

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14720

研究課題名(和文)オートファゴソーム外膜因子の同定と膜融合過程の解析

研究課題名(英文) Screening of autophagosomal outer membrane proteins required for membrane fusion

研究代表者

山本 林 (Yamamoto, Hayashi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：80551283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファゴソームとリソソームの膜融合に関わる因子を同定するため、オートファゴソーム外膜因子の網羅的同定を行った。STX17変異体過剰発現、OptiPrep密度勾配遠心、LC3を標的とした短時間精製を組み合わせることでオートファゴソームを高純度・高効率に精製する方法を確立した。水溶性ビオチン化試薬で外膜因子を特異的に修飾・精製した後、質量分析に供することで複数の外膜因子候補を得た。これらの因子についてCRISPR法での遺伝子破壊細胞の作製、およびsiRNA法でのタンパク質量抑制を行ったがオートファジー活性への影響は限定的でリソソームとの膜融合に関わる因子の同手には至っていない。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a fundamental degradation system conserved in eukaryotes. Upon induction of autophagy, a double-membrane structure, called an autophagosome, is generated and fuses with lysosomes to degrade its contents. Although many ATG proteins have been identified, it remains unclear how autophagosome-lysosome fusion is regulated. In this study, we tried to develop a biochemical method to purify autophagosomes and to identify autophagosomal outer membrane proteins involved in the membrane fusion. For this purpose, we prepared GFP-STX17DN cells to accumulate autophagosomes, harvested an autophagosome-enriched fraction by OptiPrep flotation, and purified autophagosomes using 3xFLAG-LC3. Finally, outer membrane proteins were labeled by a membrane-impermeable biotinylation reagent. By mass spectrometry of the biotinylated proteins, we obtained several candidates of outer membrane proteins. We prepared KO cells (CRISPR) or KD cells (siRNA), however, significant phenotypes were not observed.

研究分野：生化学

キーワード：オートファジー 膜融合 SNARE

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物が持つ細胞内大規模分解機構であり、栄養飢餓時に細胞質成分の一部を分解し、その分解産物を再利用することで飢餓を生き延びるといった生存戦略の1つと考えられている。また、近年の研究から、オートファジーは飢餓応答だけでなく、細胞内品質管理、初期胚発生、腫瘍形成抑制など様々な高次生理機能に関与することが明らかとなり、臨床応用や創薬の面からも注目を集めている。

オートファジーが誘導されると隔離膜と呼ばれる扁平な膜が形成され、この隔離膜が伸長することで二重膜構造体であるオートファゴソームが形成される。その後、オートファゴソームの外膜と分解オルガネラ(哺乳類などでは液胞)、出芽酵母や植物などでは液胞)が膜融合することで内容物が分解される。オートファジーの過程は大きく3つのステップに分けられ、(1) オートファジー関連因子 ATG (autophagy-related) の集積ステップ(オートファゴソーム形成の初期ステップに相当)、(2) オートファゴソーム膜の伸長ステップ、(3) オートファゴソームとリソソームの膜融合ステップで構成されている。出芽酵母や哺乳類などを用いたこれまでの研究から、多くのオートファジー関連因子 ATG (autophagy-related) が同定されており、ATG 因子の集積ステップや、オートファゴソーム膜の伸長ステップについては分子レベルでの理解が進みつつあるが、終盤のオートファゴソーム膜融合ステップについてはその理解が遅れている。細胞内において、分解オルガネラであるリソソームとの膜融合は時空間的に厳密に制御されていると考えられるが、この膜融合ステップに関連する因子についての報告は少なく、特にオートファゴソーム外膜に局在する因子についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

オートファゴソームとリソソームの膜融合過程について理解が進んでいない原因の1つとして、オートファゴソームの外膜に局在する因子がほとんど分かっていないという点が挙げられる。これは、オートファゴソームがオートファジー誘導に伴って新規に作られる一過性のオルガネラで細胞内存在量が非常に少ないことから局在因子の同定が困難であるという理由がある。また、通常の方法でオートファゴソームを単離しただけではオートファゴソームの内容物(細胞質成分を含む)とオートファゴソーム膜局在因子を区別することができないため、オートファゴソーム膜局在因子だけを同定することができないという制約があった。そこで本研究では、第一の目的としてオートファゴソームを高効率・高純度に単離精製する方法の確立を目指し、第二の目的として単離オートファゴソームを化学的に修飾する、あるいは外膜

成分だけをマイクロ流体デバイスで分離することでオートファゴソーム膜局在因子を網羅的に同定することを目指す。また、同定された因子の中からオートファゴソームとリソソームの膜融合に関わる因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞においてオートファゴソームを効率的に蓄積させるため、当研究室で開発した STX17 ドミナントネガティブ変異体の過剰発現細胞を用いた(引用文献) STX17 はオートファゴソームとリソソームの膜融合に関与する SNARE タンパク質(膜融合に関与するオートファゴソーム外膜因子として知られている因子)で、N 末端側の Habc ドメイン欠失体に GFP を付加することで機能不全を起こす(GFP-STX17DN)。この GFP-STX17DN を過剰発現させることでオートファゴソームとリソソームの膜融合を阻害することができ、オートファゴソームを細胞質に蓄積させることが可能である。ドキシサイクリン誘導性の GFP-STX17DN 過剰発現 HeLa 細胞からオートファゴソームの単離精製を行った。

(2) オートファゴソームを生化学的に単離精製するため、オートファゴソームタンパク質の1つである LC3 に 3xFLAG タグを付加して HeLa 細胞に発現させた。HeLa 細胞破砕液を OptiPrep 密度勾配遠心に掛けてオートファゴソームが濃縮された画分を回収し、anti-FLAG 磁気ビーズを用いてオートファゴソームの精製を行った。

(3) 精製オートファゴソームにおいて外膜因子だけを特異的に標識するため水溶性ビオチン化試薬による修飾を行い、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジン磁気ビーズを用いて精製した。精製標品を質量分析に供して外膜候補因子の網羅的同定を行った。

(4) 質量分析で得られた外膜因子候補について CRISPR 法による遺伝子破壊細胞を作製し、オートファジー活性や膜融合活性への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) GFP-STX17DN 過剰発現 HeLa 細胞においてオートファゴソームが高効率に蓄積することを確認した後(引用文献) OptiPrep 密度勾配遠心によるオートファゴソーム画分の濃縮を行った。その結果、オートファゴソームはミトコンドリアや小胞体など他のオルガネラと比べて非常に低密度なことが分かったが、通常の密度勾配遠心法ではオートファゴソームを含む低密度画分への他のオルガネラの混入が多かったため、分画方法の改善・最適化を行い、最終的に OptiPrep 段階密度勾配を用いたフローテーションによる分画でオートファゴソームが高純度に濃縮されることを見出した。

(2) オートファゴソームマーカーとして

3xFLAG-LC3を発現する GFP-STX17DN 過剰発現 HeLa 細胞からオートファゴソーム画分を調製し、anti-FLAG 磁気ビーズで精製を行った。次の特異的ビオチン化のため、オートファゴソームの膜を保ったまま溶出する必要があったため、精製条件および溶出条件を検討したところ、磁気ビーズとの結合時間を短時間にした上で、高濃度 3xFLAG ペプチドによる溶出に変更することでオートファゴソームを高純度・高効率に精製することができた。これまで哺乳類細胞を用いてオートファゴソームを高純度・高効率に精製した報告はなかったが、本研究では GFP-STX17DN 過剰発現、OptiPrep 段階密度勾配を用いたフローテーション、3xFLAG-LC3 を標的とした短時間精製という3つのステップを経ることでオートファゴソームの生化学的単離方法を確立することに成功した。

(3) これまでオートファゴソーム膜局在因子とオートファゴソームの内容物(細胞質成分を含む)を区別して解析する方法がなかったが、本研究では精製オートファゴソームに対して水溶性ビオチン化試薬での処理を行うことで膜の外側に露出した因子(オートファゴソーム外膜因子)だけを特異的にビオチン化する方法を確立した。複数のビオチン化試薬で反応条件の最適化を行ったところ、1 mM Sulfo-NHS-Biotin (Thermo) での処理によって内容物のビオチン化がないまま外膜因子を特異的にビオチン化することが可能となった。

(4) 上記の特異的ビオチン化後、ストレプトアビジン磁気ビーズによる精製を行い、得られた精製標品を on beads でトリプシン処理した後、質量分析に供することで複数の外膜候補因子を得た。これらの候補因子について CRISPR 法による遺伝子破壊細胞の作製、および siRNA 法による発現量抑制実験を行った。その結果、いくつかの因子ではオートファジー活性の低下が見られるもののその表現型は非常に限定的で、現在のところオートファゴソーム膜融合を直接制御する因子の同定には至っていない。また、我々のグループではオートファゴソーム膜の新規 SNARE として YKT6 を同定しており、YKT6 が SNAP29 および STX7 と SNARE 複合体を作ることによってオートファゴソームとリソソームの膜融合に関与することを報告している(引用文献)。

<引用文献>

Uematsu et al., Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative STX17 (syntaxin 17) mutants. (2017) *Autophagy*, DOI: 10.1080/15548627.2017.1327940

Matsui et al., Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. (2018) *J. Cell*

Biol., DOI: 10.1083/jcb.201712058

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

松井 貴英、Peidu Jiang、中野 沙緒里、酒巻 有里子、山本 林、水島 昇、Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17, *J. Cell Biol.*, 査読有、in press, DOI: 10.1083/jcb.201712058

植松 真章、西村 多喜、酒巻 有里子、山本 林、水島 昇、Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative STX17 (syntaxin 17) mutants, *Autophagy*, 査読有、Vol. 13, p. 1452–1464, DOI: 10.1080/15548627.2017.1327940

[学会発表](計3件)

山本 林、オートファジー始動複合体の動的相互作用と分子集合形態の解析、ConBio2017、2017年

山本 林、オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析、第68回日本電気泳動学会総会、2017年

山本 林、酵母オートファジーアッセイと初期因子の機能、第33回 Wako ワークショップ、2017年

[図書](計2件)

山本 林 他、実験医学・羊土社、オートファジー始動複合体の形成メカニズム、2017、Vol. 35, No. 15, p. 2502–2509

山本 林 他、電気泳動・日本電気泳動学会、オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析、2017、61巻、2号、p. 58–60

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cellcycle.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 林 (YAMAMOTO, Hayashi)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80551283

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

水島 昇 (MIZUSHIMA, Noboru)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10353434

(4)研究協力者

植松 真章 (UEMATSU, Masaaki)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生