

# 研究終了報告書

## 「動的なオルガネラコンタクトネットワーク制御機構の解明」

研究期間: 2021年4月～2024年3月

研究者: 西村多喜

### 1. 研究のねらい

細胞内には異なるオルガネラ膜同士が近接したオルガネラコンタクトサイトと呼ばれる構造体が存在する。1990年にリン脂質合成系の酵素群が濃縮されている膜面分として小胞体-ミトコンドリアコンタクトサイトが発見されて以降、様々なオルガネラ同士が近接していることが明らかになり、関連分子も次々に同定されている。このように急速に発展するコンタクトサイト研究ではあるが、生物学的に重要な謎がまだ多く残されており、その全貌が解明されたとは言い難い。この解析を困難にしている主な要因は、コンタクトサイトの解析ツールが限られていることにある。近年の電子顕微鏡解析技術の発展により、化学固定した細胞でのコンタクトサイトの詳細な構造が明らかになりつつあるものの、細胞内でダイナミックに変化する動的なコンタクトサイトを定量的に解析することはまだ技術的に難しい。また、オルガネラコンタクトサイトの機能性を確かめる際に用いる細胞内脂質の解析ツールも限られている。細胞内には1000種類を超える脂質分子が存在するが、脂質プローブを用いて細胞内分布の解析を出来る脂質分子種は主要なものに限られている。オルガネラ膜上では複数の脂質分子からなる脂質ナドメイン形成や膜構造の変化など、より複雑な現象がミリ秒単位のタイムスケールで生じている可能性を考慮すると、コンタクトサイト形成に依存したオルガネラ膜脂質環境の変化は、現在の技術では部分的にしか解析出来ていないものと考えられる。

そこで本研究ではコンタクトサイト解析と細胞内脂質解析に有用なツールの開発に取り組む。まずは動的なコンタクトサイトを生細胞で観察することを可能にするため、可逆的な split 蛍光プローブを利用した検出系の構築を行う。次に、複数のコンタクトサイトからなるオルガネラネットワーク形成がどのように制御されているのか調べる。特に脂質代謝系に注目した解析を進めていくことで、オルガネラネットワーク形成状態の変化と脂質代謝変動の因果関係を明らかにする。最後に、最先端の蛋白質工学技術を利用することにより、オルガネラコンタクトサイトの機能を評価する際に必須のツールである膜脂質プローブを作製するという、全く新しい試みにも挑戦する。以上の研究を通して、最先端の技術を導入しながら新しい解析ツールを独自に開発していくことで、オルガネラコンタクトネットワークの謎に迫る。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、まず動的なオルガネラコンタクトサイト可視化プローブの開発に取り組んだ。従来の不可逆的な split-GFP とは異なり、可逆的な split 蛍光プローブである split-FAST システムを使うことで、動的な小胞体-形質膜 (ER-PM) コンタクトサイトを検出することに成功した。また、脂質プローブのオンデマンド作製法の確立にも取り組み、タンパク質と脂質の結合を簡便に検出する解析系 CLiB assay (On Cell Surface Liposome Binding assay) を独自に開発することで、ナノボディをベースとする全く新しい脂質プローブの単離に成功した。特異性が高

いものから、それほど高くないものも含めると 1000 種類以上の脂質結合型ナノボディが単離できた。一部のものは *in vitro* だけでなく、細胞内でも使用可能なことも確認した。本研究で開発したこの CLiB assay は、脂質結合型ナノボディの単離だけでなく、単離したクローンの分子進化や脂質結合に必要なアミノ酸残基の同定と配列パターン解析など、非常に汎用性の高い技術であることも明らかになった。

さらに、この CLiB assay が多くの長所を有していることも示すことができた。例えば、従来の生化学的な解析法とは異なり、CLiB assay ではリコンビナントタンパク質を調製する必要がないため、非常に効率的なタンパク質-脂質の結合解析を可能とする。さらに次世代シーケンス解析と組み合わせることで、10,000 以上の異なるタンパク質の脂質結合データが一度に取得可能になった。

また、両親媒性  $\alpha$  ヘリックスのアミノ酸配列情報から、生物種を超えて保存されている物理化学的な特徴を抽出する手法も確立した。Python を使った物理化学的パラメーター解析と教師なし機械学習による分類を行うことで、オートファジー関連(ATG)分子の一つである ATG3 が持つ両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが、かさの大きな疎水性アミノ酸残基が少なく、かつ疎水度が低いという特徴があることを見出した。さらなる解析から、このユニークな特徴はオートファジーに関連する高次構造体が、オートファゴソーム膜上で適切に制御されるために必要であることが明らかになった。

## (2) 詳細

### 【計画 1】酵母細胞での動的なオルガネラコンタクトサイト検出系の構築

【研究目標】可逆的な split 蛍光プローブを利用した動的なオルガネラコンタクトサイトの検出

【達成状況】本計画研究では、リガンド依存的に蛍光を発する split 蛍光プローブとして split-FAST システムを採用した。まず split-FAST システムのリガンド (HMBR, HBRR 3,5-DOM)を化学合成で調製し、次に、小胞体と形質膜に split-FAST プローブを係留するのに適切したマーカー分子や、コンタクトサイトを検出するのに必要なリンカーの長さの検討を行なった。この最適化された条件下において、形質膜の近傍に split-FAST プローブの蛍光シグナルを観察することに成功した。小胞体-形質膜 (ER-PM) コンタクトサイトが形成出来ない酵母変異体ではこの split-FAST プローブの蛍光シグナルが減弱していることから、実際に ER-PM コンタクトサイトを検出出来ていることが確認出来た。しかし想定よりもバックグラウンドが高く、split-FAST プローブを発現させなくてもリガンドの微弱な蛍光シグナルが形質膜上で検出されることも分かってきた。この微弱な蛍光シグナルはリガンドが疎水的な環境下である形質膜の脂質二重膜内に分布することによる非特異的な蛍光シグナルであると考えられた。以上、研究目標はある程度達成しているが、今後はスペクトルアンミキシング法や蛍光寿命顕微鏡を用いた解析法により、split-FAST プローブ依存的な真の蛍光シグナルと非特異的な蛍光シグナルの分離に取り組むなどの工夫が必要と思われる。

### 【計画 2】脂質代謝によるオルガネラコンタクトネットワーク制御機構の解明

【研究目標】脂質代謝酵素の高速分解によるコンタクトネットワークへの影響を調べるとともに、コンタクトサイト欠損による脂質代謝系への影響を網羅的なリポミクス解析により明らかにする。

【達成状況】本研究計画は、計画1や計画3で作製する解析ツールをもとに進めていく予定であった。計画3が当初予定していた有用なクローンの単離から、大規模解析手法の確立や機械学習への応用へと方針転換をしたこともあり、本計画研究を本格的に実施するまでには至らなかった。

### 【計画3】脂質ナノプローブ on demand 作製法の確立

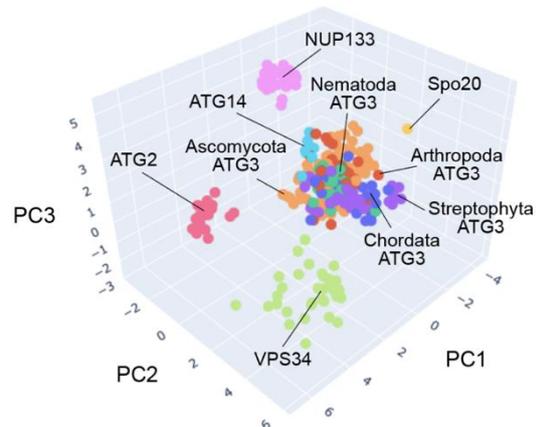
【研究目標】標的脂質と結合する脂質プローブを必要に応じて作成する手法を新たに開発するとともに、脂質結合領域のアミノ酸配列情報のみからその機能の予測に取り組む。

【達成状況】本研究計画では、まずタンパク質とリポソームの結合を簡便に検出する解析系 CLiB assay (On Cell Surface Liposome Binding assay) を確立した。この CLiB assay は目的タンパク質を細胞表面に発現させた酵母細胞を、蛍光色素を含むリポソームと混ぜた後、結合したものをフローサイトメーターで検出するという系である。詳細な解析から、この CLiB assay が非常に汎用性の高い手法であることが確認出来た。まず、(i) リコンビナントタンパク質を調製することなく、様々な脂質結合タンパク質の脂質結合能を検出することが出来る。また、(ii) 多様性が $\sim 5 \times 10^8$  クローンからなる蛋白質ライブラリーの中から、ホスファチジルイノシトールリン脂質などの標的脂質と結合する脂質結合型蛋白質の単離にも成功した。(iii) 脂質結合能や結合特異性が低い場合は、error-prone PCR と CLiB assay を組み合わせることで、人工的に単離した脂質結合型クローンへと分子進化させることも出来た。さらに、(iv) 各クローンを単離することなく、結合するクローンや結合しないクローンをプールフラクションのまま次世代シーケンズ(NGS)解析を行うことで、脂質結合に必要なアミノ酸配列パターンも明らかにすることが出来た。脂質結合型ナノボディの場合は、特に可変領域 CDR3 ループ構造の中央に分布する疎水性アミノ酸残基と、その根本にある塩基性アミノ酸残基が酸性リン脂質との結合に重要であることが分かった。

この CLiB assay を使って、これまでに 1,000 種類以上の脂質結合型ナノボディが単離出来ており、一部のものに関しては酵母細胞内に GFP 融合タンパク質として発現させることで、細胞内でも脂質プローブとして利用可能であることを確認している。

両親媒性  $\alpha$  ヘリックスは代表的な膜脂質結合モジュールの一つであり、約 20 アミノ酸からなる。本計画研究では両親媒性  $\alpha$  ヘリックスのアミノ酸配列情報から、その物理化学的な特徴を抽出し、教師なし機械学習を使うことで新しい機能を明らかにすることにも成功

した(図1)。具体的には、オートファジー関連(ATG)分子の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスに注目した解析から、ATG 分子の中でも ATG3 が持つ両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが、かさの大きな疎水性アミノ酸残基が少なく、かつ疎水度が低いという特徴があり、様々な生物種の ATG3 で高度に保存されていることが分かってきた。さらに、ドイツのグループとの共同研究で all-atom MD



【図1】教師なし機械学習による両親媒性  $\alpha$  ヘリックスの分類 (Nishimura et al., *Science Advances*, 2023 より抜粋)

simulation を行うことで、このユニークな特徴はオートファジーに関連する動的な高次構造体がオートファゴソーム膜上で適切に制御されるために必要であることを明らかにした (論文#1)。また、ATG3 により脂質化される ATG8 分子がオートファゴソーム膜上でシス型の膜相互作用し、オートファゴソーム膜の伸張にも寄与していることも見出した(論文#2)。

本計画研究において確立された、脂質プローブを必要に応じて作成する手法 CLiB assay は自身が単独発明者として特許申請をすでに完了している。また、両親媒性  $\alpha$  ヘリックスのアミノ酸配列情報のみからその物理化学的な特徴量を抽出するというアプローチにも成功し、それを論文として成果報告も出来たことから、本研究計画の当初の目的はおおむね達成されたものと考えられる。

### 3. 今後の展開

本研究で確立した CLiB assay は非常に汎用性が高く、また革新的な技術であることが分かってきたので、今後はこの新しい技術を基盤とした研究を中心に進めていく。さらに、様々な脂質プローブを開発することで、生体内に存在する多種多様な生体膜を可視化していく。生体膜の多様性がどのように形成され、感知され、利用されているのか、その分子機構と生理的意義の解明に取り組む。このようにして、新たな研究分野 -生体膜システム生物学- を創出することを目指す。

### 4. 自己評価

**【達成状況】**本研究課題は3つの計画研究を予定していたが、その中でも計画3が最も挑戦的であり、かつ最もやりたいプロジェクトであった。開始当初はかなり不安もあったが、単に脂質プローブを取得するだけでなく、様々な用途に応用可能な技術CLiB assayを確立できたことは、とても評価できると考えている。世界的に見ても類似の技術はまだ存在しないので、この技術を使って世界の生体膜研究をリードしていきたい。途中で少し方針転換し、この計画3を重点的に進めたため、計画2は当初の予定通りに進まなかったが、全体としては成功したものと考えている。

**【研究の進め方】**本研究を実施するのに必須であったセルソーターやセルアナライザーを購入し、予定通り研究費を執行出来た。研究実施体制は全期間通じて自分1人で研究を実施せざるを得なかった点は少し問題があったように思う。学生を受け入れる環境をきちんと構築出来ていればもっと効率的に研究を進められたはずなので、今後改善すべき点である。

**【波及効果】**本研究で開発したCLiB assayは特許申請を完了しており、これまでに様々な企業から興味を示して頂いている。今後は有用な脂質プローブや合成ライブラリーの物質特許等の取得も積極的に行なっていくことを考えると、企業との共同開発などに繋がる可能性も高いと考えている。近い将来、非常に大きな経済的な波及効果を生み出せるのではないかと期待している。

### 5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2 件

1. [\\*#Nishimura, T. \(\\*co-corresponding\)](#), [#Lazzeri, G. \(#co-first\)](#), [Mizushima, N.](#), [\\*Covino, R.](#), [Tooze, S.A.](#) Unique Amphipathic  $\alpha$ -helix Drives Membrane Insertion and Enzymatic Activity

of ATG3. *Science Advances*, 2023, 9 (25), eadh1281

オートファジー関連分子 ATG3 は N 末端に膜結合モジュールである両親媒性  $\alpha$  ヘリックスを有している。教師なし機械学習を用いた解析から、この ATG3 の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスは一般的なものと比べて疎水度が低く、かさの大きな疎水性アミノ酸が少ないという特徴があることを見出した。さらに、このユニークな特徴は ATG3 依存的な ATG8 脂質化反応が効率的に生じるために重要な性質であることを明らかにした。

2. #Zhang, W., #Nishimura, T. (#co-first), Gahlot, D., Saito, C., Davis, C., Jefferies, H.B.J., Schreiber, A., Thukral, L., \*Tooze, S.A. Autophagosome membrane expansion is mediated by the N-terminus and cis-membrane association of human ATG8s. *eLife*, 2023, 12, e89185.

オートファジー関連分子 ATG8 はユビキチンと類似した構造を有するユビキチン様タンパク質であるが、他の分子とは異なり N 末端に 2 つの  $\alpha$  ヘリックスを有する。私たちは ATG8 分子の C 末が脂質化されると、この N 末端がオートファゴソーム膜とシス型で相互作用することを新しく見出した。ATG8 分子欠損株の電子顕微鏡を用いた CLEM 解析から、オートファゴソーム膜伸長にはこの N 末端のシス型相互作用が必要であることが示唆された。

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件 (特許公開前のもは件数にのみ含む)

## (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- [プレスリリース] 東京大学&JST 共同プレスリリース「細胞内高次構造体の膜上でのダイナミックな挙動はどのように制御されているの？」  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20230624/index.html>
- [招待講演] Taki Nishimura: 「Deciphering the Secret Code Hidden in the ATG3 Amphipathic  $\alpha$ -Helix」 **The 25<sup>th</sup> iCeMS International Symposium – Self-Assembly Science for Unlocking Life's Secret**, January 11-12, 2024, Kyoto
- [招待講演] 西村多喜: オンデマンド脂質プローブ作製技術 **第 95 回日本生化学会大会**; 2023 年 10 月 31 日, 福岡
- [招待講演] 西村多喜: リソソーム膜脂質を可視化する脂質プローブの作製 **第 23 回 日本蛋白質科学会年会**; 2023 年 7 月 5 日, 名古屋
- [招待講演] 西村多喜 et al., 両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが操るオートファジー関連分子 ATG3 の機能 **第 60 回日本生物物理学会年会**; 2022 年 9 月 28 日, 函館