

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 0395

氏 名 鈴木 翔

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: コーネル大学 (国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

コートタンパク質を必要としない輸送小胞形成機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 9 月 2 日 ~ 令和 元年 9 月 1 日

4. 受入機関名及び部局名

Cornell University, Scott D. Emr

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

A. Atg9 の輸送経路の解析

オートファジーは真核生物が普遍的に備えるタンパク質分解機構である。オートファジーは、二重膜構造体オートファゴソームの新生を伴うダイナミックな膜動態から成り立つが、この膜動態を支える脂質膜がどのように供給されるのかは、未だ明らかにされていない大きな謎の 1 つである。これまでオートファジーに特化した輸送小胞、Atg9 小胞がオートファゴソーム形成の核として機能することが示されており (Yamamoto et al., JCB 2012)、オートファゴソーム形成における Atg9 の寄与が明らかにされつつあるが、Atg9 小胞がどうやって生合成されるのかはよく分かっていない(図 1)。また、Atg9 は 6 回貫通型の膜タンパク質であり、オートファゴソームの外膜に局在し、オートファゴソーム形成に利用された Atg9 は、再度、Atg9 小胞としてオートファゴソーム形成に再利用されるが、その分子機構も明らかではない。本研究では、(1) Atg9 小胞がゴルジ体から生合成される分子機構、(2) オートファゴソーム形成に利用された Atg9 が Atg9 小胞としてリサイクルされる分子機構の 2 点に着目し、研究を行った。



図1: Atg9の輸送経路

[A-1: Atg9 小胞がゴルジ体から生合成される分子機構]

新規合成された Atg9 は、COPII 小胞を介して、小胞体からゴルジ体に運ばれたのち、直径 30-60 nm ほどの Atg9 小胞に運ばれる。1 つの Atg9 小胞は 20-30 分子の Atg9 を含み、その生合成には Atg23 と Atg27 を必要とする。しかし、Atg23、Atg27 のどちらも、典型的なコートタンパク質とのホモロジーを持たないため、どのように Atg9 小胞形成機能するのかはよく分かっていない。特に、Atg23/Atg27 自身は Atg9 小胞形成を媒介するのか？それとも、Atg23/Atg27 は他のコートタンパク質と相互作用することで、Atg9 小胞を形成するのかは明らかではない。

Atg27 は、1 回貫通型の I 型膜タンパク質である。ごく最近、その内腔側に M6PR (Mannose-6-phosphate receptor) と相同性の高い領域を持つことが報告された (Segarra et al., Traffic 2015)。M6PR は、ゴルジ体において、新規合成されたリソソーム加水分解酵素を輸送小胞への積み込みに機能する。興味深いことに、Atg27 の内腔領域は Atg9 と相互作用することが知られる。そこで、Atg27 が Atg9 の Atg9 小胞への積み込みに機能するのかを調べるため、Atg27 の内腔領域を 10 残基ずつ欠損した変異体を作製し、変異体発現株における Atg9 小胞形成を蛍光顕微鏡にて解析した。

まず、Atg9 小胞形成を評価するため、Atg9 小胞を可視化する系の確立を試みた。これまで Atg9 小胞の可視化では、Atg9 の C 末端領域に GFP を融合した Atg9-GFP が用いられている。しかし、Cornell 大学にある共焦点蛍光顕微鏡にて、Atg9-GFP の観察を試みたところ、シグナルが弱く、これまで報告されているような明瞭な輝点が観察されなかった。そこで、GFP よりも蛍光強度の高い緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen を C 末端領域に融合した Atg9-mNeonGreen を用いたところ、これまで報告によく類似した細胞内を激しく動き回る輝点が観察されたため、Atg9 小胞形成の評価には、Atg9-mNeonGreen を用いた。

次に、Atg27 の内腔領域を 10 残基ずつ欠損した変異体を作製し、Atg9 小胞形成を評価した。しかし、作製した多くの Atg27 変異体において Atg27 の発現が見られなかった。また、発現が確認できた変異体では、Atg9 小胞形成がほぼ正常に起きていた。Atg27 の発現がみられなかった変異体では、導入した変異が Atg27 の正常なフォールディングに影響を与えていたことが予想されたため、ホモロジーモデリングを用い、構造表面上に位置すると予想される残基のいくつかに変異を導入してみたが、Atg9 小胞形成に影響を与える変異体は得られなかった。

本研究を進める過程で、複数のグループから、哺乳類 Atg9 小胞の形成には AP-4 コートタンパク質が必要であることが報告された (Mattera et al., PNAS 2017; Davies et al., Nat. Communications 2018)。しかし、出芽酵母でも、Atg9 小胞は観察されるにも関わらず、AP-4 コートタンパク質は酵母には存在しない。そこで、Atg9 小胞の生合成にかかわるコートタンパク質を同定するため、酵母に存在するすべてのコートタンパク質欠損株を作製し、Atg9 小胞の生合成を調べたが、Atg9 小胞形成に強い欠損を示す変異体は見つからなかった。一方、酵母 Atg9 小胞形成では、ゴルジ体におけるホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) の産生に必須な Pik1 (PI4 キナーゼ) が必須であることが報告されている (Wang et al., JBC 2012)。そこで、*pik1* 温度感受性変異体における、Atg9 小胞形成を評価したところ、確かに欠損がみられた。これらの結果より、酵母 Atg9 小胞形成では、既知のコートタンパク質ではなく、未知の PI4P 結合タンパク質が Atg9 小胞形成に機能していることが予想され、PI4P 結合能を持つタンパク質に注目して、解析を続けている。

[A-2: オートファゴソーム形成に利用された Atg9 が Atg9 小胞としてリサイクルされる分子機構]

Atg9 はオートファゴソームの外膜に局在した後、オートファゴソームが液胞膜と融合すると、Atg9 小胞として再度利用される。まず、Atg9 がリサイクルされる過程を可視化するため、オートファゴソームと液胞膜の融合に必須な *vam3* の温度感受性株に Atg9-mNeonGreen を発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。この変異体を、非許容温度である 37℃にて培養し、Rapamycin 処理し、オートファジーを誘導させたところ、オートファゴソームとみられるリング状の構造体が確認された。次に、この変異体を許容温度である 26℃で培養したところ、リング状の構造体が消失し、細胞膜を動き回る Atg9 小胞が確認さ

れた。以上より、vam3 変異体を用いることで、Atg9 がリサイクルされる過程が可視化できているものと推測された。膜タンパク質のリサイクルでは、SNX-BAR と呼ばれるタンパク質ファミリーが重要である。SNX-BAR タンパク質は、PI3P 結合能を持つ PX ドメインと膜変形能を持つ BAR ドメインから構成され、出芽酵母には、8 つの SNX-BAR タンパク質が存在する。そこで、これらの欠損株における Atg9 のリサイクルを評価したが、試したすべての変異体において Atg9 のリサイクルがみられた。これらのタンパク質が協調的に機能する可能性を調べるため、複数の SNX-BAR 遺伝子の欠損株における Atg9 小胞形成を評価したところ、まだプレリミナリーではあるが、Atg9 のリサイクルに欠損がみられる変異体が得られた。しかし、この変異体では、非オートファジー誘導条件下において、Atg9 小胞の形成にも欠損がみられたため、これらの SNX-BAR タンパク質が直接的に Atg9 のリサイクルに寄与しているのか、それとも Atg9 小胞形成を介して、間接的に関与しているのか明らかにするため、現在、温度感受性変異体を作製し、解析することを予定している。

B. レトロマー複合体による積荷認識機構の解明

出芽酵母は、非典型的なコートタンパク質であるレトロマー複合体を保持するため、レトロマー複合体が輸送小胞を形成する過程の解析も平行して行った。レトロマー複合体は、酵母からヒトまで進化的に保存された非典型的なコートタンパク質複合体である。酵母では、5 つの Vps タンパク質 (Vps5, Vps17, Vps26, Vps29, Vps35) から構成され、エンドソームにおける積荷小胞形成に機能しているが、COPII コートタンパク質に代表されるコートタンパク質と相同性を持たない。レトロマーは様々な膜タンパク質のエンドソームからのリサイクルに機能するが、もっともよく理解されているのは液胞内加水分解酵素 CPY の受容体、Vps10 のリサイクルである (図 2)。Vps10 は CPY のゴルジ体から輸送小胞への積み込みに機能する。CPY を含んだ輸送小胞はエンドソームへと運ばれた後、エンドソームが液胞と融合することにより、CPY は液胞内腔へと運ばれる。一方、Vps10 は CPY とは異なり、エンドソームが液胞と融合する前に、レトロマー複合体によりゴルジ体へと逆行輸送 (リサイクル) される。ゴルジ体へと運ばれた、Vps10 は再度 CPY の積み込みに機能する。興味深いことに、一部の家族性パーキンソン病患者では、Vps35 をコードする遺伝子に変異を持つこと、この変異体ではレトロマーの活性が低いことが報告されている。

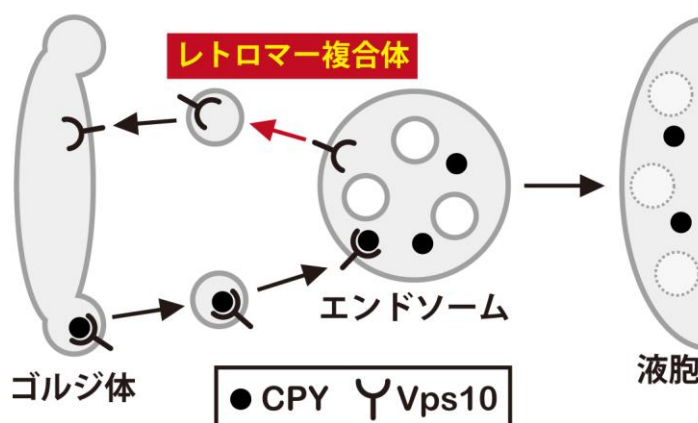


図2: Vps10(CPY受容体)のリサイクル機構

リサイクル小胞形成過程では、まず Vps5/Vps17 の PX ドメインがエンドソーム膜上に存在する PI3P と結合することにより、レトロマーはエンドソーム膜上へと局在する。次いで、Vps5/Vps17 の BAR ドメインを介して、エンドソーム膜を変形することにより、リサイクル小胞の形成を媒介する。しかし、レトロマーがどのように積荷を認識し、リサイクル小胞へと積み込むのかはよく分かっていない。これまでレトロマーの積荷は、 $\Phi X[L/M/V]$ (Φ は F/M/V) と定義されるコンセンサス配列を持つことが提唱されているが、酵母ではレトロマーの積荷は 30 以下しか知られていないにも関わらず、 $\Phi X[L/M/V]$ 配列は全タンパク質の実に 98.3% に相当する 5841 のタンパク質が保持しているため、 $\Phi X[L/M/V]$ 配列により、レトロマーの正確な積荷認識を説明することは難しい。そこで、私は、積み荷は $\Phi X[L/M/V]$ 配列だけでなく、もう 1 つ積荷認識に必要な配列を持つのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、レトロマーの積荷として知られる Vps10 の網羅的な変異解析を行った。その結果、これまで知られたリサイクル配列に加え、FGEIRL 配列がレトロマーによる積荷認識に必要であることを明らかにした。このような、2 つのリサイクル配列を介した積荷認識が他のレトロマーの積荷にも必要なのか調べるため、他のレトロマーの積荷である Ear1 の変異解析も行ったところ、Vps10 同様に 2 つの配列が必要であることが分かった。次に、この 2 つのリサイクル配列がレトロマーにより認識されるのか明らかにするため、共免疫沈降法により、レトロマーと積荷の相互作用を解析したところ、積荷認識には、Vps26 と Vps35

の双方が必要であることが明らかとなった。さらに、積荷と Vps26 の相互作用を明らかにするため、これまで報告されている Vps26 の結晶構造を基に変異解析を行ったところ、積荷に応じて、Vps10 は異なる残基を介して、認識していることが明らかとなった。以上より、レトロマー複合体はこれまで考えられていたよりも、複雑に積荷と相互作用することにより、正確な積荷認識を達成していることが明らかとなった (図 3)。本研究結果は、私を筆頭著者として J Cell Biol.誌に掲載された (Suzuki et al., J Cell Biol. 2019)。

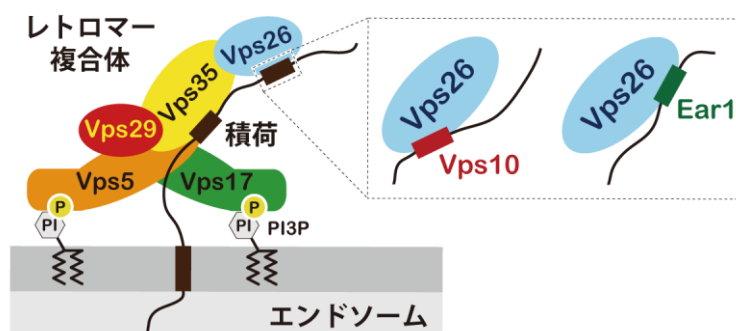


図3: レトロマー複合体による積荷認識機構

C. 液胞/リソソーム膜に運ばれた膜タンパク質をリサイクルする新規小胞輸送経路の発見

リソソームは、AP-3 小胞、オートファゴソーム、エンドソームと融合するため、リソソーム膜には、常に新たな脂質膜もしくは膜タンパク質が運ばれる。リソソームの恒常性を維持するには、リソソーム膜に運ばれた脂質膜もしくは膜タンパク質は、分解もしくは他のオルガネラに逆行輸送 (リサイクル) される必要があるが、その分子機構はよく分かっていなかった (図 4)。私は、Atg27 の変異体を作製している過程で、Atg27 が液胞膜 (酵母リソソーム膜に相当) からエンドソームへとリサイクルされること、次いで Retromer 複合体を介してゴルジ体へと逆行輸送されることを見出した (図 5A)。酵母遺伝学を用い、液胞膜からエンドソームへの逆行輸送に必要な因子を探索し、Snx4 を同定した。Snx4 はリン脂質 PI3P との結合能をもつ PX ドメイン、膜変形能を持つ BAR ドメインから構成される (図 5B)。

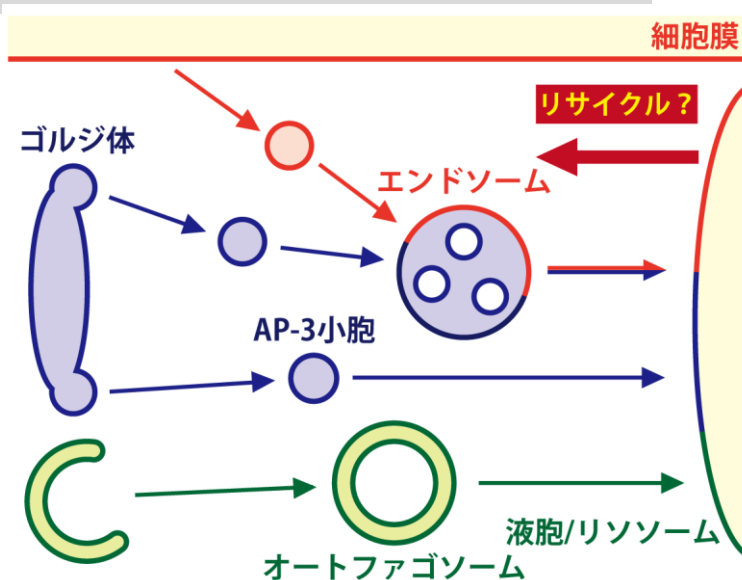


図4: 液胞/リソソームへの小胞輸送経路

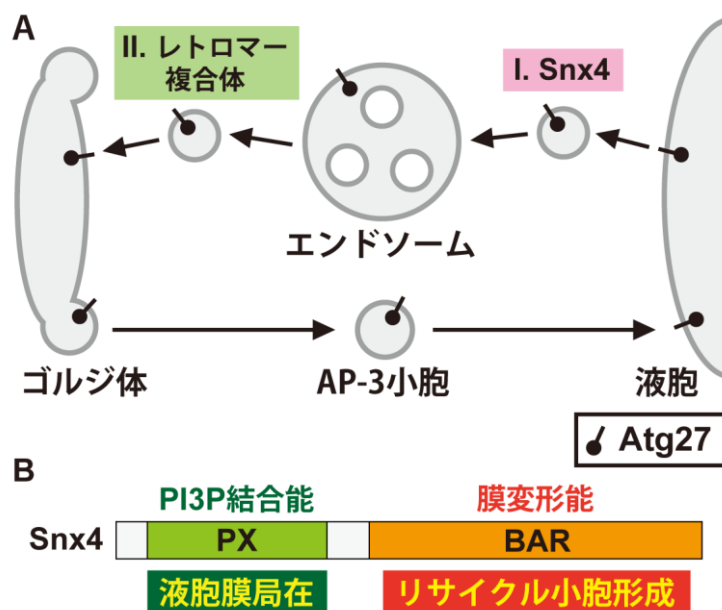


図5: 液胞膜からエンドソームへ膜タンパク質を逆行輸送する新規小胞輸送経路

Snx4 は PX ドメインを介して液胞膜上の PI3P を認識して、液胞膜上に集合した後、Atg27 の細胞質領域を認識し、BAR ドメインを介して、液胞膜を変形させることで、Atg27 を含むリサイクル小胞の形成を媒介していた。以上より、液胞膜から膜タンパク質をリサイクルする新規小胞輸送経路を同定し、その責任因子として Snx4 を同定した。この研究により、小胞輸送経路には終着点はなく、すべてのオルガネラは小胞輸送を介して、活発にタンパク質や脂質膜を受け渡していることが明らかとなった。本研究結果は、私を筆頭著者として J Cell Biol.誌に掲載された (Suzuki and Emr., J Cell Biol. 2018)。