

オートファゴソーム形成の膜変形ダイナミクスの数理モデル

1. 発表者：

境 祐二（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）
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）のオートファゴソーム（注2）形成過程における隔離膜の形態変化を定量的に説明できる数理モデル（注3）を構築しました。
- ◆膜面積の増加とともに曲率因子（注4）の分布が変化することが隔離膜の連続的な形態変化を可能にし、曲率因子量がオートファゴソームのサイズを制御している可能性を示しました。
- ◆本研究はオートファジーの膜動態の制御機構について数理モデルによる解析が有効であることを示しており、今後さらにオートファジーの制御機構について統合的な理解が進むことが予想されます。

3. 発表概要：

オートファジーにおいて、オートファゴソーム形成は膜の大規模な形態変化を伴う現象です。その変化は極めてユニークで、隔離膜といわれる扁平なディスク状の小胞が、成長とともにカップ状に弯曲し、最後にカップの口が閉じて球状のオートファゴソームが形成されます（図1）。多くのオートファジー関連因子はこのオートファゴソーム形成過程に関与しており、隔離膜の形態変化はこれらの因子により制御されていると考えられます。しかし、どのような物理機構により隔離膜の形態変化が制御されているのかは謎のままでした。

東京大学大学院医学系研究科の境祐二助教、水島昇教授らの研究グループは、曲率因子による隔離膜の形態制御の数理モデルを構築し、オートファゴソーム形成における隔離膜の形態変化を解析しました。その結果、隔離膜成長とともに曲率因子の膜上分布が自発的に変化することで、隔離膜の一連の形態変化を理解できることを示しました。この数理モデルは、実際に細胞内で観測されるオートファゴソーム形成時の隔離膜変形を定量的に説明します。さらに、オートファゴソームの大きさは曲率因子量によって制御されていることを予測します。本研究成果は、一見複雑に見えるオートファジーの膜動態が、単純な物理機構に基づく数理モデルによる解析が有効であることを示唆しています。今後、膜動態の計測とそれに基づく数理解析とを組み合わせることで、オートファジー動態の制御機構について統合的な理解が進むことが予想されます。

本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト」（研究総括：水島昇）および科学研究費助成事業 若手研究「数理手法を用いたオートファジー・ダイナミクスの解明」（代表：境祐二）として行われました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

細胞内には、ディスクやチューブ、球など様々な固有の形態を持った膜状の小器官があります。これら小器官の形態は、たんに質や脂質組成によって制御されています。小器官の形態異常はその器官の機能不全に直結するため、小器官の形態を制御する機構を理解することは生

理学的にも重要です。細胞内の主要な分解系であるオートファジーでは、オートファゴソーム形成において特徴的な膜変形ダイナミクスが見られます。扁平なディスク状の小胞である隔離膜が成長とともにカップ状に弯曲し、最後にカップの口が閉じ球状のオートファゴソームが形成されることで細胞質成分が包み込まれます（図1）。今までオートファジー研究は、分子生物学や遺伝学からのアプローチが行われてきましたが、これらの特徴的な形態変化の根底にある制御機構は、いまだほとんど解明されていませんでした。

（2）研究内容

本研究では、数理モデルによるアプローチを通してオートファゴソーム形成過程における隔離膜の形態変化の制御機構を解析しました（図2）。膜の形態は、膜の曲率に関する弾性曲率エネルギー（注5）として数理モデル化できます。隔離膜は膜間が数十ナノメートルの扁平な小胞で、そのリム部分は高度に弯曲しており、大きな曲率エネルギーを持ちます。このような扁平な小胞は、膜面積が増えるとリム部分も増えるため曲率エネルギーが増加します。そのため、ある面積以上では全体を弯曲し閉じた球状になることで、リム部分を小さくし曲率エネルギーを減少させます。しかし、この形態変化モデルを膜間30ナノメートルの隔離膜に適用すると、できる球状構造体は直径80ナノメートル以下になってしまい、実際に観察される直径1ミクロンのオートファゴソームを説明できません（図3A）。さらに、このモデルでは中間的なカップ状構造はエネルギー的に不安定であるため、オートファゴソーム形成過程で数分間見られるカップ状の隔離膜を説明できません（図3A）。

これらの不一致を解決し、オートファゴソーム形成の全過程における連続的な膜の形態変化ダイナミクスを理解するために、本研究では曲率因子による隔離膜の形態制御の数理モデルを構築しました（図2）。曲率因子としては、膜に部分的に挿入される両親媒性たんぱく質や、くさび形の膜たんぱく質などが考えられ、高曲率な膜領域に局在し安定化させます。実際、多くのオートファジー関連たんぱく質は曲率因子となりえます。このモデルにおいて、隔離膜の形態は、膜の曲率エネルギーと曲率因子の混合エントロピー（注6）エネルギーの両方からなる全体エネルギーによって決定されます。この形態変化モデルを用いて膜の形態変化ダイナミクスを解析した結果、膜面積の増加とともに、膜の安定な形態としてディスク、カップ、球状と連続的に変化し、オートファゴソーム形成時に現れる隔離膜の形態変化と一致することを示しました（図3B）。これは、膜面積の増加とともに曲率因子の分布が変化することで、中間状態のカップ状態を安定化し隔離膜の連続的な形態変化が可能になったためです。

次に、数理モデルの解析結果と細胞内で観察される隔離膜の形態変化を比較しました。オートファジー関連たんぱく質であるLC3B（オートファゴソーム全体に存在）とATG2A（リムに存在）を蛍光標識し、隔離膜の動態を生細胞ライブイメージング観察しました（図4A）。このイメージングデータから各時刻における隔離膜の膜面積と曲がり度を定量化し、数理モデルによる解析結果と比較した結果、数理モデルは生細胞イメージングから得られた隔離膜の形態変化を定量的に予測可能であることを示しました（図4B）。さらに、数理モデルによる解析から、ディスクからカップへの形態変化するときの膜面積 A_d とカップから球へ形態変化するときの膜面積 A_s は曲率因子量に比例し、この2つの膜面積が正の線形関係を持つことが予測されます。生細胞イメージングで膜面積 A_d 、 A_s を定量化した結果、2つの膜面積は正の線形関係を持ち、数理モデルの予測と一致することを示しました（図4C）。数理モデルの結果は、曲率因子の量とオートファゴソームの大きさとの間に正の相関があることを予測しており、実験的に曲率因子を同定するのに有効であると考えられます。

(3) 社会的意義

近年、オートファジーとヒト疾患の関わりが注目されています。分子生物学や遺伝学による研究を通してオートファジーの分子基盤は理解されてきてきましたが、その根底にある制御機構はいまだほとんど解明されていませんでした。本研究を通して、一見複雑に見えるオートファジーの膜動態が、単純な物理機構に基づく数理モデルを用いて解析可能であるとともに、その制御機構についてより深い理解が可能であることが示されました。今後、膜動態の詳細な計測とそれに基づく数理解析とを組み合わせることで、オートファジー動態の制御機構について統合的な理解が進むことが予想されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*iScience*」（英国時間 9 月 3 日：オンライン版）

論文タイトル：Modeling morphological change during autophagosome formation

著者：Yuji Sakai*, Ikuko Koyama-Honda, Masashi Tachikawa, Roland L. Knorr, and Noboru Mizushima* (*corresponding author)

DOI 番号：10.1016/j.isci.2020.101466

6. 問い合わせ先：

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 境 祐二（さかい ゆうじ）

Tel：03-5841-3440、Fax：03-3815-1490

E-mail：yuji-sakai@m.u-tokyo.ac.jp

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

7. 用語解説：

（注1）オートファジー

細胞の主要な分解機能の一つ。オートファゴソームが細胞質基質やミトコンドリアなどの細胞小器官を取り囲み、リソソームと融合することで内容物を分解する仕組み（図1）。その生理的機能としては、飢餓への適応や細胞内の恒常性維持などが知られており、近年では特に神経変性疾患などとの関連が注目されている。数多くのオートファジー関連たんぱく質群がオートファゴソームの形成に関わっていることが明らかにされてきた。

（注2）オートファゴソーム

オートファジー分解を仲介する細胞小器官で、細胞質に存在するたんぱく質やミトコンドリアなどを包み込む（図1）。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素によって内容物が消化される。

（注3）数理モデル

変化する複雑な現象の一面を簡略化した形で表現し、数式を用いて現象を捉え論理的に記述すること。

（注4）曲率因子

膜の曲率を制御する因子。両親媒性たんぱく質やくさび形の **BAR** たんぱく質、脂質の非対称性組成などが考えられ、膜状の細胞内小器官の形態はこれら曲率因子によって制御され、膜輸送や免疫応答など様々な生理機能と関連している。

（注5）弾性曲率エネルギー

膜の曲げに対する弾性エネルギーで、膜の形態はこの弾性曲率エネルギーを最小化する状態として決定される。曲率因子は膜に自発曲率を生成しその弾性曲率エネルギーを変えることで、曲がった膜の形態を安定化させる。

（注6）混合エントロピー

熱力学、統計力学における物質の混合度合いをあらわす状態量。異なる種類の分子を混ぜると、混合エントロピーが増大し、均一に混じり合った状態なる。

8. 添付資料：

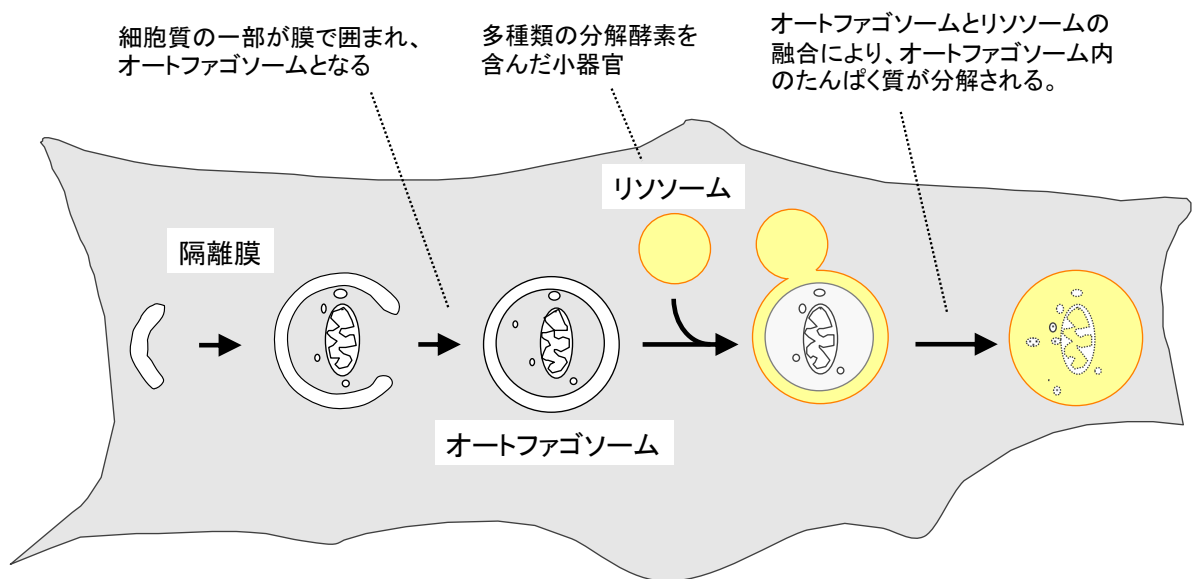


図1：オートファジーの仕組み

オートファジーが誘導されると、隔離膜が細胞質成分を取り囲みながらオートファゴソームが形成される。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る。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る。

$$\boxed{\text{隔離膜の形態変化}} = \boxed{\text{膜の弾性曲率}} + \boxed{\text{曲率因子の分布}}$$

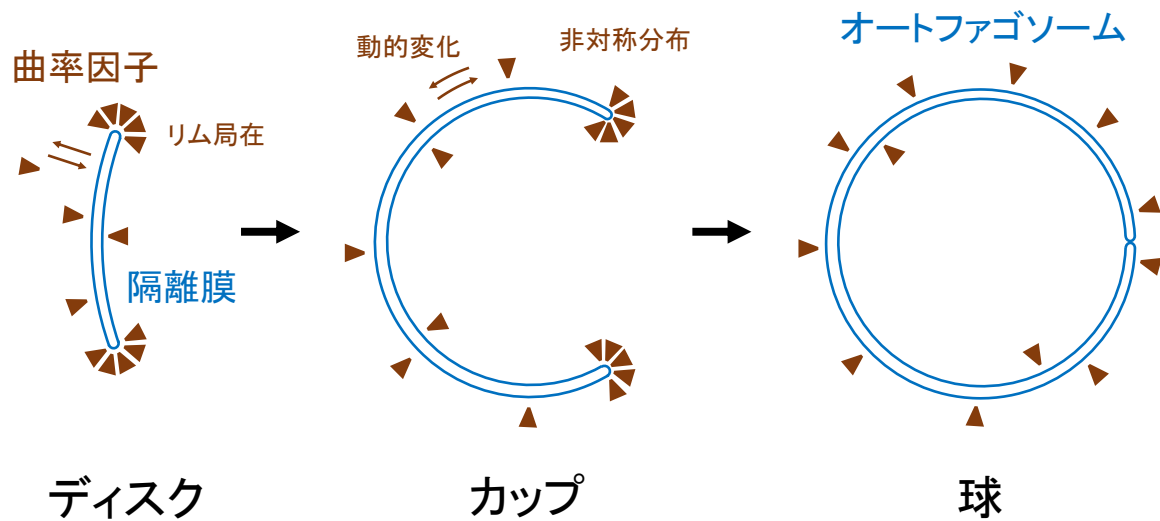


図 2：曲率因子による隔離膜形態変化の数理モデル

曲率因子は、高曲率なリム領域に局在することで膜の弾性曲率エネルギーを下げ、リム領域を安定化させる。一方で、曲率因子の局在は混合エントロピーエネルギーを増大させる。膜の弾性曲率と曲率因子の分布の結果として、安定な膜の形態が決定される。隔離膜の膜面積増加とともに曲率因子の分布が変化し、ディスク、カップ、球の連続的な形態変化が実現される。

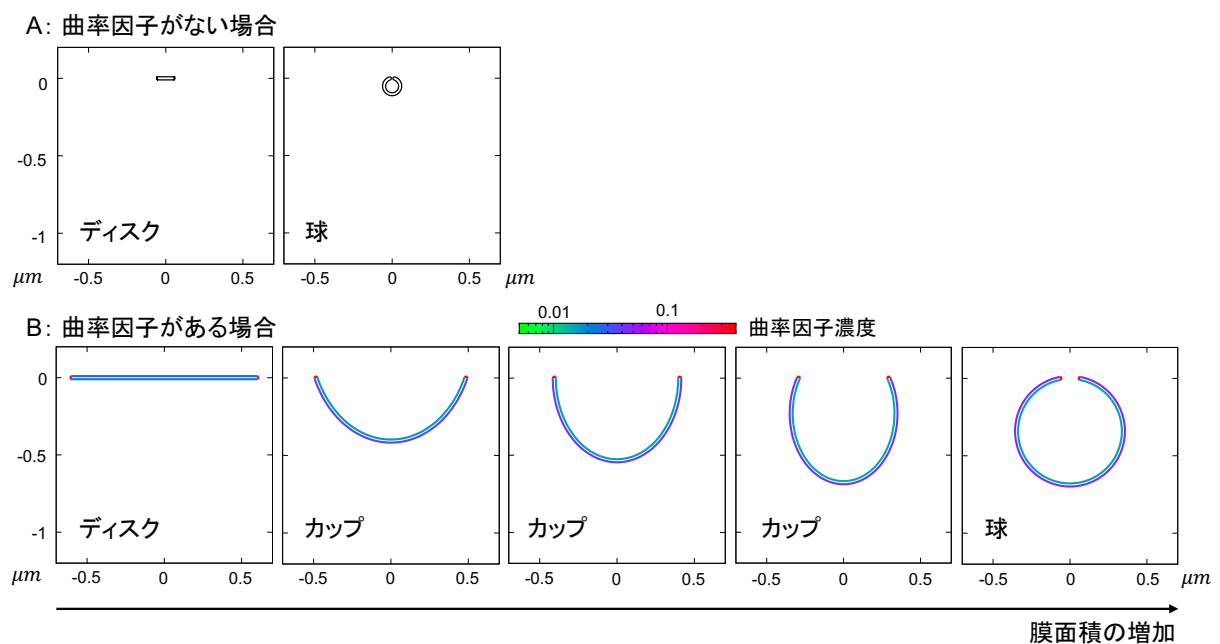


図 3：膜形態変化の数理モデル解析結果

A：曲率因子がない場合、高曲率なリム領域を安定化できず、小さい膜面積でディスクから球への形態変化が起こる。中間状態のカップは現れない。B：曲率因子がある場合、高曲率な

リム領域を安定化されるので、大きい膜面積までディスクが安定し、ある膜面積でカップへ形態変化する。さらに膜面積が増えると、カップから球へ連続的に形態変化していく。曲率因子はディスクではリム領域に局在し、カップでは正の曲率をもつ外膜に分布することでカップ状態を安定化する。

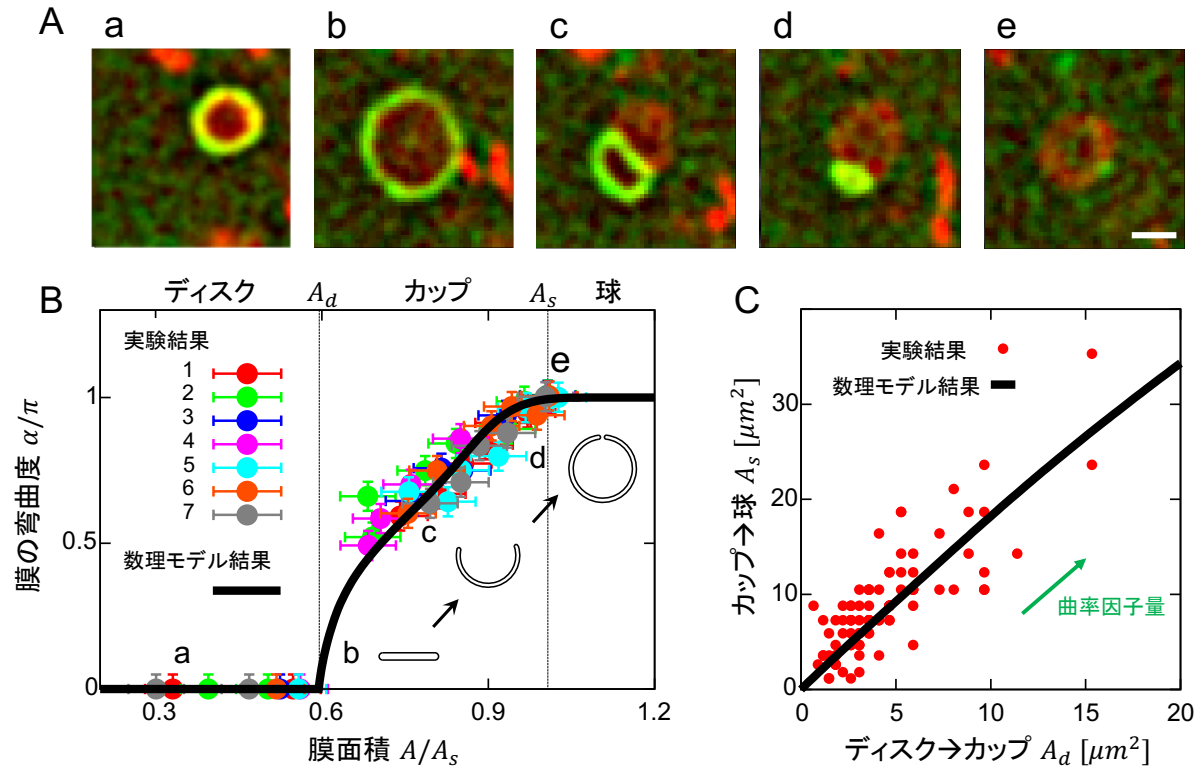


図4：細胞内観察結果と数理モデル解析結果との比較

A：mRuby3-LC3（赤）、GFP-ATG2A（緑）を発現させた野生型マウス線維芽細胞（MEF）の生細胞イメージング観察像。B：生細胞観察で得られた隔離膜の形態変化と数理モデルの比較。各点は正細胞イメージングから個々のオートファゴソーム形成における隔離膜の膜面積と湾曲度を定量化した値を示している（a-eはAの画像a-eに対応）。数理モデルは、この生細胞イメージングから得られた隔離膜の形態変化を定量的に予測する。C：ディスクからカップ（ A_d ）、カップから球へ形態変化するときの膜面積（ A_s ）の関係。赤点は生細胞観察結果。黒線は数理モデル結果で右上に行くほど曲率因子量が多い。