

論文の内容の要旨

論文題目 Dynamics of Atg proteins during autophagosome formation based on morphological phenotype analysis

(形態表現型解析に基づいたオートファゴソーム形成における

Atg タンパク質のダイナミクス)

氏名 河岡 辰弥

【序論】

オートファジーは酵母からヒトまで高度に保存された細胞内成分の自己分解経路であるが、その分子機構には未だ不明な点が多く残されている。出芽酵母においてオートファジーが誘導されると液胞近傍にオートファジー関連 (Atg) タンパク質と呼ばれるタンパク質群が集積体を形成する。そして Atg タンパク質の集積体を起点に隔離膜 (IM) と呼ばれる膜構造体が伸展し、分解対象を包み込みながらオートファゴソーム (AP) という二重膜のオルガネラを形成する (Suzuki et al., 2001)。これら一連の構造体はオートファジー関連構造体 (ARS) と呼ばれる。IM 形成には 19 の Atg タンパク質が必須であることが知られている。先行研究で IM における各 Atg タンパク質の局在解析が行われ、IM は液胞および小胞体との相互作用部位を形成していることが明らかとなった (Suzuki et al., 2013; 図 1)。これらのことから AP 形成においてオルガネラ間相互作用が重要な役割を担っていると考えられている。本研究では、①詳細な形態表現型解析によりオートファジー変異株間の表現型の違いを明らかにすること、②形態表現型解析により AP 形成における Atg タンパク質のダイナミクスを明らかとすることを目的とし、AP 形成機構の解明を目指した。

【結果と考察】

1. ARS の形態解析による Atg1 の機能解析

詳細な ARS の形態解析を可能とするため、画像処理と機械学習を組み合わせることにより高速に ARS の形態を解析し、ドット状構造と伸展構造とに分離するシステム、Qautas

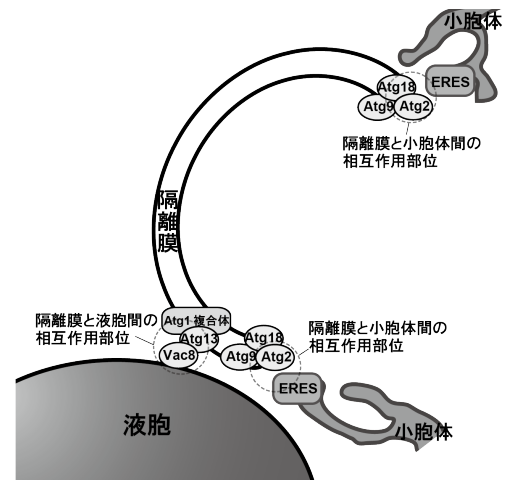


図 1. IM 伸展とオルガネラ間相互作用

隔離膜は伸展時に液胞および小胞体と相互作用領域を形成する。液胞との相互作用領域には Atg17, Atg29 を含む足場複合体、小胞体との相互作用領域には Atg2, Atg9 といった膜結合複合体が局在する。

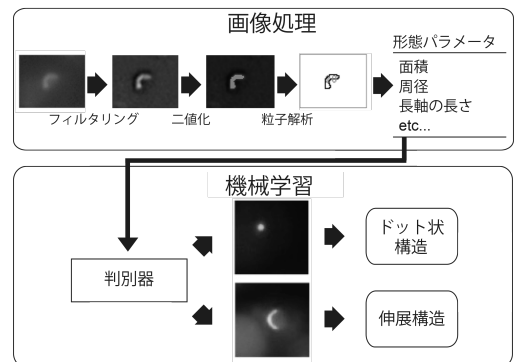


図 2. 形態解析システムの概要。画像解析により顕微鏡画像から構造体の形態パラメータを抽出し、機械学習によりドット状構造、伸展構造に分類する。伸展構造の形態を比較することで高速な形態解析ができる。

(Quantitative autophagy-related structure analysis system) の開発を行った (図 2)。Qautas の開発により、マーカータンパク質である Atg8 によって蛍光標識された ARS を客観的かつ網羅的に解析することが可能となった (Kawaoka et al., 2017)。Atg1 は Atg タンパク質唯一のプロテインキナーゼであると同時に Atg タンパク質が集積する際の足場複合体を形成する機能を持つ。*atg1* 欠損株と *atg1* のキナーゼ欠損株である *atg1*^{D211A} 株において形成される ARS の表現型の違いを明らかにするため形態解析を行った。出現した伸展構造について階層化クラスタリングを用いて構造体の分類を行うと、*atg1*^{D211A} 株ではクラスター1に属する小さな棒状構造が野生株以上に蓄積することが明らかとなった (図 3)。クラスター1に属する構造体の蓄積は *atg1Δ* 株では起こらなかった。このことから形態表現型解析から足場形成能の有無を分離可能であることが明らかとなった。

また、クラスター5,6に属するカップ状の膜構造は野生株でのみ出現し、*atg1*^{D211A} 株では形成されないことから Atg1 のキナーゼ活性はカップ状の膜構造形成に必須であることが示唆された。必須 Atg タンパク質である Atg2 は ARS と ER との相互作用領域に局在し、繫留因子として機能することが知られている (Kotani et al., 2018)。Atg1 のキナーゼ活性は他の Atg タンパク質の局在に影響を与えることが知られている (Papinski et al., 2014) ことから、Atg2 の局在解析を行った。その結果 *atg1*^{D211A} 株では、Atg2 の ARS への局在が消失することが明らかとなった。*in vitro* において Atg2 は膜脂質の輸送に関わることが知られており (Osawa et al., 2018)、Atg2 は ARS への膜輸送に関わっていると考えられている。これらのことから、Atg1 は足場複合体を形成した後にキナーゼ活性依存的に Atg2 の局在を制御し、ER との相互作用領域の形成を介して ARS への脂質流入を制御していることが考えられる。

2. AP 形成過程における各 Atg タンパク質の局在解析

IM が可視化され、IM 上での各 Atg タンパク質の局在が明らかとなったことで Atg タンパク質の機能の理解が大きく進んだ。一方で、この可視化系では完成した AP を解析することが不可能であった。当研究室の先行研究により、W303 株の二倍体株を使用することで AP まで含めた全ての ARS が解析可能であることが知られている (Ri, Master thesis, 2018)。AP 形成の一連の過程における各 Atg タンパク質の局在解析を行うことで、Atg タンパク質の機能を理解する上で重要な知見を得られると期待できる。そこで、W303 二倍体株において ARS のマーカーである Atg8 を赤色蛍光タンパク質で標識し、Atg1, Atg2, Atg5, Atg11, Atg17, Atg29 を緑色蛍光タンパク質で標識した二重標識株を作製し局在観察を行った。Atg8 の形

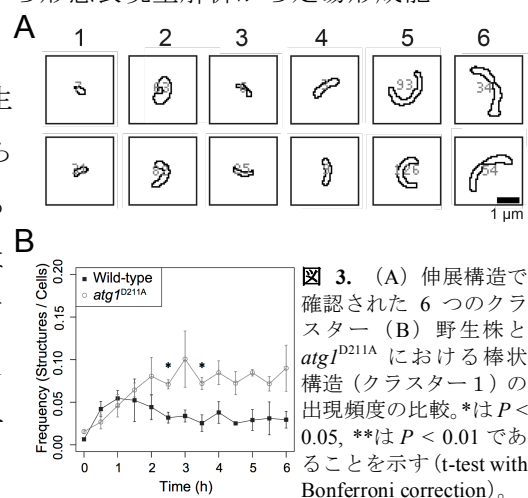


図 3. (A) 伸展構造で確認された 6 つのクラスター (B) 野生株と *atg1*^{D211A} における棒状構造 (クラスター1) の出現頻度の比較。*は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ であることを示す (t-test with Bonferroni correction)。

態を基準に完成した AP を判別するため、混合ガウスモデル (GMM) を使用して客観的なクラスタリングを行った。その結果、全ての ARS は 7 つのクラスターに分離されることが明らかになった (図 4A)。クラスター 5, 6 に属する円盤状の構造体は AP 形成不能な *atg1Δ*

株では形成されないことから、以後 AP と呼ぶ。先行研究により ARS は液胞との相互作用領域を有しており、そこには足場複合体が局在することが知られている (Suzuki et al., 2013)。Atg8 の局在を観察すると、AP 全体に局在すると同時に AP と液胞との接触面に輝点を有していることが明らかとなった (図 4)。この輝点を基準として各 Atg タンパク質の局在を観察すると、足場複合体に属する Atg11, Atg17, Atg29 は輝点にのみ局在していた (図 4B)。このことから、Atg8 で標識される輝点は液胞と AP の相互作用領域であり、この輝点を観察することで足場複合体の挙動を観察できることが示唆された。AP 全体に局在する Atg1 を Atg8 との共局在のポジティブコントロール、AP 完成時に脱離することが知られている Atg5 をネガティブコントロールとし、Atg8 で標識された AP と各 Atg タンパク質との共局在率を解析した。その結果、液胞との相互作用領域に局在する Atg11, Atg17, Atg29 は Atg5 と同様に共局在率が低いことが明らかとなった (図 4C)。このことから、足場複合体は Atg5 と同様に AP から脱局在することが示唆された。Atg8 を標識しタイムラプス撮影を行った結果、AP 形成の最終段階で足場複合体が AP から脱離の様子が観察された。これらのことから足場複合体は Atg5 と同様のタイミングで脱離すると考えられる。

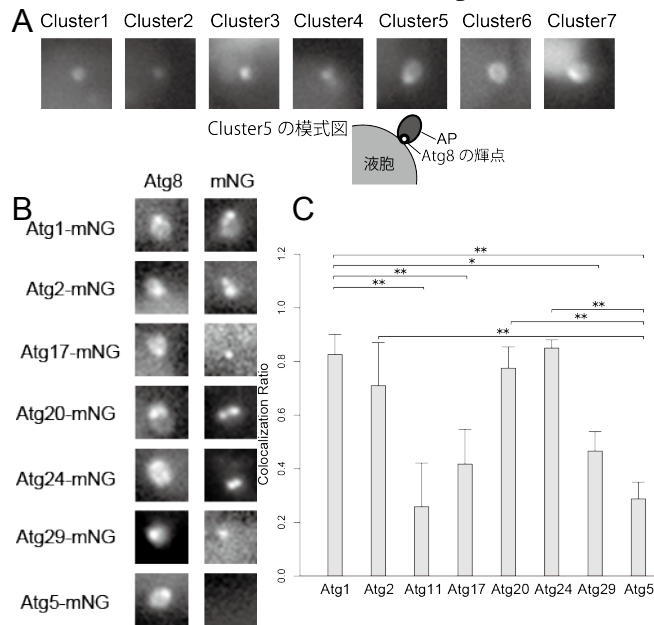


図 4. (A) GMM クラスタリングによるクラスタリング結果および液胞との位置関係のモデル図 (B) 完成した AP における各 Atg タンパク質の局在 (C) AP における各 Atg タンパク質の共局在率。*は $P < 0.05$, **は $P < 0.01$ であることを示す (Tukey-Kramer test)。mNG: mNeonGreen

3. AP 形成における ARS の経時的な形態変化

続いて、緑色蛍光タンパク質で Atg8 を蛍光標識し、AP の経時的な形態解析を行った。その結果、AP が出現した後に、高い真円度を保ちながら面積が拡大していることが明らかとなった (図 5A, B)。この結果は AP が形成された後に膨張する段階が存在することを示唆している。従来の AP 形成のモデルでは、カップ状の膜構造である IM が伸展し、閉じ込んだ際に AP が完成すると考えられていた。しかし、本研

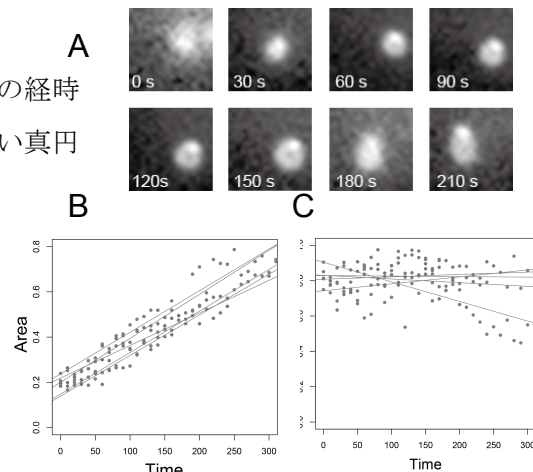


図 5. (A) mNG-Atg8 のタイムラプス像。(B) ARS の面積の経時変化。(C) ARS の真円度の経時変化。

究により AP が新生された後に膨張するという新たなモデルが提示された (図 6)。本研究により、AP 形成の後期段階には AP の膨張と AP と液胞との相互作用の消失が起こることが示唆された。今後は、AP の膨張と AP と液胞との相互作用の消失のタイミングを解析することを考えている。

【結論】

本研究により、高速に ARS の詳細な形態解

析を行うシステムが開発された。このシステムを用いた解析により、Atg1 の足場形成能の有無を形態表現型から分離可能であることが明らかとなった。また、Atg1 のキナーゼ活性が Atg2 の局在化を制御していることが観察された。Atg1 のキナーゼ活性は Atg2 の局在制御を介して ARS への脂質流入に関わっているのではないかと考えている。

W303 二倍体株を使用した Atg タンパク質の共局在解析により、Atg8 を観察することで AP 本体と足場複合体の挙動を観察できることが明らかとなり、AP 形成の後期段階において AP は足場複合体から脱離することが明らかとなった。

タイムラプスによる観察から、真円度の高い AP が形成された後に面積が拡大していることを見出した。従来 IM 伸展が終わると直ちに AP が完成するモデルが考えられていたが、本研究により、AP は形成された後に膨張することが示唆された。このモデルは AP 形成機構に新たな視点から光を当てるものである。このモデルを検証するため、細胞質基質の流入孔の可視化に注目した解析を進めている。また、細胞質基質の流入を直接可視化することにより、AP 膨張モデルの確からしさを検証することを考えている。

【研究業績】

1. Hirata E, Shirai K, Kawaoka T, Kodama F, Suzuki K. Atg15 in *Saccharomyces cerevisiae* consists of two functionally distinct domains. J. Biol. Chem. (under revision)
2. Osawa T, Kawaoka T, Kotani T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Noda NN. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. Nat. Struct. Mol. Biol.. 2019, 26, 281–288
3. Kawaoka T, Ohnuki S, Ohya Y, Suzuki K. Morphometric analysis of autophagy-related structures in *Saccharomyces cerevisiae*. Autophagy. 2017 Oct 5:0. doi: 10.1080/15548627.2017.1384888.
4. 河岡辰弥, 鈴木邦律, オルガネラ間相互作用を介したオートファゴソームの形成機構, 細胞 The CELL, Vol. 51 No.9 Oct. 2019. p35-38.
5. 河岡辰弥, 鈴木邦律, オルガネラ相互作用から見たオートファジー, BIO Clinica オートファジーと疾患 Vol. 33 No. 7 Jul. 2018. p56-62.

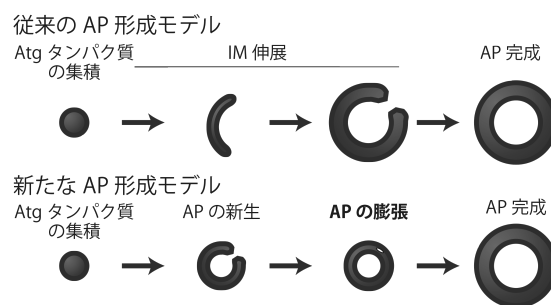


図 6. 本研究により示唆された新たな AP 形成モデル。AP が新生した後に膨張する。