

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07302

研究課題名(和文)オートファゴソーム膜閉鎖過程の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of autophagosome membrane closure

研究代表者

本田 郁子(小山郁子)(Honda, Ikuko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任講師

研究者番号：10447948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内分解機構マクロオートファジーを担う膜小胞オートファゴソームの形成は、扁平に伸長した一重膜小胞が球状に湾曲したのちに閉じ、最後には膜分裂が起こり二重膜となって完成することが知られている。本研究では、ESCRTタンパク質複合体がオートファゴソーム形成における膜分裂を担っていることを明らかにした。また、三次元光・電子相関顕微鏡法(3D-CLEM)によりオートファゴソームの開閉を精度よく評価する方法を確立した。さらにオートファゴソーム形成中の膜変形過程について、数理モデルを参考にして理解を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、オートファジー研究において遅れていたオートファゴソーム形成後期の分子機構解析を進展させた。また、物理モデルと実験データの融合研究を生み出した。さらに、本研究にて試みた3D-CLEM法のオルガネラ解析への適用は、生命科学分野で広く応用が可能となるだろう。

研究成果の概要(英文)：In the formation of autophagosome, which is responsible for macroautophagy, it is known that a flat-extended single membrane vesicle closes into a spherical shape and undergoes membrane fission. In this study, we demonstrated that the ESCRT protein complex is required for membrane fission in autophagosome formation. We have also established a method to accurately evaluate the opening and closing of the autophagosome using the 3-Dimensional Correlative Light and Electron Microscopy (3D-CLEM). Furthermore, the process of membrane deformation during autophagosome formation was further understood with the support of a mathematical model.

研究分野：細胞生物学、生物物理学

キーワード：オートファジー オートファゴソーム ESCRT複合体タンパク質 membrane fission リソソーム 3D-CLEM 数理モデル

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

マクロオートファジー（以下、オートファジー）は主な細胞内分解系として知られている。オートファジーでは、オートファゴソームと呼ばれる膜小胞が伸長しながら細胞質を取り囲み、消化酵素を含むリソソームと融合することで、細胞質分解が起こる。オートファゴソーム形成機構の解明は、オートファジーのしくみを理解するうえで大変重要な課題である。

細胞質哺乳類細胞におけるオートファゴソーム形成に必須なオートファジー関連（ATG）タンパク質は、約20種類が知られている。形成初期については、多くの必要因子や局在因子が分かっており研究が進んでいるが、後期過程については既知の関連因子が少なく、研究が遅れている。オートファゴソーム形成後期では、伸長した一重膜小胞膜が球状に湾曲して閉じたのち、膜分裂が起こり、内膜と外膜からなる二重膜小胞になることがわかっている。しかし、その膜変過程の機構やそれを担う因子についてはいまだ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、オートファゴソーム形成後期の機構とそれを担う因子の解析をおこなう。特に、オートファジー分解にはオートファゴソームの内膜と外膜の分化が必要であること、その分化は内膜と外膜の分離をきっかけとして起こり、その分離の機構は ESCRT (endosome sorting complexes required for transport) タンパク質に依存していることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膜分裂の機械因子として知られる ESCRT タンパク質が、オートファゴソーム形成中にリクルートされるかどうかを生細胞観察する。特に、膜閉鎖部位とそのタイミングにリクルートされるかについて注意深く観察する。また、オートファゴソーム膜分裂に必要な ESCRT タンパク質のスクリーニングを行う。

(2) 三次元光 - 電子相関顕微鏡法 (3D-CLEM) を導入し、オートファゴソーム膜の閉鎖と内膜・外膜の差を精度よく評価する。

(3) オートファゴソーム形成中の膜変形過程を生細胞観察で抽出し、観察データと数理モデル（共同研究を含む）を利用して説明する。

4. 研究成果

(1) ESCRT タンパク質複合体-III の一つ CHMP4b とオートファゴソームタンパク質 LC3 を異なる蛍光タンパク質で標識し、リソソームマーカー LysoTracker Red と合わせて3色タイムラプス生細胞観察をおこなった（図1）。その結果、CHMP4b が閉鎖直前の隔離膜辺縁部に一過的に局在することが観察された。同時期に所属研究室内の大学院生によって、CRISPR-Cas9 システムと新規オートファジー活性評価プローブである GFP-LC3-RFP を利用した全遺伝子網羅的スクリーニングが行われ、新規オートファジー関連遺伝子として ESCRT タンパク質複合体-I の一つ VPS37A が同定された。VPS37A 欠損細胞や他の ESCRT タンパク質のノックダウン細胞では、オートファゴソーム外から加えたプロテアーゼ K によってオートファゴソーム内部が分解されたため、これらの細胞のオートファゴソームは完全に閉鎖していないことがわかった。ESCRT タンパク質はエンドソームの成熟やリソソームの機能にも必要であることが知られているが、今回の結果から、リソソーム融合より前に起こる隔離膜閉鎖時の膜分裂にも ESCRT が必要であることが示唆された。

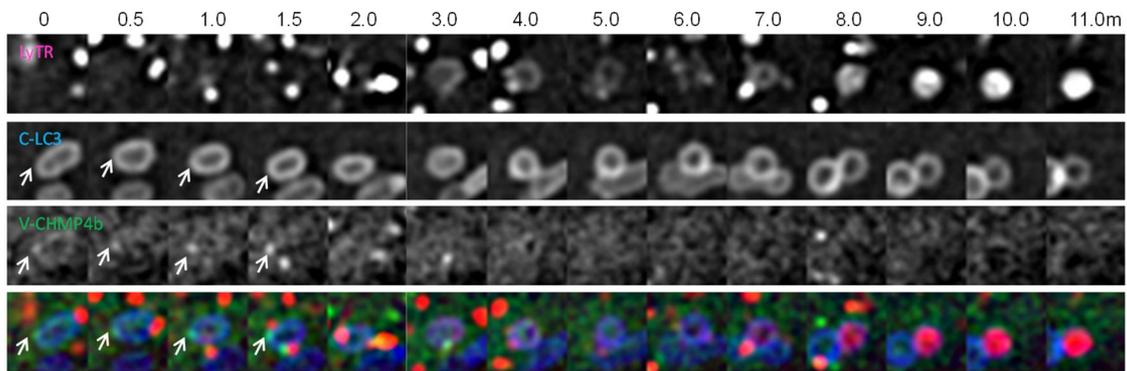


図1 ESCRT タンパク質複合体 III CHMP4B は形成中オートファゴソームの膜閉鎖直前に閉鎖部位へ一過的にリクルートされる。

ESCRT タンパク質複合体 III Venus-CHMP4b (V-CHMP4b)、オートファゴソームマーカー SECFP-LC3 (C-LC3) を安定発現したマウス線維芽細胞に、リソソーム内腔マーカー Lyotracker-Red (LTR) を添加した。アミノ酸血清飢餓条件でオートファジーを誘導後、蛍光顕微鏡で30秒毎30分間タイムラプス観察を行った。矢印は Venus-CHMP4b がリクルートされた部位を指す。

(2) オートファゴソーム膜の閉鎖を評価する方法として、Array Tomography に蛍光顕微鏡像を重ね合わせた、三次元光 - 電子相関顕微鏡法 (3D-CLEM) を実施した。一細胞全体で100個近くのオートファジー関連小胞について、分子局在情報を蛍光顕微鏡像から取得し、同時に3次元構造情報を25~50nm間隔の連続切片の電子顕微鏡像から取得し、ひとつひとつの小胞の開閉状態を評価することができた。

(3) オートファゴソーム形成過程の形態変化説明する物理モデルを裏付ける実験に取り組んだ。形成過程のオートファゴソームの形態変化は、膜面積と膜曲率安定化因子の量およびその分布をパラメータとした物理モデル (東京大学医学系研究科境祐二博士、京都大学ウイルス・再生医科学研究所立川正志博士によって構築された) で説明できる。そこで、オートファゴソーム形成過程の生細胞観察を行い、オートファゴソームの形と高曲率領域の面積および膜面積の時間変化を測定したところ、物理モデルとよく一致した。これらの結果は、オートファゴソーム膜が湾曲して口を閉じるまではATPなどのエネルギーを必要としない自発的な形態変化であることを示唆する。したがって、オートファゴソーム形成中の膜形態変化においてATP加水分解エネルギーが必要なのは、内膜と外膜を分離するときのみであることが見えてきた (投稿中)。

研究期間を通して、オートファゴソーム形成後期ではESCRTタンパク質複合体が必要であること、また、ESCRTタンパク質複合体はオートファゴソームの内膜と外膜の分離を担っていることを明らかにした。オートファゴソーム内膜と外膜の違いを検出する方法確立は今後の課題として残されたが、本研究期間に重点的に試みた3D-CLEMをさらに工夫することで適用できる可能性がある。

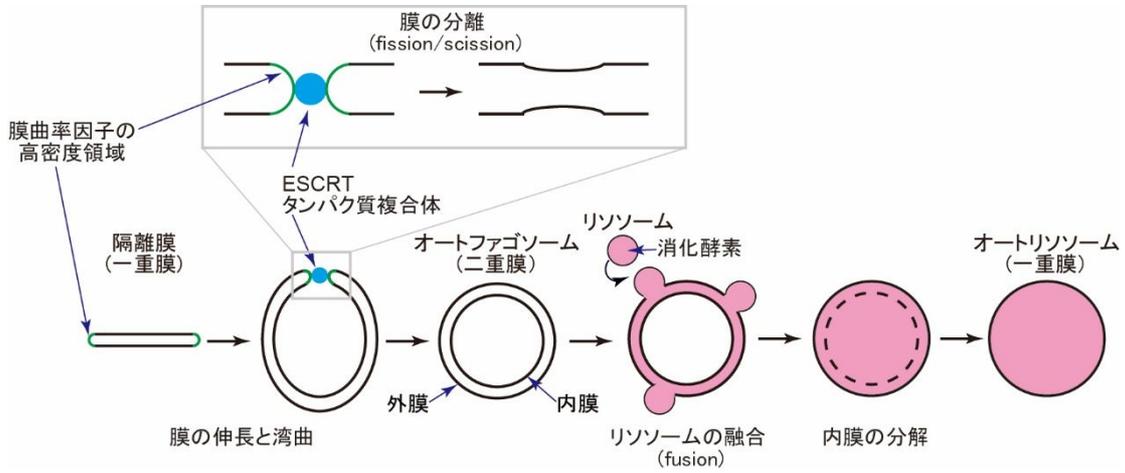


図2 本研究の成果を含めたオートファゴソーム形成機構の仮説

オートファゴソーム前駆体の隔離膜は一重膜小胞で、膜面積と膜曲率因子の増加により扁平に伸長したのち、膜曲率因子が減少すると自発的に球状に湾曲する。膜曲率因子の高密度領域を緑色で示す。穴が閉じる部分に ESCRT タンパク質複合体（青色丸）がリクルートされると、ESCRT タンパク質複合体のもつ ATP 加水分解エネルギーを利用して隔離膜の膜分裂が起こり、外膜と内膜の二重膜小胞のオートファゴソームとなる。オートファゴソーム外膜とリソソームが融合し、リソソームの消化酵素（ピンク色）によって内膜とともに取り囲んだ細胞質が分解され、一重膜のオートリソソームができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyama-Honda Ikuko, Tsuboyama Kotaro, Mizushima Noboru	4. 巻 13
2. 論文標題 ATG conjugation-dependent degradation of the inner autophagosomal membrane is a key step for autophagosome maturation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2017.1319041	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 該当する

1. 著者名 Tamura Norito, Nishimura Taki, Sakamaki Yuriko, Koyama-Honda Ikuko, Yamamoto Hayashi, Mizushima Noboru	4. 巻 591
2. 論文標題 Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3819 ~ 3830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.12901	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 小山-本田郁子、水島昇	4. 巻 262
2. 論文標題 オートファジーを蛍光で観る	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学の歩み	6. 最初と最後の頁 538-543
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10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小山-本田郁子、立川正志、境祐二、田村律人、坂巻純一、望月敦史、水島昇
2. 発表標題 オートファゴソーム形成過程の形態変化
3. 学会等名 第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuko Koyama-Honda
2. 発表標題 Visualization of autophagosome maturation
3. 学会等名 The OIST minisymposium - The 16th International Membrane Research Forum (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山-本田郁子、立川正志、境祐二、田村律人、望月敦史、水島昇
2. 発表標題 オートファゴソーム形成過程における膜曲率安定化因子と膜供給：物理モデルと生細胞観察による研究
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山-本田 郁子，立川 正志，境 祐二，田村 律人，望月 敦史，水島 昇
2. 発表標題 オートファゴソーム形成の生細胞観察と物理モデル構築
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同大会 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 守田 啓悟，小山-本田 郁子，山下 義博，上野 敏秀，森田 英嗣，間野 博行，水島 昇
2. 発表標題 ESCRTタンパク質はオートファゴソーム膜閉鎖過程に機能する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同大会 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Willa Yim, 森下 英晃、小山-本田 郁子、水島 昇
2. 発表標題 リソソームによるオートファゴソーム膜分解のin vitro再構成
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同大会 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 航、森下 英晃、小山-本田 郁子、水島 昇
2. 発表標題 非選択的オートファジー活性評価のための新規プローブ
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同大会 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山-本田 郁子
2. 発表標題 見てわかるオートファジー
3. 学会等名 第5回光塾（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keigo Morita, Ikuko Koyama-Honda, Yoshihiro Yamashita, Toshihide Ueno, Eiji Morita, Hiroyuki Mano, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Autophagosomal closure is mediated by the ESCRT machinery.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2017 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田 郁子
2. 発表標題 オートファゴソームの形成から成熟までの形態変化を追う
3. 学会等名 第14回AMO討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小松 雅明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 104
3. 書名 BIO Clinica オートファジ と疾患	

1. 著者名 大隅良典、吉森 保、水島 昇、中戸川仁	4. 発行年 2017年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 241
3. 書名 オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで	

〔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	水島 昇 (Mizushima Noboru)		