、Atg15 を発現している液胞ライセートでリパーゼ活性が捉えられるかどうかを調べることにした。その際、オートファジックボディではなく、蛍光ラベルされた単一のリン脂質 (NBD-PE など)を用いてリパーゼの評価することにした。その結果、Atg15 を発現している液胞ライセートでは蛍光ラベルされたリン脂質の分解が見られ、リパーゼ変異体 (Atg15^{S332A}) では、それが全く観察されなかった。この結果から、液胞ライセートには、Atg15 に依存したリン脂質分解活性があることが明らかとなった。そこで、活性のある液胞ライセートから Atg15 を精製することを決めた。その結果、そのように精製した Atg15 には、明確にリン脂質分解活性があることを見出した。また、種々のリン脂質の分解を評価した結果、Atg15 のリパーゼのタイプを明らかにすることができた（論文投稿準備中）。また、活性のある Atg15 は、オートファジックボディを基質にした場合でも、分解活性を持っていた。よって、最終的には、本計画の目標としていた膜脂質分解の in vitro 再構成系を確立することができた。また、Atg15 のリパーゼのタイプを決定したことにより、液胞に生ずるリン脂質分解物が推定可能になった。Atg15 により分解された脂質分解物がその後どのように代謝、輸送、再利用されるのかについては、今後詳細に調べていきたい。

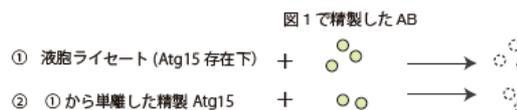


図2. In vitro リパーゼアッセイ系の確立

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江（川俣）朋子
2. 発表標題 液胞内タンパク質・脂質・リン酸代謝とオートファジー
3. 学会等名 生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江（川俣）朋子
2. 発表標題 脂質から見たオートファジーの膜動態
3. 学会等名 酵母細胞研究会（第198回）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江-川俣 朋子
2. 発表標題 オートファジックボディのプロテオーム解析と膜分解機構の解析
3. 学会等名 第11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〕

-

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
研究分担者	中西 広樹 (Nakanishi Hiroki) (10466740)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・脂質シグナリングプロジェクト 特任研究員 (82610)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	佐々木 雄彦 (Sasaki Takehiko) (50333365)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関