



令和3年7月9日

科学技術振興機構（JST）
微生物化学研究所
東京工業大学
新潟大学
順天堂大学
理化学研究所

オートファゴソームを効率よく作る仕組みを発見 ～オートファジーの主役の働きが明らかに～

ポイント

- 脂質化 A t g 8 は細胞内の不要な物質を分解する仕組み（オートファジー）で中心的な働きをするたんぱく質であり、その脂質膜上での立体構造が初めて明らかになった。
- 脂質化 A t g 8 は、膜の形を変化させることにより、細胞内の異物を包み込む膜（オートファゴソーム）を効率よく作っていることが分かった。
- 細胞内でオートファゴソームを生み出す分子機構の一端が明らかとなり、それを標的とした薬剤の開発につながることを期待される。

JST 戦略的創造研究推進事業において、微生物化学研究所の野田 展生 部長、丸山 達朗 研究員らは、オートファジーで中心的に働いたんぱく質である脂質化 A t g 8^{注1)} が膜の形態を変える活性を持つことを新たに発見し、その活性がオートファゴソームを効率よく作るのに重要であることを明らかにしました。

細胞内のたんぱく質などを分解する仕組みの1つであるオートファジーにおいて、オートファゴソームの形成は分解すべき対象を決定するための極めて重要なステップです。これまでに脂質化 A t g 8 がオートファゴソームの形成において中心的な役割を果たすことが分かっていたのですが、脂質化 A t g 8 が脂質膜上でどのように働いているのか、その実体は分かっていませんでした。

本研究グループは、まず脂質化 A t g 8 が膜の形態を変える活性を持つことを試験管内の実験で明らかにしました。次に脂質化 A t g 8 の立体構造を溶液核磁気共鳴（NMR）法^{注2)} で調べた結果、脂質化 A t g 8 は脂質膜に対して特定の配向を取ることが分かりました。また、脂質化 A t g 8 が脂質膜と相互作用する部位のアミノ酸を同定し、そこに変異を入れたところ、膜の形態を変える活性が失われ、オートファゴソーム形成効率も著しく低下することを見いだしました。以上のことから、脂質化 A t g 8 は脂質膜と相互作用してその形態を変える活性を持っており、この働きによりオートファゴソームの形成を促進することを明らかにしました。

本研究によりオートファゴソーム形成に関わる分子機構の一端が解明され、今後、オートファジーを特異的に制御する薬剤の開発につながることを期待されます。

本研究成果は、2021年7月8日（英国時間）に英国科学誌「Nature Structural & Molecular Biology」のオンライン版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）

研究領域：「細胞内現象の時空間ダイナミクス」

（研究総括：遠藤 斗志也 京都産業大学 生命科学部 教授）

研究課題名：「多階層高次構造体群が駆動するオートファジーダイナミクス」（JPMJCR20E3）

研究代表者：野田 展生（微生物化学研究会 微生物化学研究所 部長）

研究期間：令和2年12月～令和8年3月

<研究の背景と経緯>

オートファジーは細胞内の主要な分解経路であり、有害なたんぱく質凝集体や傷ついたミトコンドリアなどの分解を通して、細胞の恒常性維持に働いています。そしてオートファジーの異常は神経変性疾患やがんなど、重篤な疾病につながると考えられています。オートファジーは、生体にとって極めて基本的かつ重要な現象であり、その仕組みを知ることには疾病の治療や予防法の開発のために欠かせません。

オートファジーでは、オートファゴソームと呼ばれる脂質膜の袋を新たに作り出し、分解対象を包み込んでリソソームへと運び、分解します。オートファゴソームの新生はオートファジーにおける最も特徴的かつ基本的な過程であり、多くのA t gたんぱく質^{注3)}が担っています。中でも、脂質化A t g 8はオートファゴソームやその前駆体である隔離膜に豊富に存在することから、オートファジーを担う中心的なたんぱく質として最も盛んに研究が行われ、またオートファジーの指標分子として広く用いられてきました。しかし、脂質化A t g 8が脂質膜に対して持つ活性や、その活性がオートファゴソーム形成に果たす役割などはよく分かっていませんでした。

脂質化A t g 8が作られる過程において、A t g 8は他のいくつかのA t gたんぱく質が触媒する酵素反応を受けて、膜を構成するリン脂質のうちの1つと共有結合を形成します。このA t g 8の脂質化反応は人工脂質膜を用いて試験管内において再構成することが可能であり、これまでに数多くの研究グループが試験管内で脂質化A t g 8の機能を調べてきました。しかし、脂質化A t g 8が脂質膜に対してどのような活性を持ち、それがどのようにオートファゴソーム形成に使われているのか、その仕組みは依然として謎に満ちていました。

<研究の内容>

これまでの試験管内でのA t g 8の脂質化反応には一般的な球状の人工脂質膜が使われてきましたが、オートファゴソーム前駆体である隔離膜は非球状で形が異なるため、A t g 8の機能を調べるには適さないと考えられました。そこで本研究グループは、隔離膜に形状が近い扁長の巨大人工脂質膜を調製し、それに対しA t g 8の脂質化反応を行い、膜の形態へ及ぼす影響を調べました。その結果、脂質化A t g 8の形成に伴って、扁長の脂質膜がくびれて、互いに連結した2つの球状の脂質膜へと変形することを見いだしました。このことから、脂質化A t g 8は膜の形態を変える活性を持っていることが明らかになりました(図1 a)。

はじめに、マイクロピペット^{注4)}を用いて脂質化反応時の脂質膜の膜面積の変化を測定したところ、脂質化A t g 8の形成に伴って膜面積が増えました(図1 b)。この実験系では脂質化A t g 8は脂質二重層の外層のみに作られることから、脂質化A t g 8によって内層に対する外層の膜面積が増えた結果、上述したような膜の形態変化が生じたと考えられます(図1 c)。

次に脂質化A t g 8の脂質膜上における立体構造を調べるため、溶液NMR法を用いて解析しました。その結果、脂質化A t g 8は脂質膜に対して特定の配向を取ること、脂質化A t g 8の芳香族アミノ酸^{注5)}が脂質膜面と相互作用することが明らかになりました(図2)。また、その芳香族アミノ酸を別のアミノ酸に変異したところ、膜の形態変化および面積の増大が抑制されたことから、脂質化A t g 8は芳香族アミノ酸を用いて脂質膜と相互

作用することで、膜変形の活性を発揮することが分かりました。

さらに、酵母と哺乳類細胞を用いて A t g 8 の芳香族アミノ酸の重要性を解析しました。A t g 8 の芳香族アミノ酸への変異導入によって、酵母におけるオートファゴソームの形成効率が著しく低下することが分かりました。さらに同様の変異を哺乳類 A t g 8 に導入したところ、哺乳類細胞のオートファジー活性も低下することが分かりました。

以上の結果から、脂質化 A t g 8 の膜の形態を変える活性がオートファゴソームの効率的な形成を可能にしていること、その活性において A t g 8 の芳香族アミノ酸の重要性はヒトを含む生物種間で共通していることが明らかになりました。

<今後の展開>

オートファゴソームの形成は、脂質化 A t g 8 を含む多数の A t g たんぱく質と脂質膜の相互作用によって達成されます。本研究では、扁長人工脂質膜とマイクロピペットを用いた技術を試験管内の再構成実験に新たに適用することで、脂質化 A t g 8 の未知の活性を見出すことに成功しました。このように新たな実験系の開発と応用をうまく組み合わせることで、個々の A t g たんぱく質が持つ活性とそれらの機能連携を明らかにすることが可能となり、オートファゴソーム形成の分子機構の完全理解につながることを期待されます。

オートファゴソーム形成はオートファジーの最も基本的かつ重要な過程であり、その理解を深めることは、オートファジーを人工的に高度に制御するためには不可欠です。本研究で確立した試験管内での活性測定系は、オートファジー制御化合物の活性評価に応用可能であり、オートファジーに関連したさまざまな疾病の治療や予防法の開発研究の促進にも寄与することが期待されます。

<付記>

本研究は、東京工業大学 生命理工学院の中戸川 仁 准教授および東京工業大学 科学技術創成研究院の大隅 良典 栄誉教授、新潟大学 大学院医歯学総合研究科の神吉 智文 教授、順天堂大学 大学院医学研究科の小松 雅明 教授、理化学研究所 生命機能科学研究センターの嶋田 一夫 チームリーダーらと共同で行いました。

<参考図>

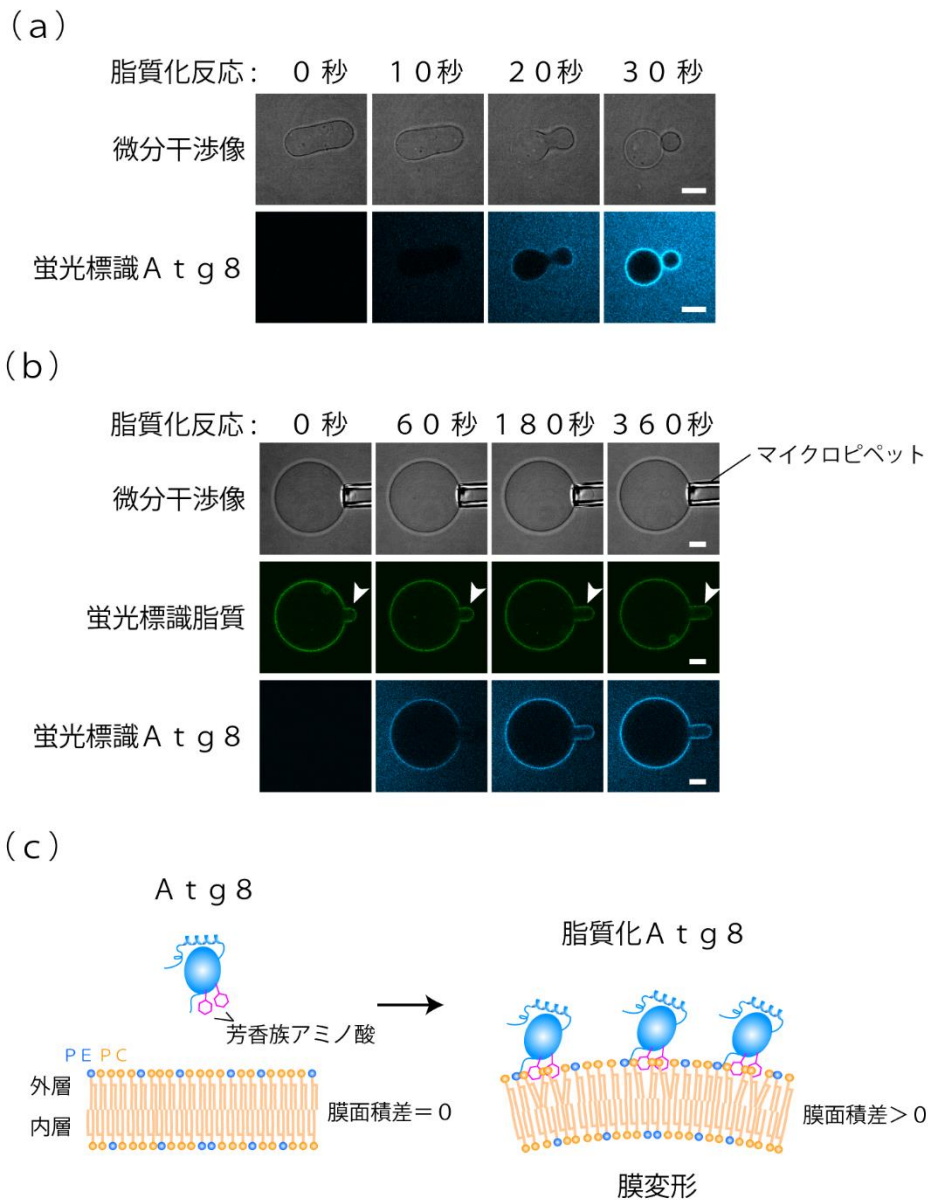


図1 脂質化 A t g 8 の膜変形活性

- (a) A t g 8 の脂質化に伴って、扁長の脂質膜が、連結した2つの球状の脂質膜に変形する。(スケールバー：10マイクロメートル)
- (b) A t g 8 の脂質化に伴って、脂質膜のマイクロピペット内の部分(白い矢頭)が増大している。(スケールバー：10マイクロメートル)
- (c) 脂質化 A t g 8 の芳香族アミノ酸が脂質膜の外層と相互作用することで、内層に対して膜面積差が増えて、膜変形が生じる。(PC：ホスファチジルコリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン)

脂質化A t g 8

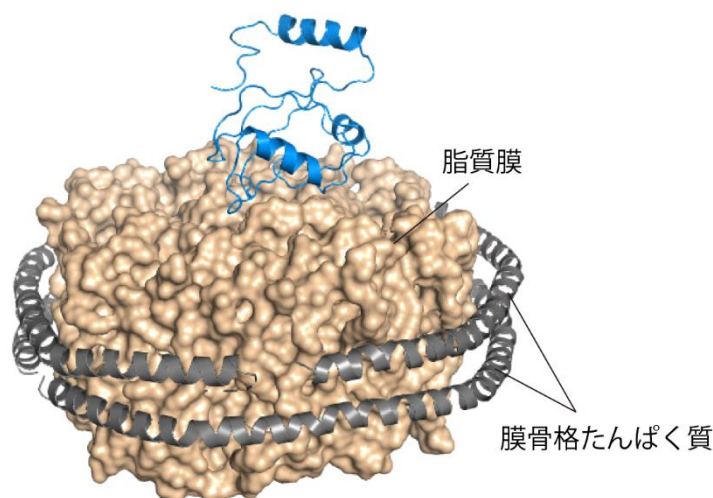


図2 脂質化A t g 8の構造

膜骨格たんぱく質を利用して脂質膜を可溶化し、そこに脂質化A t g 8を再構成することで、溶液NMR法による解析を可能にした。その結果、脂質化A t g 8は膜上において図のような配向を取り、脂質膜表面と相互作用することが明らかとなった。脂質化A t g 8および膜骨格たんぱく質をリボン図、脂質膜を表面表示でそれぞれ示した。

<用語解説>

注1) 脂質化A t g 8

膜を構成するリン脂質と共有結合を形成したA t g 8の名称。リン脂質は、リン酸エステルを持つ脂質の総称で、親水性の部分と疎水性の部分の両方を持っており、脂質膜に主に含まれている。脂質化A t g 8はオートファゴソームや隔離膜に豊富に見られることから、オートファジーの指標分子として広く研究に活用されている。

注2) 核磁気共鳴 (NMR) 法

強い磁場中に置かれた原子核は、原子核の性質や周囲の環境に応じた周波数 (共鳴周波数) の電磁波と相互作用する。核磁気共鳴法は、その電磁波をNMR信号として捉えることで、物質の構造や性質の情報を取得する手法。NMRはNuclear Magnetic Resonanceの略。

注3) A t gたんぱく質

酵母で同定されたオートファジーに関与するたんぱく質群の名称で、これまでに40種類以上報告されている。A t gの後におおよそ同定された順に通し番号が付けられている。A t gたんぱく質群のうち、栄養飢餓時のオートファゴソーム形成に重要なものは19種類である。

注4) マイクロピペット

中空のガラスで作られた、口径が数~数十マイクロメートルの細管。今回の研究では、脂質膜を一定の圧力で吸引するために用いられ、マイクロピペット内に引き込まれた脂質

膜の長さを計測することで膜面積変化を定量することが可能である。

注5) 芳香族アミノ酸

アミノ酸のうち、トリプトファンやチロシン、フェニルアラニンのように、その構造の中に芳香環を持つアミノ酸の総称。たんぱく質の内部に埋もれて構造の維持に働く他、表面に出たものは他のたんぱく質や脂質膜との相互作用に働くことが知られている。

<論文タイトル>

“Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis”
(脂質化 Atg8 による膜摂動がオートファゴソーム形成を可能にする)

DOI : 10.1038/s41594-021-00614-5

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

野田 展生 (ノダ ノブオ)

微生物化学研究会 微生物化学研究所 構造生物学研究部 部長

〒141-0021 東京都品川区上大崎3-14-23

Tel : 03-3441-4173 Fax : 03-6455-7348

E-mail : nn[at]bikaken.or.jp

<JST事業に関すること>

保田 睦子 (ヤスタ ムツコ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町

Tel : 03-3512-3524 Fax : 03-3222-2064

E-mail : crest[at]jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

微生物化学研究会 微生物化学研究所 知的財産情報部

〒141-0021 東京都品川区上大崎3-14-23

Tel : 03-3441-4173 Fax : 03-3441-7589

E-mail : office[at]bikaken.or.jp

東京工業大学 総務部 広報課

〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1

Tel : 03-5734-2975 Fax : 03-5734-3661

E-mail : media[at]jim.titech.ac.jp

新潟大学 総務部 総務課 広報室

〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地

Tel : 025-262-7000 Fax : 025-262-6539

E-mail : pr-office[at]adm.niigata-u.ac.jp

順天堂大学 総務部 文書・広報課

〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1

Tel : 03-5802-1006 Fax : 03-3814-9100

E-mail : pr[at]juntendo.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

E-mail : ex-press[at]riken.jp