

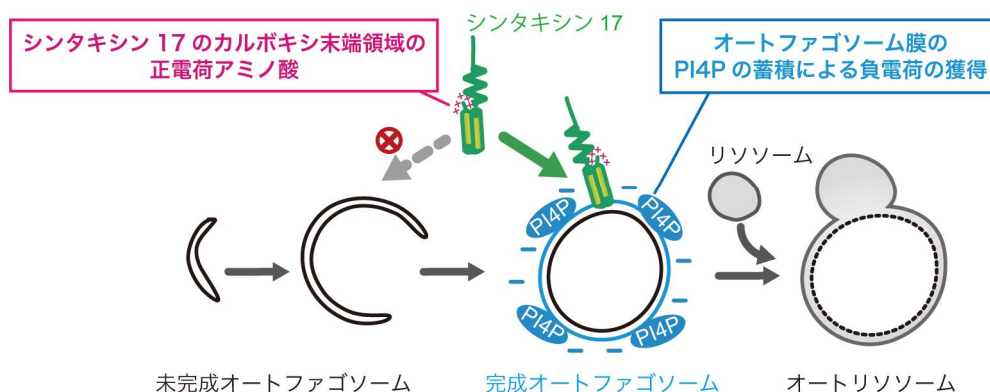
東京大学

オートファゴソーム完成の目印は電荷の変化 ——オートファゴソーム膜の静電的成熟機構の発見——

発表のポイント

- ◆オートファゴソームが完成すると、分解酵素を含んだリソソームと融合できるようになりますが、どのようにして未完成（未閉鎖）オートファゴソームと完成（閉鎖）オートファゴソームが見分けられているかは不明でした。
- ◆完成したオートファゴソームの膜はより強い負電荷を帯びており、それによってリソソームとの融合に必要な因子（シンタキシン 17）が呼び寄せられることを分子生物学的実験手法とシミュレーションを組み合わせることで明らかにしました。
- ◆細胞小器官の性質が膜の電荷変化によって時空間的に制御されるという今回の発見は、オートファゴソーム以外の細胞内構造体にも拡張される概念となることが期待されます。

オートファゴソーム膜の静電的成熟機構



完成したオートファゴソーム膜はより強い負電荷を帯びる

概要

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、オートファジー（注 1）を実行するオルガネラであるオートファゴソーム（注 2）と分解酵素を含んだリソソームとの融合の仕組みの一端を明らかにしました。リソソームは完成（閉鎖）したオートファゴソームと融合します。リソソームとの融合に必要な因子であるシンタキシン 17（注 3）は、閉鎖したオートファゴソームにだけ呼び寄せられることがすでに知られています。しかし、シンタキシン 17 がどのようにして未完成（未閉鎖）オートファゴソームと完成オートファゴソームを見分けられているかは不明でした。今回、シンタキシン 17 はカルボキシ末端領域に正電荷アミノ酸を多数持ち、この正電荷アミノ酸がシンタキシン 17 のオートファゴソームへの局在に必要であること、シンタキシン 17 は負電荷脂質膜を嗜好することを見出しました。そこで、実際にオートファゴソーム膜が負電荷を持っているかどうかを調べたところ、オートファゴソームの形成後期に膜が強い負電荷を帯びることがわかりました。さらに、この負電荷は負電荷脂質であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P)（注 4）の蓄積によることが示唆されました。また、シンタキシン 17 のオートファゴソーム膜への局在がオートファゴソーム膜上の PI4P の量によ

って制御されうることを試験管内実験と分子動力学シミュレーション（注 5）によって明らかにしました。以上の結果から、細胞はオートファゴソームの完成をその膜の電荷変化によって認識していることが示唆されました。本研究結果は、細胞小器官の膜電荷の経時変化がその機能を変化させるという概念を提唱するものであり、この概念はその他の細胞内構造体についても当てはまる可能性が期待されます。本研究成果は、6 月 4 日に国際科学誌「eLife」に最終版（Version of Record）として掲載されました。

発表内容

〈研究の背景〉

細胞内分解機構の一つであるオートファジーは、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体が細胞質成分を取り囲んで隔離した後、リソソームと融合することでその内容物が分解されます（図 1）。

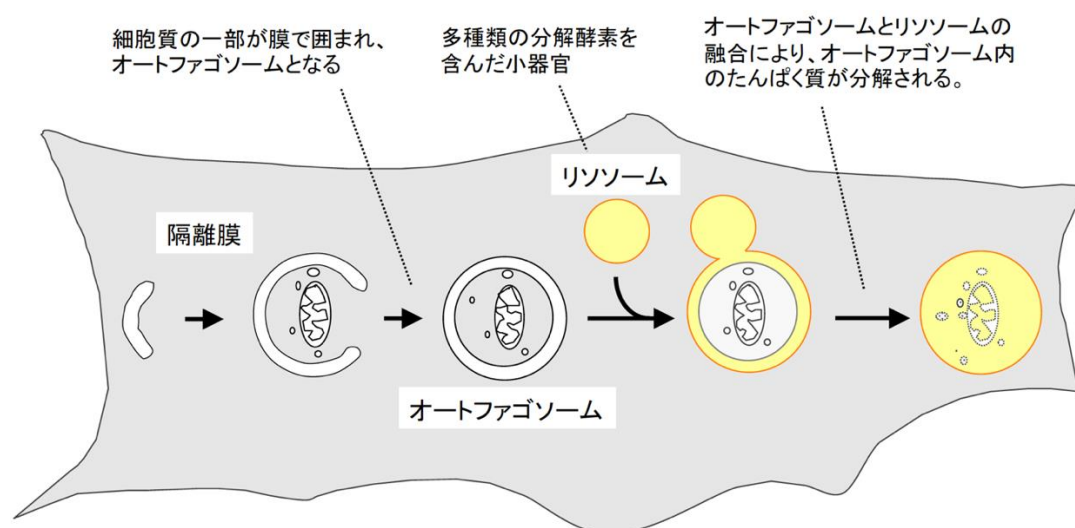


図 1：オートファジーの仕組み

オートファジーが誘導されると、扁平な小胞（隔離膜と呼ばれる）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。

オートファゴソーム形成の分子機構が明らかになる一方で、なぜリソソームは完成したオートファゴソームとのみ融合し、未完成のオートファゴソームとは融合しないのかについては長年不明のままでした。これまでにオートファゴソームが完成するタイミングで、膜融合因子であるシンタキシン 17 が局在することが示されていますが、完成オートファゴソームにのみシンタキシン 17 が局在するための制御メカニズムについては理解が不十分でした。

〈研究の内容〉

本研究では、シンタキシン 17 の性質からヒントを得て、オートファゴソーム膜の電荷変化に着目し、時空間的に制御されたシンタキシン 17 の膜への局在化機構を分子生物学的実験と分子動力学シミュレーションを組み合わせで解析を行いました。

まず、シンタキシン 17 のオートファゴソームへの局在がどのように制御されているかを明らかにするために、シンタキシン 17 のさまざまな部分欠失変異体を用いた解析を行いました。

その結果、シンタキシシン 17 はカルボキシ末端領域に正電荷アミノ酸を多数持ち、この正電荷アミノ酸がオートファゴソームへの局在に必要であることを見出しました。またリポソームを用いた試験管内実験から、シンタキシシン 17 は負電荷脂質膜を好む性質があることを見出しました。

そこで、生細胞イメージング解析によって完成前後のオートファゴソーム膜の電荷を調べると、未完成のオートファゴソームに比べて、完成したオートファゴソームはより強い負電荷を帯びていることがわかりました（図 2）。

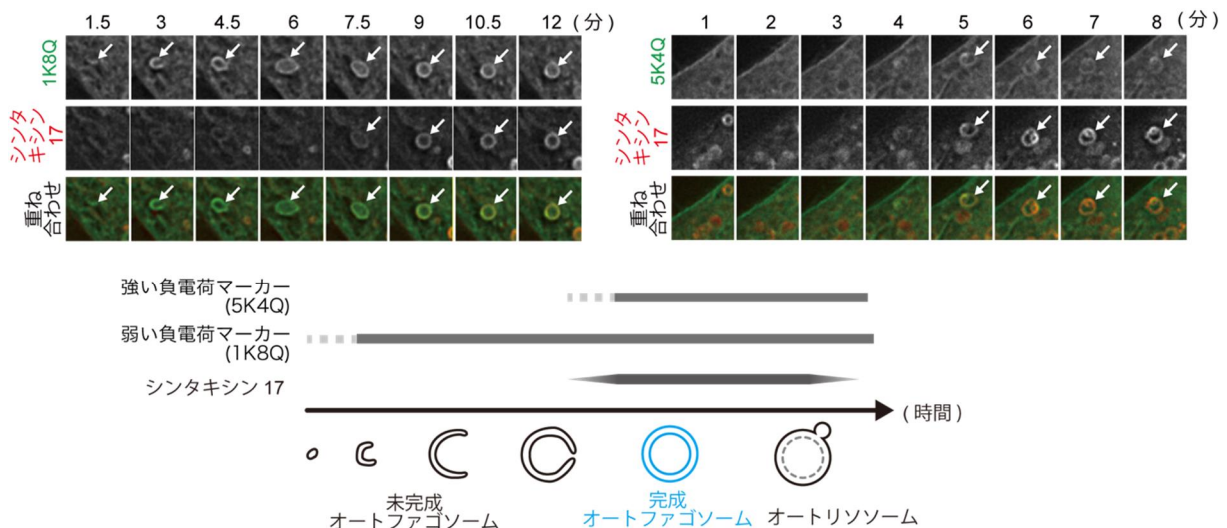


図 2：完成オートファゴソームは強い負電荷を帯びる

オートファゴソーム膜の電荷の生細胞イメージング解析。未完成のオートファゴソームは弱い負電荷を帯びているが(1K8Qのみ陽性)、シンタキシシン 17 陽性の完成したオートファゴソームは強い負電荷を帯びている(1K8Q, 5K4Qともに陽性)。

さらに、この急速な負電荷増強が脂質組成の変化による可能性を考え、脂質結合タンパク質プローブを用いてオートファゴソーム膜に存在する脂質を調べたところ、オートファゴソームが完成するタイミングで負電荷脂質であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) が膜に濃縮していることがわかりました。オートファゴソーム膜にもともと存在するホスファチジルイノシトールがリン酸化されることで、より強い負電荷を帯びるようになると考えられます。また、シンタキシシン 17 のオートファゴソーム膜への局在はオートファゴソーム膜上の PI4P の量によって制御されうること試験管内実験と分子動力学シミュレーションにより明らかにしました（図 3）。

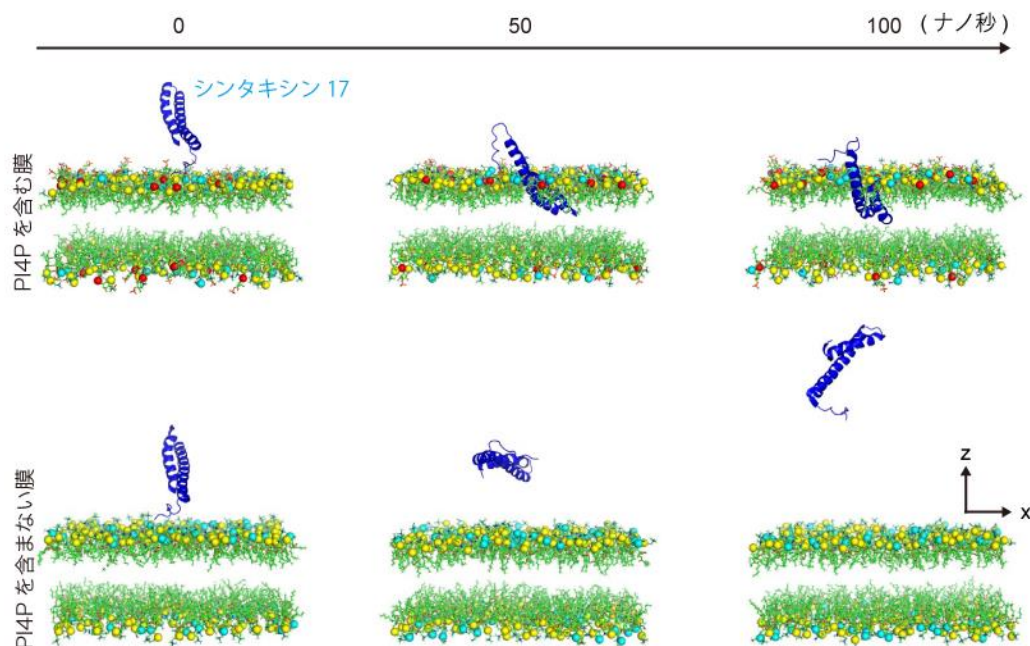


図 3：分子動力学シミュレーションによるシンタキシン 17 膜挿入の解析

PI4P を含む膜ではシンタキシン 17 は膜に挿入されるが（図上），PI4P を含まない膜ではシンタキシン 17 は挿入されない（図下）。

以上の結果から、オートファゴソームは成熟時に膜をより負に帯電させ、静電的相互作用を介してシンタキシン 17 を呼び込むことによって、適切なタイミングでリソソームと融合していることが示唆されました（図 4）。

オートファゴソーム膜の静電的成熟機構

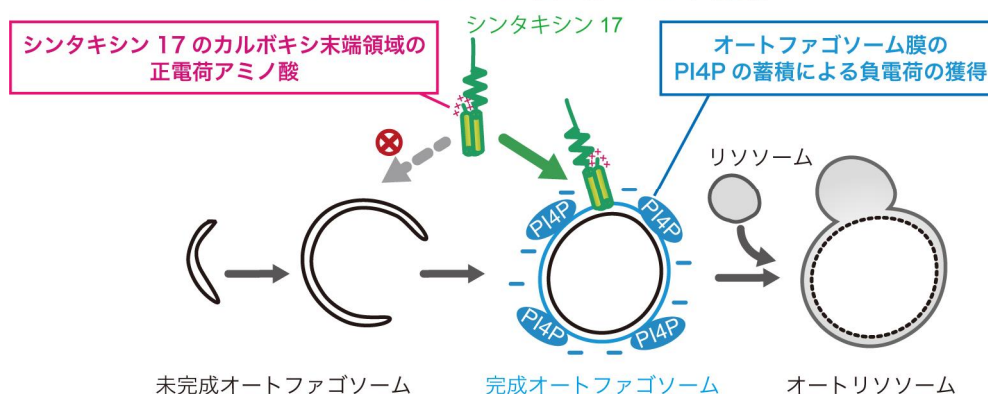


図 4：完成したオートファゴソーム膜はより強い負電荷を帯びる

完成オートファゴソームは PI4P の蓄積によってより負電荷を帯びる。リソソームとの融合に必要なタンパク質シンタキシン 17 のカルボキシ末端領域の正電荷アミノ酸とオートファゴソーム膜の負電荷の静電的な相互作用により、シンタキシン 17 が局在化できるようになり、リソソームとの融合がおこる。

〈今後の展望〉

オートファジーの分子機構の中でも形成後期過程に起こる膜動態については、これまで解析があまり進んでいませんでした。本研究を通して、オートファゴソームが完成するためには、タンパク質の関与だけではなく膜自身の性質変化にも着目する必要があることが明らかとなり

ました。一方で、オートファゴソーム上の PI4P の産生メカニズムや、オートファゴソームの負電荷成熟機構が他の生物でも保存されているかどうかについては今後のさらなる解析が必要です。この膜性質変化を担う責任因子の同定によって、オートファゴソームの成熟過程の全容解明につながることを期待されます。

発表者・研究者等情報

東京大学 大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻

水島 昇 教授

篠田 沙緒里 博士課程大学院生/日本学術振興会特別研究員：研究当時

現：京都産業大学 生命科学部 研究員

境 祐二 助教：研究当時

現：横浜市立大学 特任准教授

植松 真章 学部生：研究当時

現：コーネル大学 ポストドクトラルフェロー

小山-本田 郁子 准教授

坂巻 純一 特任助教：研究当時

現：順天堂大学 医学部 准教授

山本 林 講師：研究当時

現：日本医科大学 先端医学研究所 大学院教授

日本医科大学 先端医学研究所

松井 貴英 講師

論文情報

雑誌名：eLife

題 名：Syntaxin 17 recruitment to mature autophagosomes is temporally regulated by PI4P accumulation

著者名：Saori Shinoda, Yuji Sakai, Takahide Matsui, Masaaki Uematsu, Ikuko Koyama-Honda, Jun-ichi Sakamaki, Hayashi Yamamoto, Noboru Mizushima*

DOI：10.7554/eLife.92189

URL：<https://doi.org/10.7554/eLife.92189>

研究助成

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（課題番号：JPMJER1702）」（研究総括：水島昇）、科学研究費助成事業 特別推進研究「膜構造の分解を基軸とした細胞内分解の研究（課題番号：22H04919）」（代表：水島昇）、学術変革領域研究（A）クロススケール新生物学「クロススケール細胞内分子構造動態解析が解明する選択的オートファジー始動メカニズム（課題番号：21H05256）」（代表：山本林）、基盤研究 C「オートファジー膜ダイナミクスの理論的解明（課題番号：23K05715）」（代表：境祐二）の支援により実施されました。

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内小器官を取り囲み、リソソームと融合することで内容物を分解する仕組み。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。

(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二重膜の細胞小器官。オートファゴソーム前駆体である二重膜が細胞質成分を取り囲みながら伸長し、膜が閉鎖することで内容物を隔離したオートファゴソームとなる。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) 膜融合タンパク質シンタキシン 17

膜融合を担う SNARE タンパク質のひとつ。オートファゴソームに局在し、オートファゴソームとリソソームの融合を仲介する。

(注4) ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P)

細胞内の膜を構成するリン脂質の一つ。主にオルガネラの一つであるゴルジ体膜に多量に存在する負電荷を帯びたリン脂質。

(注5) 分子動力学シミュレーション

経験的なポテンシャルに基づき、古典力学のニュートン方程式をコンピュータで数値的に解くことで、原子や分子、タンパク質の物理的な動きをシミュレートする手法。

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院医学系研究科

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel : 03-5841-3440 E-mail : nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp