

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14693

研究課題名(和文) 数理手法を用いたオートファジー・ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Theoretical study of autophagy dynamics

研究代表者

境 祐二 (Sakai, Yuji)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：70631779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファゴソーム形成時における隔離膜の膜動態を説明する数理モデルを構築した。膜の高曲率を安定化させる曲率因子を想定し、隔離膜の成長に伴う膜形態変化ダイナミクスに与える影響について、数理モデルを用いて解析した。その結果、曲率因子がディスク状の隔離膜の最も膜曲率が大きい部分(エッジ)に自発的に局在し、ディスク状の隔離膜を安定化させていることを示した。さらに、隔離膜の成長に伴い曲率因子の分布が変化し、この分布の変化が中間状態のカップ状の形態を安定化させ、隔離膜の成長を安定化させていることを示した。理論モデルの予測は、生細胞ライブイメージングで得られた隔離膜の形態変化と定量的に一致する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジー研究は、今まで生化学や遺伝学など実験を主導として行われてきた。しかし、その機構についてはまだ未解決な問題が多くある。本研究では、物理モデル、すなわち膜の形に基づくエネルギーを考慮する数理解析から、オートファゴソームの形態変化を理解することを試みた。本研究を通して、オートファジー分野に対して理論的取り組みの有効性を示すことができた。オートファジー分野における理論研究の可能性を示し、実験と理論の融合により新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular degradation process that is mediated by de novo formation of autophagosomes. Autophagosome formation involves dynamic morphological changes; a disk-shaped membrane cisterna grows, bends to become a cup-shaped structure, and finally develops into a spherical autophagosome. We have constructed a theoretical model that integrates the membrane morphological change and entropic partitioning of putative curvature generators, which we have used to investigate the autophagosome formation process quantitatively. We show that the feedback effects between the membrane curvature and the distribution of the curvature generators stabilize disk- and cup-shaped intermediate structures during autophagosome formation, which is quantitatively consistent with in vivo observations. Our model provides a framework for understanding autophagosome formation.

研究分野：理論生物学

キーワード：オートファジー 膜モデリング オルガネラ 理論生物学 定量生物学 ソフトマター物理学 膜物理学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

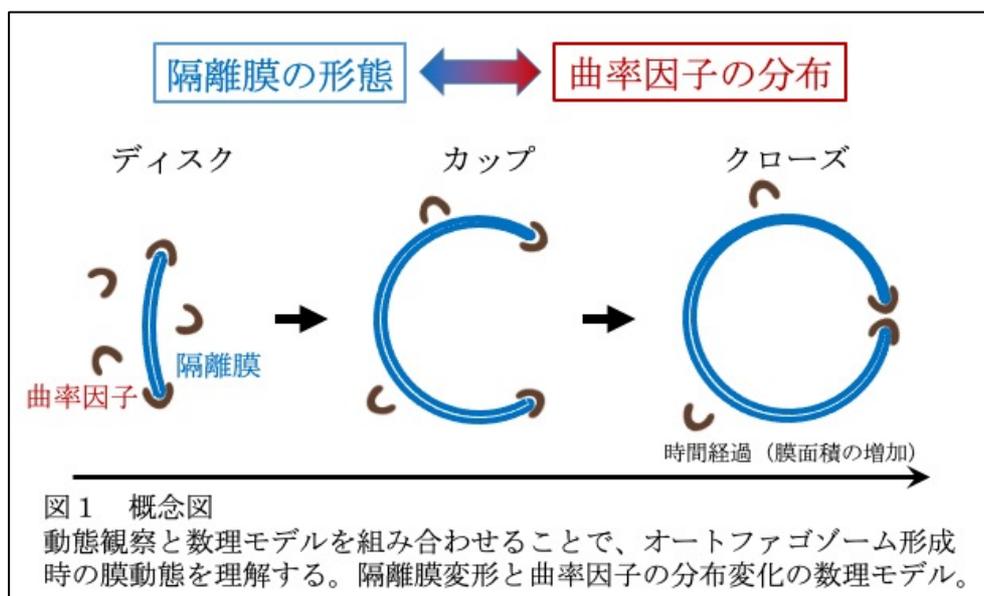
オートファジーは、オートファゴソーム膜が不要なオルガネラやタンパク質を取り囲み、リソソームと融合することで内部の不要物を分解する。オートファジー研究は、今まで生化学や遺伝学など実験を主導として行われてきた。しかし、その機構についてはまだ未解決な問題が多くある。

近年、オートファジー関連タンパク質やこれらの制御過程についての知見が得られてきている。しかし、これらの知見は断片的であり、オートファジーの形成や分解のダイナミクスの統一的理解は得られていない。本研究では、実験で得られている知見を統合して、数理モデルを構築してシミュレーションすることにより、オートファジーのダイナミクスを定量的かつ合理的に解明することを目指す。実験研究者と協力し、得られた結果を互いにフィードバックすることにより、今まで定性的だったオートファジー研究を定量的レベルに引き上げることを目指す。

### 2. 研究の目的

オートファゴソーム形成は、隔離膜が膜面積の成長に伴い、その形態を大規模に変形することで細胞質成分の一部を取り囲み隔離する。多くのオートファジー関連タンパク質はこのオートファゴソーム形成に関与しており、隔離膜の形態変化はこれらの因子により時空間制御されていると考えられる。オートファゴソーム形成は、オートファジー・プロセスの中で最もダイナミカルな膜変形であり、基本的なプロセスであるにも関わらず、それがどのような機構により制御されているのかは謎のままである。そこで我々は、物理モデル、すなわち膜の形に基づくエネルギーを考慮する数理解析から、オートファゴソームの形態変化を理解することを試みる(図1)。

数理手法を用いることで、今まで観察による定性的にしかわからなかったオートファジー研究を定量的に理解できるようになる。本研究を通して、オートファジー分野における理論研究の可能性を示し、実験と理論の融合により新たな知見を得ることができる。



### 3. 研究の方法

まず、オートファゴソーム形成時における隔離膜の膜動態を説明する数理モデルを構築する。オートファゴソーム形成に関連するタンパク質は膜の曲率を認識するものが多いので、これら曲率因子の効果を数理モデルに取り入れる。隔離膜の成長に伴う、膜の形態変化ダイナミクスと曲率因子の膜上の分布について、数理モデルを用いて解析する。

次に、数理モデルの解析予測と、細胞内で観察されるオートファゴソーム形成における隔離膜形態変化ダイナミクスとの定量的比較を行う。生細胞ライブイメージングを行い、オートファゴソーム形成過程における隔離膜の形態変化を定量化する。この定量データと理論予測との比較を行い、オートファゴソーム形成における隔離膜の形態変化ダイナミクスと関連タンパク質の機能との関係を解明する。

#### 4. 研究成果

オートファゴソーム形成における膜変化は極めてユニークで、隔離膜といわれる扁平なディスク状のベシクルが、膜成長とともに全体として一定方向に湾曲しカップ状に変形し、徐々にカップの口が閉じて球形のオートファゴソームが形成される（図1）。このオートファゴソーム形成には様々な関連タンパク質があるが、これらは膜の曲率認識ドメインを持つタンパク質が多く、隔離膜上の高曲率ナリムに局在する。

このオートファゴソーム形成における隔離膜変形ダイナミクスと曲率認識タンパク質の局在ダイナミクスを理解するために、両方の効果を扱える数理モデルを構築した（図2A）。隔離膜の変形に対しては、曲げ弾性エネルギー $E_{bend}$ を考え、曲率認識タンパク質（曲率因子）はこの曲げ弾性エネルギーに対しては、曲率因子の濃度に比例して膜の自発曲率が作り、局在することで高曲率領域を安定化させる。一方で、曲率因子の分布によるエントロピーエネルギー $E_{part}$ を考える。膜の曲げ弾性エネルギーと曲率因子の分布エネルギーの均衡として、膜の形態と曲率因子の分布が得られる。

この数理モデルを用いて、膜面積増加に伴う、隔離膜の形態変化と曲率因子の分布変化を解析した（図7-10-2B）。膜面積が小さく曲率因子が多い時は、ディスク形態が安定化される。このとき、曲率因子は高曲率ナリムに局在している（図2B①、②）。膜面積が大きくなると、膜はディスク形態からカップ形態へ転移する（図2B③）。このとき、内膜と外膜で膜の曲率が逆符号で異なるため、内膜と外膜で曲率因子の濃度が異なる。この曲率因子の濃度の違いが、内膜と外膜に自発曲率を生み出し、カップ形態を安定化させる。さらに膜面積が増加すると、徐々にカップ形態からクローズ形態に変化する（図2B④、⑤、⑥）。この膜の形態変化についての数理モデルの結果は、ライブイメージングで観察される隔離膜の形態変化を定性的に説明する。さらに、理論解析からディスクからカップへの形態転移するときの膜面積 $A_d$ とクローズするときの

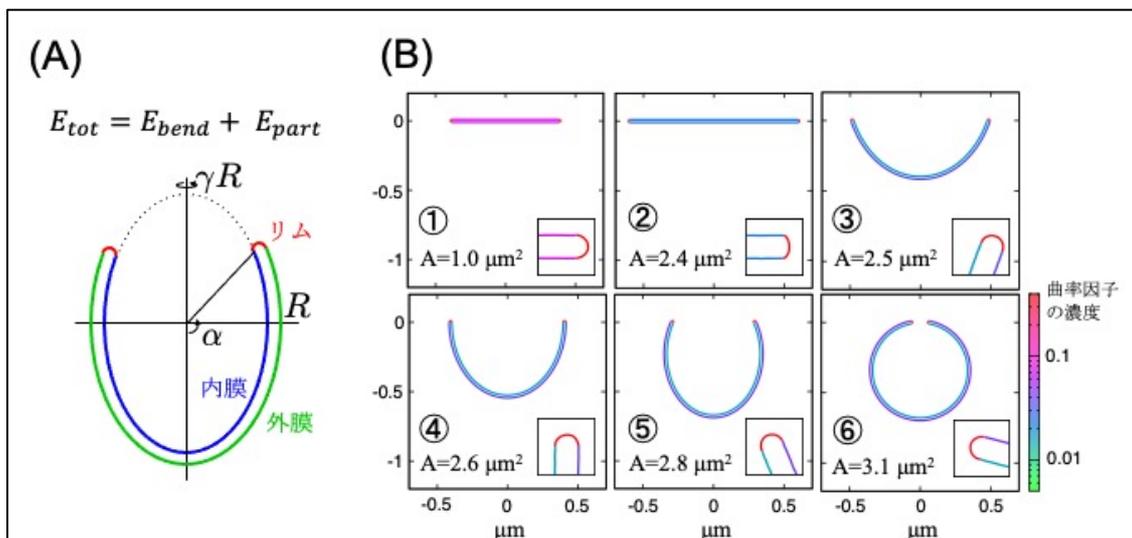


図2 オートファゴソーム形成の数理モデル

(A) 数理モデルの概要。膜の曲げエネルギー $E_{bend}$ と曲率因子の分布エネルギー $E_{part}$ の均衡の結果、膜の形態と曲率因子の分布が求まる。

(B) 数理モデルの計算結果。膜面積増加に伴う、膜の形態変化と曲率因子の分布変化。

膜面積 $A_s$ は曲率因子量に比例することがわかり、2つの膜面積が正の相関を持つことが予測される。

次に、数理モデルの解析結果とライブイメージングによる生細胞観察から得られる隔離膜の形態変化を比較した。mRuby3-LC3B、GFP-ATG2A を発現する生細胞を用い、隔離膜の動態をライブイメージング観察した (図 3 A)。mRuby3-LC3B は隔離膜全体、GFP-ATG2A はリム部分に局在することがわかる。このイメージング・データから各時刻における隔離膜の膜面積と曲がり度を定量化し、数理モデルによる解析結果と比較した (図 3 B)。生細胞データから得られた隔離膜の形態変化では、膜面積増加に伴うディスクからカップへの形態変化は膜面積が $A = A_d \approx 0.5A_s$ のときに起こり、その後、徐々にカップからクローズへ形態変化した。数理モデルによる解析結果は、この生細胞イメージングから得られた隔離膜の形態変化を定量的に予測可能であった。理論モデルは、隔離膜がディスクからカップへ形態転移するときの膜面積 $A_d$ とクローズしてオートファゴソームになるときの膜面積 $A_s$ が正の相関を持つことを予測する。このことを確かめるために、生細胞イメージングで約 100 個のオートファゴソーム形成を観察し、膜面積 $A_d$ 、 $A_s$ を定量化した (図 3 C)。数理モデルが予測するように、隔離膜がディスクからカップへ形態転移するときの膜面積 $A_d$ とクローズしてオートファゴソームになるときの膜面積 $A_s$ はほぼ正の線形相関を持つことがわかる (国際誌に Submitted、 Under revision)。

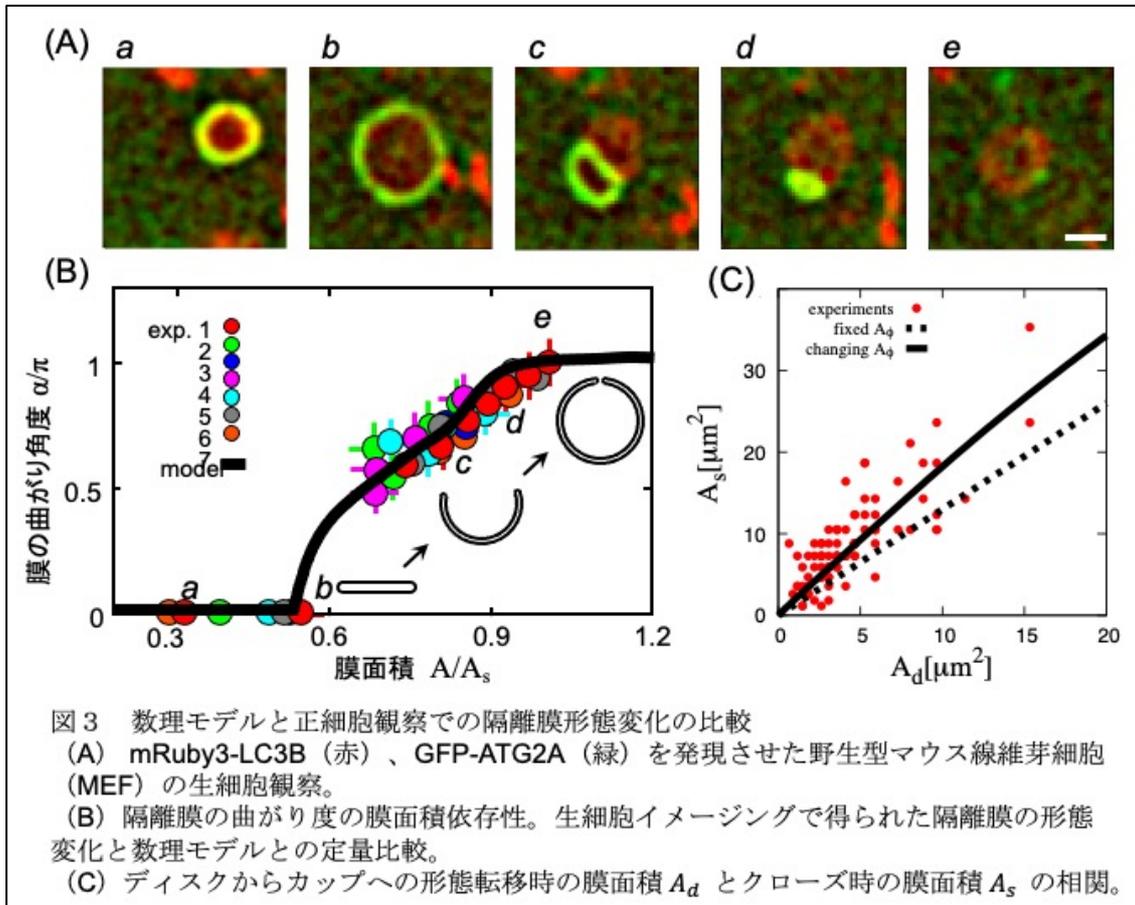


図 3 数理モデルと正細胞観察での隔離膜形態変化の比較

(A) mRuby3-LC3B (赤)、GFP-ATG2A (緑) を発現させた野生型マウス線維芽細胞 (MEF) の生細胞観察。

(B) 隔離膜の曲がり度の膜面積依存性。生細胞イメージングで得られた隔離膜の形態変化と数理モデルとの定量比較。

(C) ディスクからカップへの形態転移時の膜面積  $A_d$  とクローズ時の膜面積  $A_s$  の相関。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 境祐二・本田郁子	4. 巻 272巻9号
2. 論文標題 オートファゴソーム形成の物理モデル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学の歩み「オートファジー 分子機構・生物学的意義・疾患との関わり」	6. 最初と最後の頁 758 - 762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 境祐二
2. 発表標題 Physical modeling for autophagosome formation
3. 学会等名 細胞システムの動態と論理X
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Mathematical modelling for autophagosome formation
3. 学会等名 2018 Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology & the Japanese Society for Mathematical Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Physical Modeling for autophagosome formation
3. 学会等名 Physics of Living Matter (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Model of autophagosome formation regulated by curvature-generators
3. 学会等名 Advances in Physics of Emergent orders in Fluctuations 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Theoretical modeling for autophagosome formation
3. 学会等名 Annual Symposium of the China-Japan-Korean International A3 Project (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Roland L. Knorr, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Theoretical modeling for autophagosome formation
3. 学会等名 EMBO Workshop: Membrane shaping and remodeling by proteins (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Roland L. Knorr, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Modeling autophagosome formation
3. 学会等名 Joint 12th EBSA, 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Sakai, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Roland L. Knorr, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Modeling morphological change during autophagosome formation
3. 学会等名 EMBO Workshop: Autophagy From Molecular Principles to Human Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 境祐二
2. 発表標題 オートファゴソーム形成の理論モデル
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〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----