

平成 26 年 2 月 5 日

オートファジー膜の脂質分布をナノレベルで解明

オートファジーは自食作用とも呼ばれ、細胞が不要な細胞質のタンパク質やオルガネラをリソソームに運んで分解し、新たなタンパク質の材料としてリサイクルする仕組みです。近年、オートファジーは細胞質成分の品質管理に必須のシステムとして注目され、この仕組みの破綻が神経変性疾患、癌などの疾病に関連する可能性についても盛んに研究が進められています。オートファジーが起こるにはホスファチジルイノシトール3 磷酸 (PI3P) という膜脂質が必須であることが知られていましたが、PI3P がオートファジー膜にどのように局在しているかについては確かなことが分かっていませんでした。

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）・分子細胞学分野の藤本豊士（ふじもととよし）教授の研究グループは、東京工業大学の大隅良典（おおすみよしのり）特任教授の研究グループとの共同研究により、PI3P がオートファジーの際に形成されるオートファゴソームと呼ばれる膜の両面に非対称性に存在し、しかも哺乳類細胞と酵母細胞では PI3P の分布が大きく異なることを見出しました。オートファジーを起こす分子メカニズムの多くは、哺乳類細胞と酵母細胞で共通であると考えられていますが、上記の結果は両者のオートファゴソーム膜形成過程に基本的な違いがあることを示しています。なお今回の発見は、研究グループが開発した急速凍結・凍結切断レプリカ標識法という新たな電子顕微鏡技術によって得られたものです。

細胞の中で、オートファゴソーム膜がどのようにして作られるのかについては、不明な点が多く残されており、今回の結果はその謎を解明する上で重要な手がかりになると考えられます。

本研究成果は、英国科学誌「ネイチャー・コミュニケーションズ (Nature Communications)」(英国時間 2014 年 2 月 4 日付の電子版) に掲載されました。

【ポイント】

- オートファジーに必須の膜脂質であるホスファチジルイノシトール 3 磷酸 (PI3P) の細胞内分布をナノレベルで決定する新たな方法を開発した
- その方法を用いた解析により、酵母細胞のオートファゴソーム膜では PI3P の分布は『(オートファゴソームの 2 枚の膜に挟まれた) 閉鎖空間側 > 細胞質側』という非対称性を示すのに対し、哺乳類細胞のオートファゴソーム膜では PI3P は真逆の非対称性を呈し、細胞質側に限局していることが明らかになった
- 酵母細胞で見られる PI3P の非対称性は、もともと両側に対称的に存在していた PI3P のうち細胞質側の PI3P だけが分解されることによって生じると考えられた
- 哺乳類細胞と酵母細胞のオートファゴソーム膜形成の過程には基本的な違いがあると考えられる

【概要】

オートファジーには膜脂質である PI3P の産生が必須であることが知られているが、PI3P がどのようにオートファジー膜の形成に関わるかについてはよくわかっていない。今回、膜脂質の分布をナノレベルで可視化することができる新しい電子顕微鏡技術（急速凍結・凍結切断レプリカ標識法）を用いることにより、酵母細胞のオートファゴソームでは PI3P が膜の細胞質側よりも閉鎖空間側（2 枚のオートファゴソーム膜の間にある閉鎖空間に面した側）により多く存在することを見出した。一方、哺乳類細胞では PI3P はオートファゴソーム膜の細胞質側に限局しており、酵母細胞とは対照的な分布を示した。

細胞質にある 2 つの脱リン酸酵素（PI3P を分解する活性を持つ酵素）を欠損させた酵母細胞ではオートファゴソームの PI3P は細胞質側、閉鎖空間側に対称性に分布するようになり、野生型の酵母細胞で見られる非対称性は細胞質側 PI3P が分解されたことによって生じたものと考えられた。

今回明らかになった PI3P 分布の結果は、哺乳類細胞と酵母細胞のオートファゴソーム膜形成過程に基本的な違いがあることを示唆する。

【研究の背景】

オートファジー（自食作用）は細胞が不要となったタンパク質や壊れたタンパク質を分解し、新たなタンパク質の材料としてリサイクルする仕組みである。近年、オートファジーは細胞成分の品質管理に必須のシステムとして注目され、この仕組みの破綻が神経変性疾患、癌などの疾病に関連する可能性についても多くの研究が進められている。

オートファジーでは、細胞内に隔離膜という袋状の構造が出現し、細胞質の一部を取り囲んでオートファゴソームとなる。オートファジーの分子機構の多くはAtg蛋白質などの解析によって理解が進んでいるが、オートファジー膜（隔離膜、オートファゴソーム膜など）がどのようにして形成されるのかは大きな謎として残されてきた。

オートファジーの成立には膜脂質であるPI3Pの産生が必須であることが知られていたため、PI3Pの細胞内局在を解析することにより、オートファジー膜形成の謎に迫れるのではないかと考えた。従来の方法では膜脂質の詳細な観察ができないため、電子顕微鏡を用いる新たな方法を開発して、解析を行った。

【結果の要約】

- 1) 膜脂質である PI3P の細胞内局在をナノレベルで決定する新たな顕微鏡法を確立した。具体的には細胞を急速凍結したあと、凍結切断レプリカを作製し、PI3P に特異的に結合するプローブを結合させて、電子顕微鏡観察した。
- 2) オートファジーを誘導した酵母細胞では、PI3P がオートファジー膜の閉鎖空間側（2枚のオートファゴソーム膜の間にある閉じた閉鎖空間に面した側）に非常に高密度に存在し、同じ膜の細胞質に面した側には僅かしか見られないことを見出した。
- 3) 一方、オートファジーを誘導した哺乳類細胞では、PI3P はオートファジー膜の細胞質側に限局して存在し、閉鎖空間側には見られなかった。
- 4) 酵母細胞の細胞質にある2つの脱リン酸酵素（PI3Pを分解する活性を持つ酵素）を欠損させると、オートファゴソームのPI3Pは細胞質側、閉鎖空間側に対称性に見られるようになった。

【今後の展開】

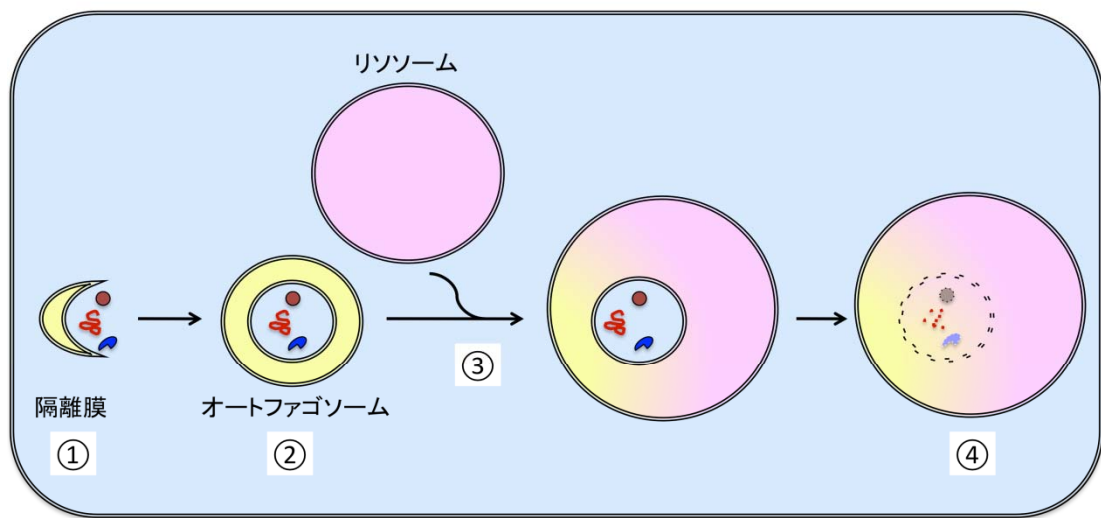
PI3Pを産生する酵素（PI3キナーゼ）は酵母細胞、哺乳類細胞ともに細胞質にだけ存在すると考えられている。哺乳類細胞の結果はこのようなPI3キナーゼの作用で生じたものと理解できるが、PI3キナーゼが存在しないはずの閉鎖空間に面した側にPI3Pが存在するという酵母細胞の分布が生じるためには、何らかの別のメカニズムが必要である。今後、そのメカニズムを追究することにより、オートファジー

膜が形成される機構の解明が進むと考えられる。

【論文名等】

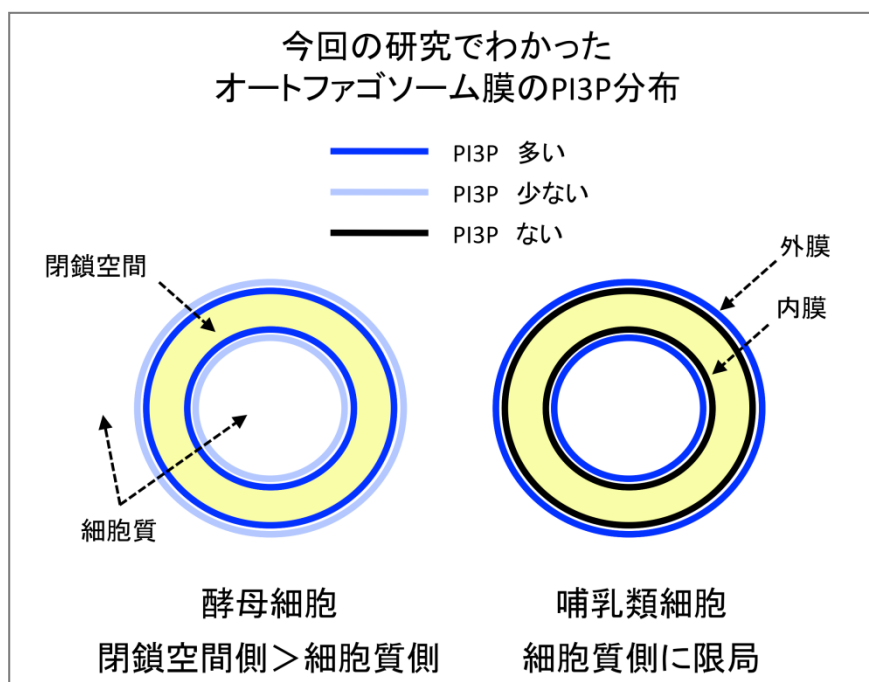
Cheng J, Fujita A, Yamamoto H, Tatematsu T, Kakuta S, Obara K, Ohsumi Y, Fujimoto T. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. Nature Communications, doi. 10.1038/ncomms4207 (2014 年 2 月 4 日付電子版掲載).

(酵母細胞と哺乳類細胞のオートファゴソームはホスファチジルイノシトール 3 燐酸に関して全く異なる非対称性を呈する)



オートファジーが進むプロセス

- ① 細胞内に隔離膜(1枚の膜でできた小胞)が出現する。
- ② 隔離膜が伸長して細胞質の一部を取り囲み、オートファゴソーム(2枚の膜でできた小胞)を形成する。
- ③ オートファゴソームがリソソームと融合する。
- ④ オートファゴソームの中身がリソソームの消化酵素で分解される



English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical_en/res/ResearchTopics/pi3p_20140205en.pdf