

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16071

研究課題名（和文）オートファゴソーム形成における膜伸張メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of membrane expansion mechanism in autophagosome formation

研究代表者

小谷 哲也（Kotani, Tetsuya）

東京工業大学・生命理工学院・特任助教

研究者番号：10724643

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に必須のAtg2は脂質輸送活性を持っており、小胞体からオートファゴソーム膜へと脂質を供給していると考えられている。Atg2は常に小胞体と結合しているわけではないため、オートファゴソーム形成時にのみ小胞体と結合できるようになると予想される。しかしAtg2と小胞体との相互作用の制御機構はまだ良くわかっていなかった。本研究ではオートファゴソーム形成の場でAtg2がリン酸化されることで小胞体と相互作用できるようになることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにオートファゴソーム形成に必須のタンパク質の個々の機能は明らかとなりつつある。しかし、それらの機能がどのようにして制御されているのか、また、これらタンパク質群がどのように協調的に働いているかなど、まだ多くの疑問が残されており、オートファゴソーム形成の完全なる理解には至っていない。本研究ではオートファゴソーム形成に必須のAtg2の機能制御機構に関する知見を得た。本研究での結果を基に研究を進めることで、オートファゴソーム形成機構のさらなる理解につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Atg2, which is essential for autophagosome formation, has lipid transfer activity and is thought to supply lipids from the endoplasmic reticulum to the autophagosomal membrane. Atg2 does not always bind to the endoplasmic reticulum, suggesting that it becomes capable of interacting with it only during autophagosome formation. However, the regulatory mechanism of the interaction between Atg2 and the endoplasmic reticulum remains poorly understood. In this study, we obtained results suggesting that Atg2 is phosphorylated during autophagosome formation, which facilitates its interaction with the endoplasmic reticulum.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オートファジー 酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内成分を「オートファゴソーム」と呼ばれる二重膜小胞で取り囲み、液胞へと運び、分解する機構である。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、細胞質の一部を取り込みながら伸張し、閉じることでオートファゴソームが形成される。オートファゴソーム形成時にはオートファゴソーム形成に必須の Atg タンパク質群が液胞近傍に集積し、pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれるオートファゴソーム膜前駆体を形成する。これらの Atg タンパク質がすべて揃って、初めて隔離膜は伸張する。Atg2 はオートファゴソーム形成に必須の Atg タンパク質である。Atg2 は Atg18 と複合体を形成して、Atg タンパク質の中で最後に PAS に局在化する。Atg2 を欠失すると、Atg18 を除くオートファゴソーム形成に関わるすべての Atg タンパク質が PAS に局在化するが、隔離膜は形成されない。そのため、Atg2-Atg18 複合体が隔離膜の膜伸張に重要であることが示唆されていた。しかし長年その機能は明らかとなっていなかった。私たちは Atg2 の N 末端領域と C 末端領域内にオートファゴソーム形成に重要な膜結合領域があることを報告し、Atg2 はオートファゴソーム膜前駆体を小胞体に繋ぎ留めて、膜の伸張を開始するというモデルを提唱した。その後、Atg2 に脂質輸送活性があることが示され、Atg2 が小胞体から隔離膜へと脂質を直接供給し、隔離膜が伸張するというモデルが広く受け入れられている。しかし、Atg2 が小胞体のどこから脂質を引き抜いているのかなど詳細な分子機構は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

オートファジーが誘導されていない時、Atg2 は細胞質中に拡散している。また、オートファジーの誘導条件下でも、PAS が形成できない変異株においては Atg2 が小胞体に局在化しない。このことは Atg2 が PAS に局在化し、何らかの作用を受けて初めて小胞体に結合できるようになることを示唆している(図1)。そこで本研究では Atg2 が PAS でどのような制御を受け、小胞体のどこと相互作用しているのかを明らかにすることを目的とした。さらに試験管内での小胞体からオートファゴソーム前駆体膜への脂質輸送の再構成を目指し、膜伸張反応の具体的なメカニズムの解明を目的とした。

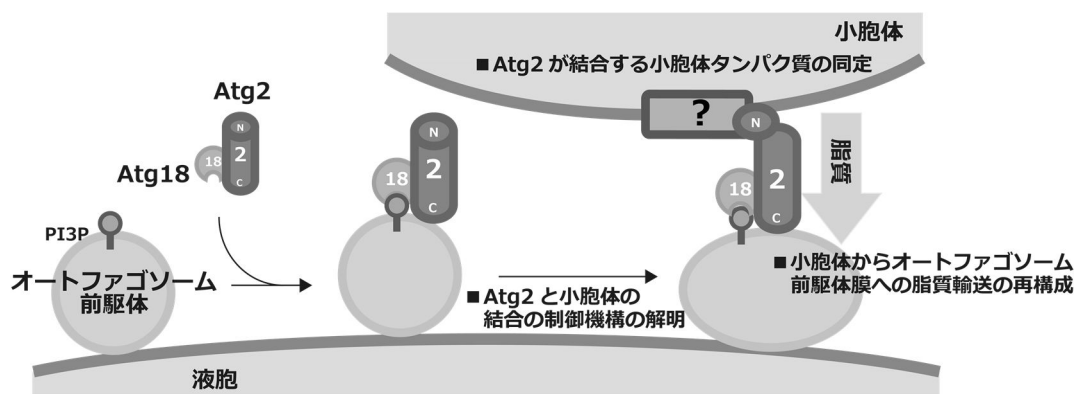


図1 研究計画

3. 研究の方法

本研究では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、分子生物学的手法、生化学的手法、蛍光顕微鏡解析、電子顕微鏡解析、質量分析など私が所属する研究室でよく行われている手法に加え、近接依存性標識法を導入し、解析を進めていく計画を立てた。

4. 研究成果

これまでの研究により Atg2 の N 末端領域が小胞体との相互作用に重要であることが示唆されていた。そこで、Atg2 の N 末端領域がオートファジー誘導時に何らかの制御を受けるのかを解析した。N 末端にタグを付加した Atg2 を発現する細胞の抽出液を 2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸 (NTCB) で処理し、タンパク質をシステイン残基の N 末端側で切断し、抗タグ抗体を用いたイムノブロットングを行うことで Atg2 の N 末端領域のみを検出する系を構築した。この系を用いて Atg2 の N 末端領域の挙動を解析したところ、オートファジーの誘導依存的にアップシフトしたバンドが現れることが分かった。このバンドシフトは Atg2 の PAS への局在化にも依存しており、Atg2 が PAS で何らかの修飾を受けることが明らかとなった (図 2)。

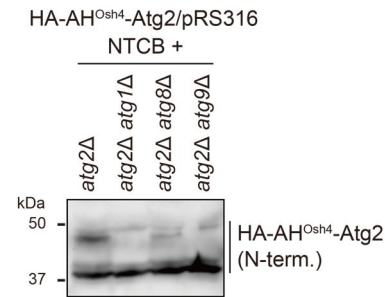


図 2 NTCB 処理による Atg2 の N 末端領域の解析

相互作用の制御は多くの場合、翻訳後修飾によって行われる。オートファジーにおいてもリン酸化によって Atg タンパク質とその結合相手との相互作用が制御されることが数多く報告されている。Atg2 についてもオートファジーの誘導依存的にリン酸化されることが報告されているが、その役割は不明である。これまでに Atg2 のリン酸化部位がいくつか報告されている。これらの部位をアラニンに置換した変異体を作製し、オートファジー活性を解析した。しかし、どの変異体もオートファジーの欠損を示さなかった。次に近縁種間での保存性の高いセリン残基に注目し、アラニン置換変異体を作製して、オートファジーに重要なセリン残基を探索した。その結果、N 末端領域内にそのようなセリン残基を二つ見出した。これら残基のアラニン置換はこの変異体の PAS への局在化には影響を与えなかった。さらにこれら残基のアスパラギン酸やグルタミン酸に置換した変異体 (疑似リン酸化変異体) ではオートファジーの欠損は示さなかった。これらの結果からこれらのセリン残基がオートファゴソーム形成時にリン酸化される可能性が考えられたが、このセリン残基が実際にリン酸化されるかは不明である。オートファジー活性に欠損を示すアラニン置換変異体の N 末端に膜結合性の両親媒性ヘリックスを付加すると、オートファジー活性が部分的に回復したことから、これらのセリン残基は Atg2 の膜への結合に関与することが示唆された。

Atg2 が小胞体のどこと相互作用するのかを明らかにするため、APEX 法を用いて Atg2 の近傍にあるタンパク質の同定を試みた。Atg2 の N 末端に APEX2 を付加し、Atg2 の近傍に存在するタンパク質のピオチン化を行った。ピオチン化タンパク質をストレプトアビジン結合ビーズで回収し、質量分析により Atg2 に付加された APEX2 によってピオチン化されたタンパク質の同定を行った。しかし、小胞体膜に局在するタンパク質の同定には至らなかった。また Atg2 と同様に伸張中のオートファゴソーム膜の先端に局在化する他の Atg タンパク質に APEX2 を付加し、伸張中のオートファゴソーム膜の近傍に存在する小胞体局在タンパク質の同定を試みたが、同定には至らなかった。

PAS にはリン酸化酵素である Atg1 が存在している。また、Atg2 は Atg1 によってリン酸化されるという報告もある。そこで Atg1 によって Atg2 がリン酸化されることで Atg2 が小胞体と結合できるようになるという仮説を立て検証した。オートファジー誘導条件においても Atg2 は PAS 局在のみが観察され、小胞体全体への局在化は観察されない。これは Atg1 によるリン酸化が PAS 上でのみ起こり、小胞体に結合できる Atg2 が PAS に局在化したものに限られているためだと考えられる。そこで細胞質で Atg1 によって Atg2 をリン酸化することができれば、Atg2 が小胞体に局在できるのではないかと考え、Atg2 と Atg1 を人工的に結合させた。その結果、Atg2 の小胞体局在を観察することができた。この Atg2 の小胞体局在には Atg1 のリン酸化活性や Atg2 のオートファジーに重要な N 末端領域が必要であることが明らかとなった。また、Atg2 が小胞体に局在化する条件で Atg2 を免疫沈降し、共免疫沈降産物の質量分析を行うことで小胞体に局在する Atg2 の相互作用因子の同定を試みた。Atg2 との相互作用因子の候補因子として細胞膜と小胞体のコンタクトサイトで働く Scs2 を得た。Scs2 を欠失すると Atg1 と Atg2 を人工的に結合させても Atg2 の小胞体全体への局在化は観察できなかった。しかし Scs2 を欠失させてもオートファジー活性には大きな影響を与えなかった。Scs2 欠失細胞においても、Atg1 と人工的に結合させた Atg2 は小胞体近傍に輝点を形成することから、Scs2 以外の因子も Atg2 と小胞体との相互作用に関与することが示唆された。

Atg2 過剰発現細胞を長時間培養すると、Atg2 が細胞膜付近に局在化することを見つけた(図3)。細胞膜の直下には小胞体も存在しており、Atg2 が小胞体に局在化している可能性も考えられる。この Atg2 の細胞膜付近への局在化は Atg2 の結合相手である Atg18 には依存せず、Atg2 の N 末端領域に依存していることを明らかにした。

本研究課題により Atg2 と小胞体との相互作用が Atg1 によるリン酸化によって制御されることが示唆された。Atg2 が相互作用する小胞体の部位に関してはまだ不明な点が残されている。また、試験管内での小胞体からオートファゴソーム前駆体膜への脂質輸送の再構成には着手することができなかった。これらの点は今後の課題となる。

Atg2-GFP_{Phy}-His

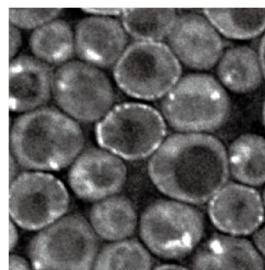


図3 Atg2 過剰発現細胞を YPD で 2 日間培養した時の Atg2 の細胞膜局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Mochida Keisuke, Otani Toshifumi, Katsumata Yuto, Kirisako Hiromi, Kakuta Chika, Kotani Tetsuya, Nakatogawa Hitoshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Atg39 links and deforms the outer and inner nuclear membranes in selective autophagy of the nucleus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202103178	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 -
1. 著者名 Tomioaka Yui, Kotani Tetsuya, Kirisako Hiromi, Oikawa Yu, Kimura Yayoi, Hirano Hisashi, Ohsumi Yoshinori, Nakatogawa Hitoshi	4. 巻 219
2. 論文標題 TORC1 inactivation stimulates autophagy of nucleoporin and nuclear pore complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e201910063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201910063	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 Matoba Kazuaki, Kotani Tetsuya, Tsutsumi Akihisa, Tsuji Takuma, Mori Takaharu, Noshiro Daisuke, Sugita Yuji, Nomura Norimichi, Iwata So, Ohsumi Yoshinori, Fujimoto Toyoshi, Nakatogawa Hitoshi, Kikkawa Masahide, Noda Nobuo N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-00518-w	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 -
1. 著者名 Obara Keisuke, Kotani Tetsuya, Nakatogawa Hitoshi, Kihara Akio, Kamura Takumi	4. 巻 45
2. 論文標題 <i>N</i>-glycosylation of Rim21 at an Unconventional Site Fine-tunes Its Behavior in the Plasma Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19021	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 小谷哲也、中戸川仁	4. 巻 272
2. 論文標題 オートファゴソーム膜の供給 : 小胞	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 週刊「医学のあゆみ」	6. 最初と最後の頁 725-729
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 -

1. 著者名 中戸川 仁、小谷 哲也	4. 巻 91
2. 論文標題 オートファゴソーム形成機構の最新像	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 602 ~ 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910602	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tetsuya Kotani, Hiromi Kirisako, Chika Kakuta, Yoshinori Ohsumi, Hitoshi Nakatogawa
2. 発表標題 Atg24-Atg20 complex is necessary for sequestration of large components into autophagosome
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷哲也 中戸川仁
2. 発表標題 オートファゴソーム形成における膜の形態制御
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷哲也 中戸川仁
2. 発表標題 マイトファジーに必要な隔離膜の形態制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷哲也
2. 発表標題 The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 JSPS A3 Foresight Program The 5th Joint Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷哲也
2. 発表標題 隔離膜伸張におけるAtg24複合体の役割
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会 第1回新学術「マルチモードオートファジー」班会議
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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