

## 総力特集 オートファジーが拓く新世界

# たんぱく質の構造を解明 液一液相分離が反応のカギ

のだ のぶお  
**野田 展生**

微生物化学研究所 構造生物学研究部 部長  
2013年よりCREST研究代表者  
(2013~19年、20年~)

### 共同研究から異分野へ 現象解明にのめり込む

オートファジーは体内のたんぱく質をリサイクルするシステムだが、なんでも分解するわけではない。分解対象となる物質を「オートファゴソーム」と呼ばれる脂質の膜構造物に包み込んでから分解する(図1)。つまり分解するものとしないものを、オートファゴソームで包む際に分別している。このオートファゴソーム形成の仕組みに注目するのは、微生物化学研究所構造生物学研究部の野田展生部長だ。野田さんはCREST「細胞内現象の時空間ダイナミクス」研究領域の「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」でも研究代表者を務める。

野田さんとオートファジーの出会いはポストドク時代までさかのばる。大学院ではたんぱく質の結晶にX線を照射して構造を調べるX線結晶構造解析を専門としていたが、博士号取得後、結晶を作らずに核磁気共鳴(NMR)でたんぱく質の構造解析を行っていた北海道大学大学院薬学研究科の稻垣冬彦教授(当時の研究室で博士研究員となつた)。

野田さんは当時こう振り返る。「たんぱく質の構造解析を通じて生命現象に

迫りたいと考えていました。しかし結晶でたんぱく質の構造がわかつても、体内にいるときや反応時に構造が変わることもあり、生命現象との間には大きなギャップがあると感じていました。このままでいいのかと悩み、もう少し実際の現象に近い動的な状態を観察できる手法を学ぼうと思いました」。そして、野田さんがNMRによる溶液状態での構造解析の文化に感化されていた頃、稻垣研究室に東京工業大学の大隅良典特任教授から共同研究の申し出があった。

オートファジーに関わる多くのATG遺伝子を発見した大隅博士は、遺伝子の機能解明に向けて、稻垣さんに共同研究を打診し、ATG遺伝子を作るAtgたんぱく質の構造を野田さんが調べることになった。「お恥ずかしい話ですが、共同研究するまで、オートファジーという言葉も知りませんでした。急いで勉強してみたところ、これが実に興味深い現象で、一気にのめり込みました」と振り返る。当時は細胞小器官やたんぱく質の分解、再生に関わることはわかっていたが、その仕組みはほとんど解明されていなかった。しかも、関わっ

ている遺伝子が多く、取り組みがいのある生命現象だと感じたという。

### 袋の材料を運ぶたんぱく質 内部に巨大な疎水性の空洞

こうして野田さんのオートファジー研究は始まった。アミノ酸が鎖状に連なって合成されるたんぱく質は、配列が規定する固有の立体構造を取り、それが機能を規定している。当時ほとんどわかつていなかつたAtgたんぱく質の構造と機能の解明を目指し、野田さんはAtgたんぱく質の結晶を作つて構造解析を試みた。多くのAtgたんぱく質は特定の立体構造をとる領域に加えて、構造を持たずによれ動く「天然変性領域」と呼ばれる領域を併せ持つため、結晶化は難しかつた。そこで野田さんは天然変性領域を

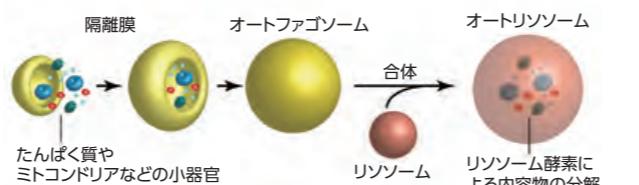


図1 オートファジーでは、最初に細胞の中で脂質が集まって膜を作り、たんぱく質やミトコンドリアなどの小器官を包んだ「オートファゴソーム」を形成する。これが、オートファジーに使われる分解酵素を内包した「リソソーム」と合体し、取り込まれた小器官などがその酵素によって分解される。生成したアミノ酸を体内でリサイクルして飢餓をしのいだり、細胞に入り込んだバクテリアや機能不全を起こした細胞小器官などを分解浄化したりする。

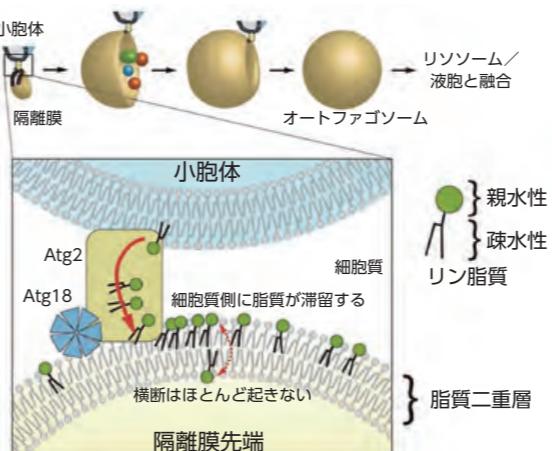


図2 オートファゴソーム形成過程の模式図。オートファジーが誘導されると、細胞質中に隔離膜とよばれる膜構造が突如出現する。それが分解対象を包み込みながら伸展し、閉じてオートファゴソームとなる。隔離膜が伸展するために必要なリン脂質はAtg2が小胞体から供給するが、それだけでは隔離膜の細胞質側の層に脂質が滞留する。横断はほとんど起きない。

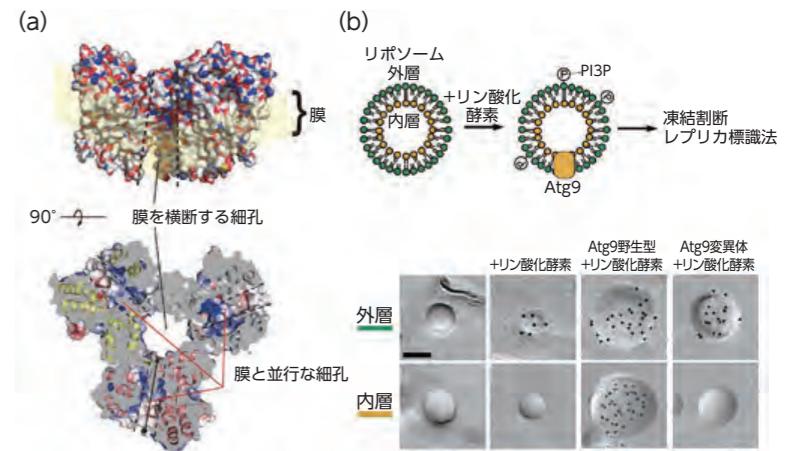


図3 Atg9の構造と脂質スクランブル活性。Atg9は三量体を形成し、中心に膜を貫通する細孔と、それぞれの分子に膜と並行な細孔が存在する(a)。それらがつながることで脂質の通路を形成している。Atg9はリボソームの外層のPI3P(リン脂質の一種)を内層に移動させる活性を持っているが、その活性は細孔の変異体により阻害される。黒のドットはPI3Pの分布を表す(b)。

削ることで結晶を作ることに成功し、次々と構造を決定していった。

そして最後に残った難題が、主要なAtgたんぱく質の中で最も大きいAtg2と、唯一の膜たんぱく質であるAtg9だった。Atg2は脂質結合たんぱく質Atg18と複合体を形成し、オートファゴソームの前駆体である隔離膜に結合することはわかっていた。その後、17年に電子顕微鏡解析で、こん棒状の形で長さ20ナノ(ナノは10億分の1)メートル程度であることが明らかになった。野田さんは部分的な結晶化に成功すると、19年に構造を解析し、中心に巨大な空洞を持つことを確かめた。

この空洞内はほぼ疎水性アミノ酸で構成されていたことから、野田さんは脂質と結合すると考えた。リン脂質との複合体の結晶化を試みたところ、狙いは見事的中し、空洞にリン脂質を取り込んだ状態で結晶化することに成功した。これにより、Atg2はオートファゴソームを作るために必要となるリン脂質を小胞体から引き抜いて運んでくる役割を担う、脂質輸送たんぱく質であることが明らかになった(図2)。

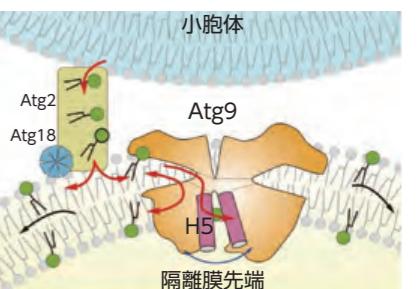
一方、オートファゴソームは脂質二重膜でできた袋状の器官である。二重膜の細胞質側の外層のリン脂質をAtg2が運んできても、内層の脂質が無ければ二重膜を伸展することはできない。そこで野田さんは、役割が不明だった膜たんぱく質のAtg9に着目した。Atg9の構造

を調べるために結晶化に労力を注いだが、結晶が得られない状況が長らく続いた。その突破口となったのが、CRESTの同じ領域に参画していた東京大学大学院医学系研究科の吉川雅英教授との共同研究だ。吉川さんの専門であるクライオ電子顕微鏡を用いることで、Atg9の立体構造が確定した。Atg9はAtg2と同様に疎水性の空洞を持つことがわかり、脂質を運ぶ働きがあるのではないかと野田さんは考えた。

試験管内で人工の脂質膜を用いてAtg9の機能を確認し、外層と内層の間で脂質を運ぶ働きを持つことを示した(図3)。さらに脂質が入る空洞を形成するアミノ酸が変化するように変異させると、酵母ではオートファゴソームができることも確かめた。「Atg2とAtg9が協力し、オートファゴソームを形成していたことがわかりました。全く予想していなかった仕組みに大変驚きました」と語る(図4)。

### 逆転の発想が転機 相分離で機能を発現

たんぱく質の構造から機能に迫ることを長年続けていた野田さんだったが、論文に掲載するために描いた模式図を見ていた時に、たんぱく質が天然変性領域を介して集まることで機能を発現するのではないかと気付いたという。「構造解析からたんぱく質の機能を明らかにし



ようとしていたので、その邪魔になる天然変性領域は長年無視していました。しかし逆転の発想で、たんぱく質が機能できる状態になるためには、邪魔だと思っていた領域こそが重要だと感じたのです」。調べてみると、2009年にドイツの研究グループが、細胞内で特定のたんぱく質が周囲とは異なる液相へと分離、濃縮する「液一液相分離」という概念を報告し、その後天然変性領域が液一液相分離に関わっていることが相次いで報告されていた。

過去の研究で、大隅博士も飢餓状態に置かれた酵母ではオートファゴソームができる前に、Atgたんぱく質が1力所に集まることを発見し、機能は不明ながら「プレオートファゴソーム構造体(PAS)」と名付けていた。野田さんは液一液相分離を経てできた液滴とPASが似ていることから、液一液相分離の概念でAtgたんぱく質を調べ直すこととした。

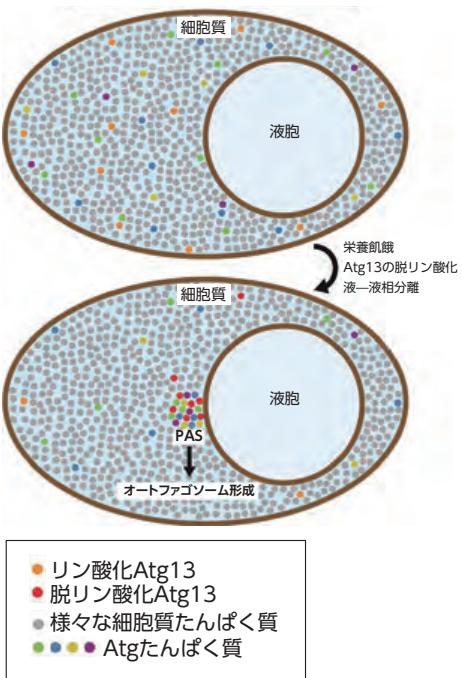


図5 液-液相分離によるPAS形成の模式図。栄養豊富な条件では、Atgたんぱく質は細胞質中に分散しており、細胞質を満たしているさまざまあまなんばく質と混ざり合っている。栄養飢餓になりAtg13が脱リン酸化されると、Atg13は他のAtgたんぱく質とともに液-液相分離して液胞膜上に新たな液相(液滴)を形成する。この液滴がPASの実体であり、液滴からオートファゴソームの形成が進行する。

## 会議で共同研究者との出会い 新たな解析手法を駆使し成果

野田さんはまず、Atgたんぱく質がどのような状態で働いているかを調べることにした。細胞質中の状態を見る場合には、構造解析ではなく顕微鏡を用いた観察が中心となる。蛍光顕微鏡を導入したものの、研究室内には顕微鏡の専門家はいなかった。試行錯誤の日々の後、なんとか基礎的なデータをそろえることに成功した。

栄養豊富な状態ではリン酸が結合して分散していたAtg13が、栄養飢餓にさらされると脱リン酸化し、液胞膜のすぐそばに集まって、周辺のたんぱく質をつなぎ止め、PASができる事を確認した(図5)。こうして形成されたPASが融合して球形になるなど、液体の性質を示すことがわかった(図6a)。しかしそれを証明するためにはより正確なダイナミクス情報を得る必要があり、野田さんは顕微鏡の専門家との共同研究を検討していた。

出会いの場となったのは、JSTが主催した、他の研究グループと交流できる

勉強会だった。「最先端のバイオイメージング技術を持つ東京大学大学院理学系研究科の岡田康志教授から、オートファジーに興味があると声を掛けていただきました。以来、共同研究が続いています」と語る。

岡田さんとの共同研究では、蛍光顕微鏡を使い、細胞質中でひも状構を持つAtg13の動きを調べた。その結果、Atg13はPAS内部にいるときも、細胞質にいるときと遜色のない運動性を持つこと、すなわちPASが液体の性質を持った液滴であることが証明された。

さらに詳しくPAS内のAtgたんぱく質を観察しようと、野田さんはCRESTの領域会議で面識を得た金沢大学ナノ生命化学研究所の安藤敏夫特任教授にも共同研究を依頼した。高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を開発したんぱく質の動態を直接観察する技術を持つ安藤さんの下に通っていたところ、またもや人の縁に恵まれたと語る野田さん。「運よく安藤研究室でポスドクをされていた能代大輔さんが次のポストを探していたので、私の研究室に来ていただきました。おかげで、研究室内で高速AFMによる観察が可能になりました。最新機器を使いこなせる人材は本当に重要です」と強調する。

試験管内でPASを再構成し顕微鏡で観察したところ、細胞内と同じように互いに融合する様子が観察された(図6a、b)。続いて再構成したPASを高速AFMで観察した結果、PASの内部でAtgたんぱく質は特徴的な構造を保持した状態でランダムに動く様子が見られた(図6c)。こうして野田さんは共同研究で最新の解析手法を駆使し、Atgたんぱく質が集まって液-液相分離してできた液滴がPASの正体であることを、液-液相分離がオートファジーを直接制御していることを明らかにした。

## 研究室内でも異分野融合 若手がもたらす新たな息吹

液-液相分離がオートファジーを直接制御するという野田さんの発見は、それまでは一部の分野に偏って研究されて

きた液-液相分離が、さまざまな生命現象に関わっていることを想起させる。「液-液相分離はとても興味深い現象です。これまでの知見を生かして、より高次な生命現象である睡眠やウイルス感染などの研究にも着手したいと考えています」と今後の展望を語る。液-液相分離という視点を加えることで、未知とされてきた現象の解明に期待が高まる。

研究室にいる人材の多様さも、野田さんの研究の広がりを支える重要な要素だ。新しいメンバーを迎える際には、なるべく専門分野が重ならないようにしてきたといい、まさに研究室内では日々、異分野融合で研究が進んでいる。「ここでは、誰もがその道の唯一の専門家です。新しいことを学ぶだけでなく、経験を生かせるので、やりがいを持って研究に打ち込んでいると思います。若手研究者には、ぜひ積極的に異分野に飛び込んでほしいですね」とエールを送る。

新たな分析手法や機器の導入で一気に研究が進むことも珍しくない。それぞれの専門分野で培った経験や知識を積んだ若手研究者が、研究室に新たな息吹をもたらし、大きな成果が生まれることもあるだろう。次世代のオートファジー研究者たちのボーダーレスな活躍にもぜひ期待したい。

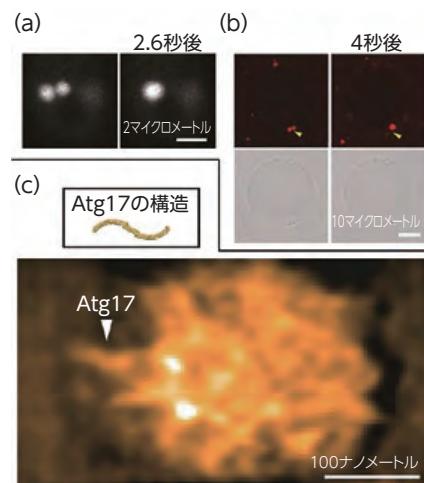


図6 蛍光顕微鏡および高速AFMで撮影した液滴(PAS)の画像。酵母細胞内でPAS同士が融合して球形になる様子(a)。Atg13に融合させた蛍光たんぱく質の蛍光で観察した。巨大リボソーム膜上でAtgたんぱく質液滴が融合する様子(b)。上の写真2枚はAtg13の蛍光像を、下の2枚は微分干渉像を示す。高速原子間力顕微鏡によるAtgたんぱく質液滴の観察結果(c)。液滴にはAtg13とともに液滴形成に働くS字型のAtg17がランダムな向きで存在している様子がわかる。画像はFFTバンドパスフィルター処理をしている。