

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06532

研究課題名(和文) タンパク質依存的なオルガネラ間大量脂質輸送機構の解明

研究課題名(英文) Study of protein-dependent bulk phospholipid transfer between organelles

研究代表者

大澤 拓生 (Osawa, Takuo)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：00771164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジータンパク質Atg2は小胞体と隔離膜を係留しリン脂質を小胞体から隔離膜へ輸送するが、そのリン脂質輸送の仕組みはこれまで明らかにされていなかった。本研究では単粒子解析やAlphaFold2から得られた構造情報を利用することで、Atg2のリン脂質輸送について詳細な解析を行った。構造情報に基づくと、Atg2は分子の長軸に沿って脂質を結合することが可能な疎水性の溝を持っている。溝を狭めると予測されるアミノ酸欠損は、Atg2の脂質輸送能を低下させ、オートファジーを阻害した。以上の結果は、Atg2が小胞体と隔離膜をつなぐリン脂質の輸送橋として機能していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が機能を維持する上で、オルガネラ間の脂質のやり取りは必要不可欠である。膜間での大量のリン脂質移動は膜同士の接触によって起こると考えられてきた。本研究成果は、脂質輸送タンパク質によっても大量のリン脂質の移動が起こりうることを示しており、オートファジー分野だけでなく細胞生物学的にも学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The autophagy-related protein Atg2 tethers the endoplasmic reticulum (ER) to the isolation membrane (IM) and transfers phospholipids from the ER to the IM. The mechanism of Atg2-mediated phospholipid transfer has not been elucidated. In this study, we obtained structural information of Atg2 using single particle analysis and AlphaFold2 and used it to investigate how Atg2 transfers phospholipids. Based on the structural information, Atg2 has a long hydrophobic groove for phospholipid binding. Amino acid deletion predicted to narrow the groove of Atg2 reduced the phospholipid transfer activity of Atg2 and impaired autophagy in yeast cells. These results suggest that Atg2 acts as a bridge for phospholipids to move from the ER to the IM.

研究分野：構造生物

キーワード：オートファジー 脂質輸送

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、隔離膜(オートファゴソーム前駆体)と呼ばれる一過性の巨大オルガネラを利用して多様な細胞構成物を液胞/リソソームに輸送し分解を行うプロセスである。オートファジー関連タンパク質 Atg2 は隔離膜先端と小胞体を係留し、隔離膜伸長に必要なリン脂質を小胞体から隔離膜へ輸送しているのではないかと考えられていた(引用文献 1)。しかし、膜間での大量のリン脂質の移動は膜同士の接触で起こると一般的には考えられており、果たして Atg2 がリン脂質輸送の主要な担い手であるのか、そして Atg2 がどのようにしてリン脂質を輸送しているのかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

Atg2 の構造機能解析を行うことで隔離膜への脂質供給の仕組みを解明する。

3. 研究の方法

出芽酵母 Atg2 を対象とした構造機能解析を行った。当初はクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって Atg2 の立体構造決定を試みたが、機能解析の基盤となるほどの高分解能構造を得ることはできなかった。そこで AlphaFold2 による予測構造に基づいて、Atg2 の脂質輸送活性を低下させうる変異体をデザインし、変異体の活性(膜係留活性、脂質輸送活性)および変異体がオートファジーに及ぼす影響を調べた。

単粒子解析のための画像データの収集は Talos Arctica で行い、画像解析には Relion を使用した。Atg2 の原子モデルは AlphaFold Protein structure Database から取得した。Atg2 変異体の構造予測には AlphaFold2 を使用した。オートファジー活性の評価は Pgk1-GFP cleavage assay、aminopeptidase 1 maturation assay によって行った。Atg2 の膜係留能に関しては、リポソームの粒子径分布の変化を動的光散乱で測定することによって評価した。Atg2 の脂質輸送活性は、蛍光脂質とリポソームを利用したアッセイによって評価した。機能解析に関しては、共同研究者の協力のもと行った。

4. 研究成果

単粒子解析の結果、出芽酵母由来 Atg2 の三次元再構成像(分解能 9.5、FSC=0.143)の取得に成功した。三次元再構成像は細長い形をしており、像の長軸に沿って長い空洞(～160 Å)が存在していた(図)。Atg2 のアミノ酸配列に基づく、観察された内部空洞は疎水性アミノ酸によって構成される脂質結合部位ではないかと推測された。Atg2 は脂質輸送能に加えて膜同士を係留する機能も有している。そのため、Atg2 は小胞体と隔離膜をブリッジし、疎水性空洞を通してリン脂質を隔離膜側へ輸送している可能性が考えられた。

構造情報に基づく機能解析が仮説の検証に必要であったが、機能解析の基盤となるような高分解能構造を

実験的に決定することはできなかった。そこで、AlphaFold2 による Atg2 の予測構造を機能解析の基盤として利用した。予測構造の形状は再構成像と似ており、構造の長軸に沿って疎水性の溝が存在していた。溝の大部分はハーフパイプ状の繰り返し構造によって構成されており、そこには溝の開閉口を跨ぐ特徴的なループ構造(ARCH)が複数見られた。ARCH の長さを短くすると、疎水性溝が狭くなることが AlphaFold2 により予測された。そこで共同研究者の協力のもと、ARCH を短くした Atg2 変異体を複数作製し、それら変異体を発現させた出芽酵母のオートファジー活性を調べた。その結果、細胞内局在や他因子との相互作用が正常にも関わらず、オートファジーを阻害する変異体が含まれていることが明らかとなった。その変異体の膜係留能は野生型と同等である一方で、脂質輸送能は野生型と比べて低下していた。以上の結果は、疎水性溝が狭くなることで Atg2 から隔離膜へのリン脂質の移動が妨げられたことを示唆しており、Atg2 が「橋」として機能することでリン脂質を隔離膜へ運んでいるのだと考えられる。また、ARCH 変異が Atg2 の脂質輸送能だけを低下させ、それがオートファジーの阻害へとつながったことから、隔離膜へのリン脂質輸送の主要な担い手は Atg2 ではないかと考えられる。

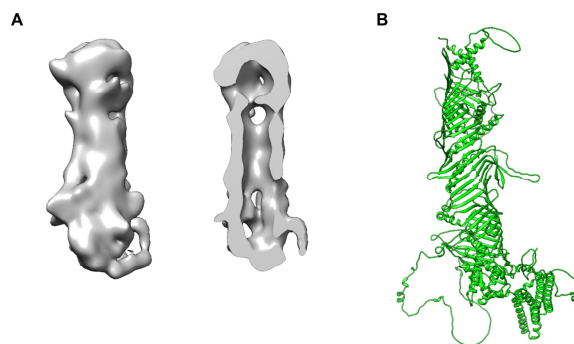


図 Atg2 の三次元再構成像と AlphaFold2 予測構造 (A) 三次元再構成像(左)とその断面図(右) (B) AlphaFold 構造

引用文献

1. Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat Struct Mol Biol.* 2019 Apr;26(4):281-288. doi: 10.1038/s41594-019-0203-4.

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 Osawa Takuo, Matoba Kazuaki, Noda Nobuo N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Lipid Transport from Endoplasmic Reticulum to Autophagic Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a041254 ~ a041254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/cshperspect.a041254	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0件

〔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
研究協力者	包 明久 (Tsutsumi Akihisa)		
研究協力者	的場 一晃 (Matoba Kazuaki) (60613792)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員 (72801)	
研究協力者	小谷 哲也 (Kotani Tetsuya) (10724643)	東京工業大学・科学技術創成研究院・特任講師 (12608)	
研究協力者	吉川 雅英 (Kikkawa Masahide) (80272425)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601)	

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
研究協力者	中戸川 仁 (Nakatogawa Hitoshi) (90414010)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 (12608)	
研究協力者	野田 展生 (Noda Nobuo) (40396297)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	

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