

オートファゴソームの内膜分解を促進するメカニズムを哺乳類細胞で発見 — オートファジー分解機構の解明の糸口となるか? —

1. 発表者:

本田 郁子 (東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 助教)
坪山 幸太郎 (研究当時: 東京大学医学部医学科 学部6年生、
現所属: 東京大学大学院新領域創成科学研究科 博士課程1年生)
水島 昇 (東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 教授)

2. 発表のポイント:

- ◆オートファジー(注1)とは、細胞内成分を取り囲んだ二重膜構造体であるオートファゴソーム(注2)がリソソームと融合することで起こります。
- ◆本研究では、リソソームとの融合によってオートファゴソームの内膜が効率的に分解されるメカニズムを哺乳類細胞で明らかにしました。
- ◆本発見は、オートファゴソームの成熟機構(オートファジーの後期ステップ)の解明の糸口になることが期待されます。

3. 発表概要:

オートファジーは代表的な細胞質分解システムです。オートファジーが誘導されると、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体が細胞質の一部を取り囲みます。その後、オートファゴソームの外膜にリソソームが融合すると、オートファゴソームの内膜とともに内容物が分解されます。オートファジーの前期過程にあたるオートファゴソーム形成については詳しく調べられており、約20種類のオートファジー関連タンパク質群(ATGタンパク質群)が必要であることが酵母や哺乳類で知られています。一方、オートファゴソームの成熟、リソソームとの融合、オートファゴソームの内膜と内容物の分解といったオートファジーの後期過程についてはまだ多くのことがわかっていません。

今回、東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授らの研究グループは、オートファゴソームの内膜分解を可視化することに初めて成功しました。次に、ATG結合系と呼ばれる一連の修飾反応に関わるタンパク質群が、オートファゴソームの形成やオートファゴソームとリソソームの融合には必ずしも必須ではなく、その後におこるオートファゴソーム内膜の効率的分解に必要であることを明らかにしました。オートファゴソーム形態の解析から、ATG結合系はオートファゴソームの閉鎖に必要であることが示唆され、閉鎖による外膜と内膜の切り離しがオートファゴソーム内膜の効率的分解に必要であると考えられました。本発見は、オートファジーの分解機構の解明の大きな糸口になることが期待されます。

本研究は日本学術振興会 新学術領域研究「オートファジーの集学的研究」(領域代表: 水島昇)などの一環で行われました。

本研究は東京医科歯科大学医歯学研究支援センター 酒巻有里子氏、順天堂大学医学研究科神経機能構造学講座 小池正人教授との共同研究で行われました。

本研究成果は、2016年10月20日に国際科学誌「*Science*」でオンライン *First release* にて公開されました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

細胞内ではタンパク質などの生体成分の合成と分解が繰り返されることで、細胞の機能や健康が維持されています。この細胞内の分解を担うシステムの一つがオートファジーです。オートファジーが誘導されると、細胞内ではオートファゴソームと呼ばれる小胞構造が細胞質の一部を取り囲みます(図1)。オートファゴソームは内膜と外膜の二重の膜で囲まれた構造です。その後、リソソームと融合すると、オートファゴソームの内膜とともに内容物が分解されます(図1)。

酵母の研究を発端に、オートファゴソームの形成には約20種類のATGタンパク質群が関わっていることがわかっています。これらのほとんどは哺乳類細胞にも備わっており、詳細に研究が進んでいます。一方、オートファゴソームが成熟して内容物を分解する過程についての研究は、分子レベルではほとんど進んでいません。

(2) 研究の内容

本研究では、まず、哺乳類細胞でオートファゴソームに存在するタンパク質シタキシン17と、リソソーム標識色素ライソトラッカー(LysoTracker)の局在を同時に観察することで、オートファゴソームとリソソームの融合する過程を蛍光顕微鏡法で解析しました。野生型(正常)細胞では、オートファゴソームが完成すると数分後にリソソームが融合し、オートファゴソームの内膜と外膜の間が酸性化されました。さらにその約7分後にオートファゴソーム内部全体の酸性化が見られました。このことは、オートファゴソームの内膜が分解される瞬間の観察に初めて成功したことを示しています(図2A)。また、この結果は、リソソームが融合すると、約7分後にオートファゴソームの内膜が分解されることも示しています。

次に、この方法を利用して、オートファジーに必要であることが知られているATGタンパク質群の機能を調べました。まず、オートファジーの前半で機能するATGタンパク質群を欠損した細胞では、オートファゴソームが形成されないことが確認されました。しかし、予想外なことに、後半で機能する「ATG結合系(図3)」を欠損した細胞では、正常とほとんど区別できないオートファゴソームが形成され(形成効率は低下します)、さらにそれらはリソソームと融合することもわかりました。しかし、オートファゴソーム内膜の分解が顕著に遅延(60分以上)していました(図2B)。また、野生型細胞のオートファゴソームはほぼ球形であるのに対し、ATG結合系を欠損する細胞のオートファゴソームは楕円体であることから、ATG結合系はオートファゴソームの完成(閉鎖)に必要であることが示唆されました。これらの結果から、ATG結合系はオートファゴソームの完成(閉鎖)には必要であるものの、それ自体はリソソームとの融合に必須ではなく、むしろリソソーム融合後の内膜の効率的分解に重要であることが示唆されました。

(3) 社会的意義

オートファジーの疾患との関連については近年急速に研究が進んでいます。しかしながら、オートファジーの分子機構については未だ解明されていない点が多く、オートファジー関連疾患の特定や、オートファジーをターゲットとした治療戦略にとって障壁になっています。今回の研究でオートファゴソームの成熟過程をより詳しく検出する方法を見出したことと、分解過

程の制御因子を明らかにしたことによって、オートファジーの分解の後期過程の分子機構解明の大きな糸口になることが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名： *Science* (オンライン版 *First release* : 10月20日)

論文タイトル： The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane

著者： Kotaro Tsuboyama¹, Ikuko Koyama-Honda¹, Yuriko Sakamaki, Masato Koike, Hideaki Morishita, and Noboru Mizushima* (¹ equal contribution, *corresponding author)

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel : 03-5841-3440、Fax : 03-3815-1490

E-mail : nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel : 03-5841-3304、Fax : 03-5841-8585

E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

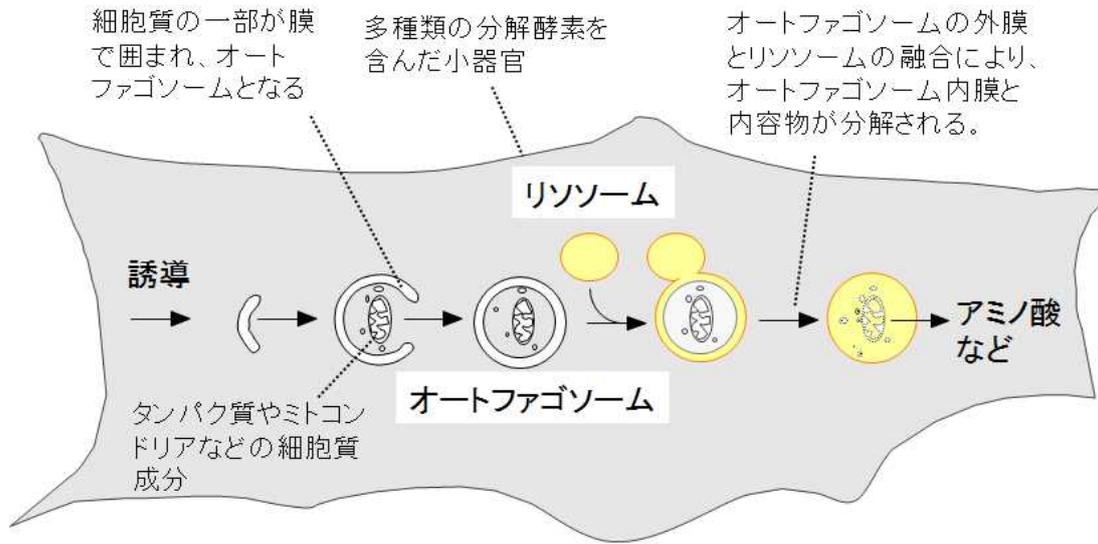
(注1) オートファジー

細胞に備わっている細胞質成分を分解するための仕組みの1つ。細胞質成分を膜で取り囲んでリソソーム(さまざまな分解酵素を含む細胞内小器官)に運び込み分解します(図1)。近年、オートファジーは飢餓適応や細胞内品質管理などのさまざまな役割を担うことが分かってきており、その破たんは神経変性疾患などに関連することが報告されており、創薬ターゲットとしても注目されています。

(注2) オートファゴソーム

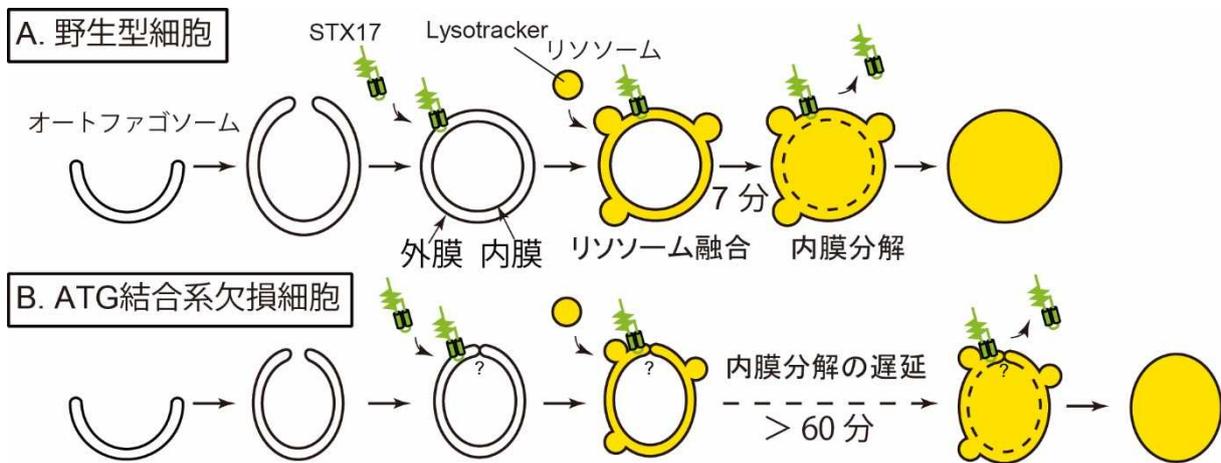
オートファジーが誘導されると形成される、二重の膜(内膜と外膜)からなる小胞(図1)。内部に細胞質成分(タンパク質やミトコンドリアなど)を包み込む。オートファゴソームが完成すると、外膜にリソソームが融合し、内膜とともに内容物が分解される。

8. 添付資料：

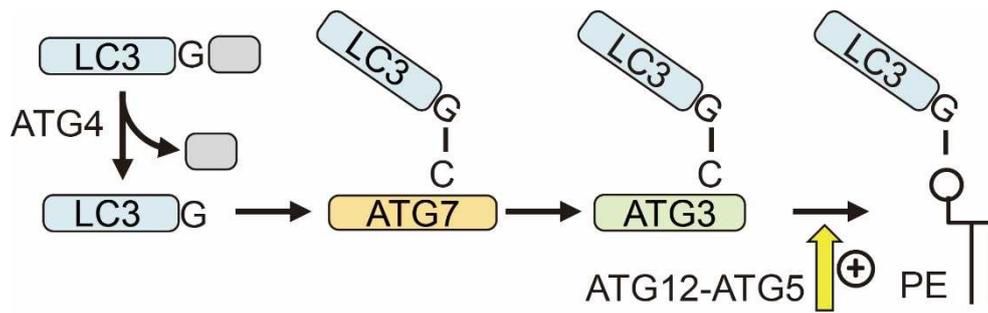


(図1) オートファジーのしくみ

オートファジーが誘導されると、内膜・外膜から成る二重膜のオートファゴソームが細胞質成分を取り囲みながら形成されます。続いてオートファゴソームはリソソームと融合し、オートファゴソームで囲んだ細胞質成分が分解されます。細胞質成分の分解により生じたアミノ酸などの分解産物は再利用されます。



(図2) ATG 結合系はオートファゴソーム内膜の分解に重要である
野生型（正常）細胞（A）ではオートファゴソームがリソソームと融合してからオートファゴソームの内膜が分解されるまで約7分かかります。一方、ATG 結合系欠損細胞（B）においては、それが60分以上かかることが明らかになりました。



(図3) ATG 結合系

オートファジーには、オートファジー関連タンパク質のひとつである LC3 (酵母では Atg8) がリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) と共有結合する系と、ATG12 が ATG5 と共有結合する系が必要です。LC3 (Atg8) は合成直後に C 末端のグリシン (G) が ATG4 の作用によって露出し、それが 2 つの酵素 (ATG7 と ATG3) の働きと、ATG12-ATG5 結合体の働きによって PE と結合します。酵母では、中心的 Atg 因子群の約半分にあたる 7 つが ATG 結合系に関係します。