

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類 ATG9 小胞のリクルート機構の解明

氏名 濱 祐太郎

オートファジーとは、細胞質を取り囲むオートファゴソームを介する細胞内の主要な分解系である。細胞質成分を取り囲んだ二重膜構造体オートファゴソームが形成され、それがリソソームと融合する。リソソームに由来する分解酵素群によってその内容物を分解する。

オートファジーは、オートファゴソームが特定の基質を認識することで、選択的分解も行う（選択的オートファジー）。哺乳類の代表的な選択的オートファジーの選択的基質は、細胞内で品質が低下し分解対象と見なされたポリユビキチン化タンパク質である。ポリユビキチンを認識するオートファジーアダプターは、SQSTM1/p62、NBR1、OPTN、NDP52 および TAX1BP1 の 5 種類である。これらはいずれもユビキチン認識ドメインを持ち、オートファゴソーム膜上のタンパク質とも結合するため、ポリユビキチン化タンパク質をオートファゴソームへと選択的に取り込ませることができる。選択的オートファジーは、品質低下したタンパク質を分解することで、細胞内の品質管理に寄与すると考えられている。選択的オートファジーに対し、細胞質を非選択的に分解することを非選択的オートファジーと呼ぶ。細胞質成分を非選択的に分解し、分解産物を細胞に供給するほか、細胞質成分を一定速度で分解し続けることで、細胞内品質低下を防ぐ役割があると考えられている。

オートファゴソームの形成は、出芽酵母と哺乳類の間で保存された ATG タンパク質群が担っている。ATG タンパク質群は複合体や機能単位を形成し、それぞれの役割を持つ。セリンスレオニンキナーゼである哺乳類 ULK1,2 や、そのホモログ出芽酵母 Atg1 を含む ULK/Atg1 複合体は、飢餓などの刺激に応じて細胞内で集積することで、オートファゴソーム形成の足場となる機能単位である。ATG9 小胞は、脂質供給を受けてオートファゴソームへと成熟すると考えられ、オートファゴソームの膜成分の起源となる機能単位である。

ATG タンパク質の構成する機能単位は、オートファゴソーム形成場へ集積し、協調してオートファゴソームの形成を行う。Atg9 小胞は、出芽酵母では Atg1 複合体に依存して 2 つの経路でリクルートされる。一つめの経路は、非選択的オートファジーに関連し、Atg1 複合体構成因子 Atg13 に依存する。二つめの経路は、選択的オートファジーに関連し、Atg1 複合体構成因子 Atg11 に依存する。Atg13 と Atg11 はそれぞれ Atg9 タンパク質と相互作用する。その一方で、哺乳類の ATG9 小胞は ULK 複合体には依存せずに集積する。ULK 複合体構成因子を欠損した細胞では、選択的オートファジーの基質であるポリユビキチン化タンパク質およびそれを認識するオートファジーアダプターが分解されず蓄積し、凝集体を形成する。このユビキチン陽性凝集体には、ATG9 小胞も蓄積している。この構

造体の存在する場合は、選択的基質と ATG9 小胞の両方が蓄積することからオートファゴソーム形成に関連すると考えられる。しかし、ATG9 小胞の蓄積を引き起こす仕組みは未解明である。本研究は、オートファゴソーム形成場への ATG9 小胞リクルート機構を解明することを目的とした。

本研究では、出芽酵母の仕組みに着想を得て、哺乳類でも選択的、非選択的オートファジーに関連した 2 つの ATG9 小胞リクルート経路があるという仮説を立てた。この仮説に基づき、非選択的オートファジーに関連したリクルートには ULK 複合体が、選択的オートファジーに関連したリクルートにはユビキチン陽性凝集体（高次構造体）構成要素が関与していると考えた。

まず、選択的オートファジーに関連した ATG9 小胞リクルート機構について調べた。野生型細胞において、ユビキチンおよび SQSTM1 が共局在する輝点が観察された。この輝点は、野生型細胞における選択的基質であるユビキチン陽性高次構造体と考えられる。このユビキチン陽性高次構造体には、ATG9A も共局在し、選択的基質に ATG9 小胞がリクルートされることが示唆された。FIP200-KO 細胞では、ユビキチン陽性高次構造体は顕著に肥大化し 1-2 μm の大きな構造体となり、この大きな構造体に ATG9A が明瞭に共局在した。この観察結果は、過去の報告にある ATG9 小胞様構造体を含むユビキチン陽性凝集体と一致している。ポリユビキチンを認識するオートファジーアダプター SQSTM1、NBR1、OPTN、NDP52 および TAX1BP1 をすべて欠損した Penta-KO 細胞では、ATG9A とユビキチンの共局在は認められなかった。Penta-KO 細胞を親株として樹立した Penta-KO FIP200-KO 細胞では、ユビキチンは 1-2 μm 程度の大きな高輝度の輝点を形成したが、ここには ATG9A はリクルートされなかった。これらの結果より、ATG9 小胞がユビキチン陽性高次構造体へリクルートされ、そのリクルートは FIP200-KO に非依存的であり、オートファジーアダプターに依存していることが示唆された。

次に、Penta-KO で欠損している 5 種類のオートファジーアダプターのうち、どれが ATG9 小胞リクルートに関与しているかを調べた。Penta-KO FIP200-KO 細胞にそれぞれのアダプターを一つずつ発現させると、オートファジーアダプターは輝点を形成した。そのうち、NBR1、OPTN および TAX1BP1 の輝点へ ATG9A は明瞭にリクルートされた。一方で、SQSTM1 および NDP52 の輝点には ATG9A はリクルートされなかった。この結果から、選択的オートファジーアダプターの中でも、NBR1、OPTN および TAX1BP1 が FIP200 に依存せず ATG9 小胞をリクルートすることが明らかとなった。

ATG9 小胞をリクルートする 3 種類のアダプターのうち、TAX1BP1 に着目して詳細に解析した。ATG9 小胞リクルートに重要な TAX1BP1 の分子内領域を特定するため、TAX1BP1 の各ドメインの欠損変異体を作製し評価した。その結果、TAX1BP1 への ATG9 小胞リクルートには TAX1BP1 の形成する高次構造体の凝集性が重要であり、分子内領域としては CC1 領域が重要であることが示唆された。

TAX1BP1 CC1 領域による ATG9 小胞リクルート機構を更に解析するため、CC1 領域の

構造を予測し、それに基づいて変異体を設計・作製し ATG9 小胞リクルートを評価した。その結果、TAX1BP1 CC1 は折れ曲がりを含まない 150 アミノ酸ほどの長い単一のヘリックスであり、その表面にある正と負の電荷が ATG9 小胞リクルートに重要と考えられた。

TAX1BP1 依存的な ATG9 小胞リクルートには、TAX1BP1 CC1 と ATG9 小胞上のタンパク質の相互作用が想定された。そこで、TAX1BP1 CC1 の電荷依存的相互作用タンパク質を LC-MS/MS によって網羅的に探索した。その結果、電荷変異型 TAX1BP1 CC1 に比べ野生型 TAX1BP1 CC1 に 3 倍程度濃縮されていた唯一のタンパク質として、SCAMP3 を同定した。SCAMP3 は過去の ATG9 小胞のプロテオームでも同定されていることから ATG9 小胞に局在すると考えられ、FIP200-KO 細胞におけるユビキチン陽性凝集体にも ATG9A と共に明瞭にリクルートされた。さらに、FIP200-KO SCAMP3-KO 細胞を樹立して ATG9A の局在を調べると、ユビキチン陽性凝集体への ATG9 のリクルートが低下していた。以上の結果より、ATG9 小胞上の SCAMP3 が TAX1BP1 や他のアダプターと相互作用することで、ATG9 小胞が選択的基質近傍へリクルートされると考えられる。

続いて、非選択的オートファジーに関連した ATG9 小胞リクルートを解析した。出芽酵母では Atg13 HORMA ドメインが重要であり、哺乳類 ATG13 も HORMA ドメインを有する。このことから、哺乳類でも ATG13 が ATG9 リクルートに重要であると考えた。それを調べるため、選択的オートファジーに関連した ATG9 小胞リクルートが起こらない Penta-KO 細胞を親株として、Penta-KO ATG13-KO 細胞を作製し解析した。その結果、ATG13 HORMA ドメイン欠損変異体では ATG9 小胞リクルートが起こらなかった。また、ATG13 HORMA ドメインを発現させて免疫沈降すると、ATG9A が共沈降した。これらの結果から、非選択的オートファジーに関連した ATG9 小胞リクルートは、ATG13 HORMA と ATG9A の相互作用を介していることが示唆された。

本研究では、出芽酵母の知見に着想を得た解析によって、哺乳類でも選択的、非選択的オートファジーのそれぞれで異なる 2 つの経路で ATG9 小胞がリクルートされることが示唆された。選択的オートファジーに関連する経路は、出芽酵母では Atg9 と Atg11 の相互作用が重要であるが、哺乳類では ATG9 小胞上の SCAMP3 とオートファジーアダプターの相互作用が重要と考えられた。これらの選択的オートファジーに関連した ATG9 小胞リクルートは、選択的基質近傍で ATG 機能単位群の集積と反応の場が形成されやすいため、選択的オートファジーを始動する上で重要と考えられる。

出芽酵母と哺乳類のそれぞれの ATG9 小胞リクルートの仕組みに、どのような意義があるのかは今後の課題である。出芽酵母においては、Atg11 が Atg9 小胞をリクルートできるため、Atg11 が選択的基質近傍に集積するだけで効率よくオートファゴソーム形成を開始できると考えられる。一方の哺乳類では、FIP200 と ATG9 小胞の両方が、それぞれ独立に選択的基質へとリクルートされるため、選択的オートファジーの始動が厳密な調節を受けている可能性がある。哺乳類においては、選択的基質高次構造体に含まれるアダプターの種類や凝集性などを慎重に判別しているのかもしれない。

非選択的オートファジーに関連するリクルート経路は、出芽酵母も哺乳類も ATG13 の HORMA ドメインに依存している。しかし、HORMA ドメインの立体構造は両者の間で大きく異なっている。出芽酵母 Atg13 HORMA ドメインは、キャップ構造とヒンジループを持ち、これらを介して Atg9 と相互作用する。一方、哺乳類の ATG13 HORMA ドメインにはヒンジループはなく、出芽酵母とは異なる相互作用様式であると考えられる。更に、哺乳類と同様の ATG13 HORMA を持つ生物種は進化的に広く分布すると考えられており、真核生物の広範な生物種に存在する ATG9 小胞リクルート機構である可能性がある。

本研究によって、これまでは出芽酵母でのみ知られていた 2 つの Atg9 小胞リクルート経路が、哺乳類にまで一般化されたと言える。今後、このような生物種間の差異を真核生物全体の生物種について広く整理し、一般化をしていくことで、真核生物共通祖先におけるオートファジーの分子機構、ひいてはオートファジーの起源を考察することが可能となると考えられる。