

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

# オートファジーの集学的研究： 分子基盤から疾患まで 研究成果報告書

平成 25 年度～平成 29 年度  
領域番号 3501

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究  
研究成果報告書  
平成25年度～平成29年度

オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで

領域代表 水島 昇

領域代表 水島 昇  
(東京大学・大学院医学系研究科・教授)

平成 31(2019) 年 1 月

科研費  
KAKENHI

## 目次

はじめに .....	1
研究組織 .....	2
交付決定額 .....	4
研究領域の目的 .....	4
研究成果概要 .....	6
評価	
評価委員による評価 .....	12
中間および事後評価 .....	14
各研究課題の成果	
計画研究 A01 .....	20
計画研究 A02 .....	26
公募研究 A01 (平成 26 ~ 27 年度) .....	32
公募研究 A02 (平成 26 ~ 27 年度) .....	43
公募研究 A01 (平成 28 ~ 29 年度) .....	53
公募研究 A02 (平成 28 ~ 29 年度) .....	62



## はじめに

本新学術領域研究（研究領域提案型）「オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで（略称：オートファジー）」は、2013年6月に発足しました。それ以前の重点領域研究や特定領域研究の頃には、オートファジーの研究はタンパク質分解や細胞内輸送の領域の一部として推進されていました。しかし、オートファジーの研究は国内外で勢いよく成長しており、一つの研究領域として扱うべき時になったと判断されました。そこで、本新学術領域ではテーマをオートファジーにフォーカスし、そこにさまざまな研究分野、研究手法、モデル生物の研究者が集まって研究を推進することを狙いとししました。2018年3月で5年間の研究期間が終了しましたが、結果として予想を上回る数の共同研究成果を発表することができました。個人研究の集合体ではなく、領域型研究としての目的を十分に果たせたと思っております。また、班会議をオープン化してオートファジー研究会と合同開催としたことも領域の拡大に寄与できた一因であったと思います。さらにこの領域では多くの若手が後押ししてくれました。若手の会の活発さや班会議で夜通し議論している様子は、この分野の今後の成長を大いに期待させるものでした。このような領域の運営ができたのは、計画研究ならびに公募研究のみなさまと研究を行うことができたためであり、心から感謝申し上げます。

領域活動の4年目にあたる2016年には総括班連携研究者である大隅良典先生がノーベル生理学・医学賞を受賞され、本領域にとりましても最大の興奮と喜びとなりました。受賞決定のわずか1ヶ月後の2016年11月には新潟県越後湯沢で班会議が行われましたが、大隅先生も例年通りご参加くださり、多くの報道陣も詰めかけることとなりました。本領域班会議の様子は『新潟日報』に掲載されましたが、新聞で班会議のことが取り上げられるということ自体なかなか無いことであり、感慨深いものがありました。

この最終報告書は、5年間の領域の成果をまとめたものです。ご執筆いただきました計画研究と公募研究の全班員のみなさま、またこの報告書作成を含めて本領域の事務を一貫してサポートしてくれました藤原能里子氏にこの場を借りて感謝申し上げます。

平成31(2019)年1月

新学術領域研究「オートファジー」  
領域代表 水 島 昇



## 研究組織

### 【総括班】

代表者	水島 昇	東京大学・医学系研究科・教授
分担者	吉森 保	大阪大学・生命機能研究科・教授
	中戸川 仁	東京工業大学・生命理工学院・准教授
	野田 展生	微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長
	水島 昇	東京大学・医学系研究科・教授
	小松 雅明	新潟大学・医歯学系・教授
	斉木 臣二	順天堂大学・医学研究科・准教授
連携研究者		
(内部)	佐藤 栄人	順天堂大学・医学研究科・准教授
(外部)	岩井 一宏	京都大学・医学研究科・教授
	内山 安男	順天堂大学・医学研究科・特任教授
	大隅 良典	東京工業大学・科学技術創成研究院・名誉教授
	大野 博司	理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー
	木南 英紀	順天堂大学・学長特別補佐、医学部・名誉教授
	田中 啓二	東京都医学総合研究所・理事長

### 【国際支援班】

代表者	水島 昇	東京大学・医学系研究科・教授
分担者	吉森 保	大阪大学・生命機能研究科・教授
	中戸川 仁	東京工業大学・生命理工学院・准教授
	野田 展生	微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長
	水島 昇	東京大学・医学系研究科・教授
	小松 雅明	新潟大学・医歯学系・教授
	斉木 臣二	順天堂大学・医学研究科・准教授

### 【計画研究 A01】

代表者	吉森 保	大阪大学・生命機能研究科・教授
代表者	中戸川 仁	東京工業大学・生命理工学院・准教授
代表者	野田 展生	微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長

### 【計画研究 A02】

代表者	水島 昇	東京大学・医学系研究科・教授
代表者	小松 雅明	新潟大学・医歯学系・教授
代表者	斉木 臣二	順天堂大学・医学研究科・准教授

### 【公募研究 A01】

代表者	福田 光則	東北大学・生命科学研究科・教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	佐藤美由紀	群馬大学・生体調節研究所・准教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	鈴木 邦律	東京大学・新領域創成科学研究科・准教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	山本 林	東京大学・医学系研究科・講師（Ⅰ）
代表者	藤本 豊士	名古屋大学・医学系研究科・教授（Ⅰ）
代表者	阪井 康能	京都大学・農学研究科・教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	野田 健司	大阪大学・歯学研究科・教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	岡本 浩二	大阪大学・生命機能研究科・准教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	潮田 亮	京都産業大学・総合生命科学部・助教（Ⅰ）
代表者	後藤(山田) 志野	京都大学・理学研究科・研究員（Ⅰ）
代表者	株田 智弘	国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	板倉 英祐	千葉大学・理学研究院・助教（Ⅱ）
代表者	和田 洋	大阪大学・産業科学研究所・准教授（Ⅱ）

### 【公募研究 A02】

代表者	矢野 環	東北大学・薬学研究科・准教授（Ⅰ）
代表者	村松 一洋	群馬大学・医学系研究科・助教（Ⅰ）/自治医科大学・小児科・准教授（Ⅱ）
代表者	藤本 千里	東京大学・医学系研究科・助教（Ⅰ）
代表者	齊藤 達哉	徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授（Ⅰ）
代表者	大村谷昌樹	熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授（Ⅰ）
代表者	綿田 裕孝	順天堂大学・医学部・教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	小池 正人	順天堂大学・医学部・教授（Ⅰ）
代表者	新崎 恒平	東京薬科大学・生命科学部・講師（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	石原 直忠	久留米大学・分子生命科学研究科・教授（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	津久井 久美子	国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官（Ⅰ、Ⅱ）
代表者	森田 英嗣	弘前大学・農学生命科学部・准教授（Ⅱ）
代表者	田口 恵子	東北大学・医学系研究科・講師（Ⅱ）
代表者	徳永 文稔	大阪市立大学・医学研究科・教授（Ⅱ）
代表者	黒川 峰夫	東京大学・医学系研究科・教授（Ⅱ）
代表者	堀江(川俣) 朋子	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教（Ⅱ）
代表者	神吉 智丈	新潟大学・医歯学系・教授（Ⅱ）
代表者	平尾 敦	金沢大学・がん進展制御研究所・教授（Ⅱ）
代表者	竹原 徹郎	大阪大学・医学系研究科・教授（Ⅱ）
代表者	朽津 和幸	東京理科大学・理工学部・教授（Ⅱ）

（Ⅰ）は平成 26～27 年度、（Ⅱ）は平成 28～29 年度  
（所属は終了時のものです）



## 交付決定額（配分額）

（平成 28 年度開始の国際活動支援班経費を含む）

単位（円）

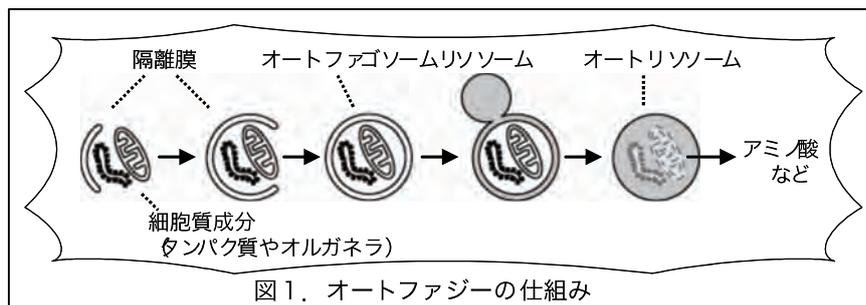
	直接経費	間接経費	合計
平成 25 年度	266,900,000	80,070,000	346,970,000
平成 26 年度	243,200,000	72,960,000	316,160,000
平成 27 年度	252,500,000	75,750,000	328,250,000
平成 28 年度	250,100,000	75,030,000	325,130,000
平成 29 年度	257,400,000	77,220,000	334,620,000
平成 30 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
合計	1,273,100,000	381,930,000	1,655,030,000



## 研究領域の目的

### オートファジーの研究背景と現状

生体を形作り、それを機能的な状態に維持するためには、構成成分を合成するとともに、それらを適切に分解処理することが重要である。細胞内には、タンパク質、脂質、糖質、核酸、およびそれらの集合体としての小器官などが存在しており、細胞内分解系は、これらの代謝回転や品質管理を担っている。オートファジーは、このような細胞内の多様なターゲットを分解しうる大規模分解システムである(図 1)。1990 年後半以降、オートファジー関連分子が次々と明らかにされ、それとともにオートファジーは、飢餓時のアミノ酸プール維持、初期胚発生、細胞変性抑制、細胞内侵入細菌分解、選択的基質分解、がん抑制、炎症制御などのさまざまな機能をもつことが判明してきた。日本はこれらの成果の多くを発信し、この分野の発展に大きく貢献してきた。しかし、オートファジーはこれまで、タンパク質分解、細胞内輸送、構造生物学、神経科学などのさまざまな研究グループや研究費種目の一部として扱われてきた。そのため、個々の研究室で高いレベルの研究が行われてきたにもかかわらず、我が国はその中核組織を欠いており、国内でのオートファジー研究の裾野が十分に広がっているとは言い難い状況にある。オートファジー研究は今後、メカニズムの全容解明、ヒト疾患との関連解明などの重要なフェーズに入っていくと考えられる。オートファジーを既存分野の一部として扱っていてもはや速やかな発展は困難であり、新しい研究領域として確立すべき時期にある。無細胞系構成生物学、構造生物学、細胞生物学、マウス等モデル生物学、ヒト遺伝学、疾患研究を有機的に連携させたオートファジーの集学的研究体制を構築し、我が国発のオリジナリティーの高い研究をさらに推進させ、学術水準の向上を図ることが重要である。



## 本領域の目的と概要

オートファジー研究は酵母遺伝学の導入を契機に大きく進展し、現在までにオートファジーの分子機構の基本フレームと基本的生理作用が理解されるようになった。しかし、このような急成長にもかかわらず、多くの重要課題が未解明のまま残されている。たとえば、オートファゴソームがどこで形成されているか、膜の由来は何か、というような基本的なことがまだわかっていない。また、ノックアウトマウスを用いた研究からオートファジーを必要とする生理的プロセスが明らかになってきたが、そこでオートファジーが具体的にどのような働きをしているのかという本質的なことがほとんど明らかになっていない。さらには、基本分子機構やマウス生理学の研究成果が、ヒト疾患の理解や制御に十分に直結していない。しかし、これまでの基礎的な蓄積をベースにすれば、今こそこれらの本質的課題に取り組むことができる段階にきていると考えられる。オートファジーはまだ新しい分野であるため、分子機構と生理・病態の研究を相互に理解しながら進める必要があり、いずれか一方を行うだけでは足元をすくわれかねない。進展著しいこの研究分野を新しい学問領域として確立し、メカニズムの根本的理解と健康医学への展開を図る必要がある。

そこで、本領域では次の二つの主目的を設置し、それぞれを研究項目として設定した。

### A01【オートファジーの分子機構と膜動態】

オートファゴソーム形成の過程で、小胞体がプラットフォームとして機能していることが示唆されているが、その具体的関与は明らかではない。また、ミトコンドリア、ゴルジ体、脂肪滴などの他の小器官の関与も示唆されている。そこで、これまでに得られた多種類のオートファジー関連因子を手がかりに、無細胞再構築系や細胞生物学的手法を用いて、オートファゴソーム形成場所の特定とオートファジー膜動態の駆動メカニズムを明らかにする。次に、最近特に重要視されてきたオートファジーの選択的基質の認識機構を明らかにする。これについては、なぜ選択的基質がオートファゴソーム形成部位に集積するかという「場」の問題と、分解の引き金になる選択的基質の側に生じる「変化」の問題の双方からアプローチする。さらに、オートファゴソームとリソソームの融合機構の全容を明らかにすることで、オートファジーの一連の全過程を理解することを目指す。

### A02【オートファジーの生理・病態】

これまでにオートファジーが重要な役割を果たしている局面が明らかにされてきた。そこで、これらの局面におけるオートファジーの実際の役割を、バルク（非選択的）分解および選択的基質分解の双方の視点から、発生工学、代謝解析などのアプローチを用いて理解する。次に、ヒト疾患への展開を目指し、神経変性疾患、がん、感染症などにおけるオートファジーの意義を明らかにする。また、実際のヒト神経変性疾患におけるオートファジー遺伝子変異について、その病態形成における意義を解明する。さらに、オートファジー制御薬の探索とその機序解明を行う。

オートファジーがさまざまな細胞および個体高次機能に関わることを考えると、本領域の展開が、関連する基礎生命科学分野や臨床医学の発展へ貢献しうることが大いに考えられる。また、本領域が日本初のオートファジーの集学的研究センターとして機能することで、現在世界的にも優位な位置にある我が国のオートファジー研究を一層高いレベルに引き上げることができると期待される。



## 研究成果概要

本領域では A01：オートファジーの分子機構と膜動態と A02：オートファジーの生理・病態の 2 つの研究項目を設置し、両方にまたがる共通重要テーマとしてオートファジーの選択性と制御化合物の探索を設定した。

### A. オートファジーの分子機構と膜動態（主に A01）

本テーマではオートファゴソームの形成と成熟のメカニズム解明を目指した。

オートファゴソーム形成については、研究期間の前半にオートファジー始動複合体（Atg1 複合体）について当初の見込みを上回る進展があった。計画研究の野田展生による構造生物学的解析を中心にして、計画および公募研究の研究者が機能解析をするという有機的な連携が機能した。栄養飢餓によって Atg1 複合体にもたらされる変化、Atg1 複合体が多量体を形成するメカニズム、Atg1 複合体と Atg9 小胞との結合機構が明らかにされた（野田展生、公募：山本 *Nat Struct Mol Biol* 2014、公募：山本 *PNAS* 2015、公募：山本、野田展生 *Dev Cell* 2016 など）。また、Atg1 複合体の構成因子の組成が酵母と哺乳類で異なる点についても、Atg13-Atg101 の構造解析に基づいて説明することができた（野田展生、水島 *Nat Struct Mol Biol* 2015 共責任著者論文）。オートファゴソーム形成を誘導する TORC1 シグナルの制御についても詳細が明らかにされた（公募：野田健司 *Mol Biol Cell* 2015、*J Cell Sci* 2017、*PLoS Genet* 2018）、脂質合成酵素の集積する特殊なドメインがオートファゴソームを形成する重要な場であることが示唆された（水島 *EMBO J* 2017）。

オートファゴソームの成熟ステップにおいても大きな進展があった。オートファゴソームとリソソームの融合に先立って両者が HOPS によって繫留されることが明らかにされた（水島 *Mol Biol Cell* 2014）。また、その融合には SNARE であるシンタキシン 17（STX17）が必要であるが、それに加えて YKT6 もオートファゴソーム SNARE として必要であることが判明した（水島 *J Cell Biol* 2018）。さらに、これまでオートファゴソーム形成に必要と考えられてきた ATG 結合系が、オートファゴソームの閉鎖とリソソーム融合後におけるオートファゴソーム内膜の分解に重要であるという予期せぬ発見があった（水島 *Science* 2016）。オートファゴソームとリソソームの融合にジュベール症候群関連因子 INPP5E が重要であることも発見された（吉森 *EMBO J* 2016）。この他、オートファゴソーム形成初期構造体「オメガソーム」の超微形態解析（和栗、小松 *Mol Cell Biol* 2014）、各種オートファジー変異体の超微形態表現型カタログ（水島 *J Cell Sci* 2014）はオートファジー研究領域に有用な情報を提供した。

### B. オートファジーの選択性（A01 と A02 の共通項目）

以前は非選択的と考えられてきたオートファジーにも選択性があることがすでに明らかとなっている。本テーマでは、選択的基質の認識機構をオートファジーマシナリーの側と、分解の引き金になる選択的基質の側に生じる変化の双方から解明することを目指した。この項目においても、計画研究と公募研究の連携で世界的に優れた成果が得られた。

オートファジーの選択的基質としては、タンパク質としてはフェリチン（水島 *J Cell Sci* 2014）、小器官としては損傷リソソームや異物含有エンドソーム（吉森 *J Cell Biol* 2013、*EMBO J* 2013）、小胞体・核（中戸川 *Nature* 2015）などが新規に同定された。そのほか、酵母で網羅的探索がなされた（公募：鈴木、野田展生 *PLoS One* 2014）。

選択的基質を認識するメカニズムとしては、前述の小胞体および核の認識に関わる新規アダプター Atg39、Atg40 が同定された（中戸川 *Nature* 2015）。さらに、酵母ペルオキシソーム認識レセプターの制御機構（中戸川 *J Cell Biol* 2014）、酵母ミトコンドリア認識の制御機構（公募：岡本 *EMBO J* 2015、*J Biol Chem* 2015）、バクテリアや人工ビーズを含むエンドソーム、損傷リソソームの認識機構（吉森 *J Cell Biol* 2013、*EMBO J* 2013）、Atg19 による酵母の選択的基質 Ape1 の認識機構（野田展生 *Cell Rep* 2016）、受精卵でおこる精子由来のオルガネラを排除するメカニズムが解明された（公募：佐藤 *Nat Cell Biol* 2018）。オートファゴソームによるミトコンドリアの切断という興味深い現象も発見された（公募：神吉 *J Cell Biol* 2016）。

選択的オートファジーの生理的意義についても進展があり、もっともよく知られているオートファジー基質である p62 が転写因子 Nrf2 を活性化する分子機構が明らかにされ、オートファジーが p62 を積極的に分解する意義の理解が飛躍的に進んだ（小松 *Mol Cell* 2013）。関連技術としては、脂肪滴をオートファジーで強制的に分解する forced リポファジー系が開発され、オートファジーによる新しい細胞機能制御の可能性が示唆された（分担：塚本、公募：板倉 *Development* 2018）。

以上の古典的なマクロオートファジーに加えて、その他のオートファジーについても進展があった。リソソーム膜が直接陥入して基質を分解するミクロオートファジーという経路がすでに知られているが、酵母では、ペルオキシソームだけではなく、脂肪滴や液胞膜タンパク質がミクロオートファジーの基質となること、その分解に Atg 因子が必要ないことが明らかにされた (公募: 阪井 *J Cell Biol* 2017)。さらに、RNA や DNA がリソソーム膜を直接透過する RNautophagy/DNautophagy についてもその基質認識や膜透過機構が明らかにされた (公募: 株田 *BBRC* 2015、*Nucleic Acids Res* 2015、*Autophagy* 2017)。選択的オートファジーのメカニズムの解明とともに、その多様性が大きく認識されるに至った。

### C. オートファジーの生理的・病態生理的意義 (主に A02)

オートファジーの生理的役割を発生工学、代謝解析などのアプローチを用いて理解するとともに、ヒト疾患との関連を視野にいれ、神経変性疾患、がん、感染症などにおける意義の解明を目指した。

オートファジーの品質管理機構としての役割は特に神経系で重要であることがこれまでに示されている。本領域立ち上げ直前に、ヒト神経変性疾患 SENDA で酵母 *ATG18/21* のヒトホモログのひとつ *WDR45/WIP14* 遺伝子の変異が水島・松本らによって発見された。SENDA は脳の鉄沈着を特徴とする疾患であり、その病態解明は本領域の重要な課題である。まず、計画班の斉木らによって、我が国の SENDA と類似する症例群 28 例中 7 例 (全て女性) で *WDR45* に病因変異が発見され、*WDR45/WIP14* 不全による神経疾患の頻度が高いことが示された (斉木 *Neurobiol Aging* 2015)。一方、神経特異的 *WDR45/WIP14* ノックアウトマウスが作製され、SENDA と部分的に類似した神経症状が観察された (水島 *Autophagy* 2015)。また、パーキンソン病とマイトファジーとの関連も最近の大きなトピックであり、Parkin と鉄代謝調節因子 IRP2 二重変異マウスの解析 (公募: 小池 *Neurosci Lett* 2015)、新たな家族性パーキンソン病原因遺伝子 *CHCHD2* とマイトファジーとの関連の解析 (斉木 *Lancet Neurol* 2015)、ドーパミン神経特異的オートファジー欠損マウスに生じたヒトパーキンソン病と類似した病理所見の解析 (斉木 *Sci Rep* 2018) を行った。一方で、選択的オートファジーレセプターであるオプチニューリン (OPTN) の直鎖状ユビキチン鎖結合性喪失が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 発症に関わることも明らかにされた (公募: 徳永 *Nat Commun* 2016)。さらに、新生児期に死亡する *Atg5* 欠損マウスの神経系にのみ *Atg5* を再発現させることで致死を回避しえたことは、神経系におけるオートファジーの重要性を決定づけた (水島 *Dev Cell* 2016)。

肝臓での品質管理にオートファジーが重要な役割を果たしていることもよく知られている。本領域では、肝臓でのオートファジーとプロテアソーム系が連携しうること (小松 *J Biol Chem* 2014)、オートファジー選択的基質 p62 による転写因子 Nrf2 の異常活性化が肝細胞がんの増殖を促進すること (小松 *Nat Commun* 2016)、高脂肪食がオートファジー抑制因子 Rubicon を増加させることで脂肪肝を生じさせること (吉森、公募: 竹原 *Hepatology* 2016) など、ヒト疾患と関連性の深い発見がなされた。

他の臓器においては、オートファジーによる膵β細胞での IAPP 毒性 (公募: 綿田、小池、吉森 *J Clin Invest* 2014) や尿酸血症性腎症の抑制 (吉森 *EMBO J* 2013)、*Atg13* の心臓の発生における意義 (水島 *Mol Cell Biol* 2015)、内耳機能におけるオートファジーの重要性 (公募: 藤本千里、水島 *Cell Death Dis* 2017)、白血病幹細胞の維持におけるオートファジーの役割 (公募: 黒川 *Blood* 2016) が明らかになった。感染との関係では、レジオネラ感染時の STX17 の分解現象 (公募: 新崎 *Nat Commun* 2017)、血管内皮細胞での病原菌除去不全機構 (吉森 *PLoS Pathog* 2017) などが明らかにされ、オートファジーの生理的・病態生理的意義の理解が広がった。さらに、*Atg8* と結合する UBA5 (E1 様酵素) の遺伝子変異が遺伝性発達障害で発見されたことはヒト疾患との新しい展開をもたらした (小松 *Am J Hum Genet* 2016)。以上、哺乳類の研究では計画班 - 公募班、基礎 - 臨床が密に連携して領域内で研究が遂行された。

哺乳類以外の生物の生理機能は公募研究を中心に、赤痢アメーバでの貪食胞酸性化における *Atg8* 機能 (公募: 津久井 *Cell Microbiol* 2015)、メタノール資化性酵母での環境中の窒素源変化に依存した選択的オートファジーによる窒素源代謝酵素の分解の意義 (公募: 阪井 *Sci Rep* 2015)、出芽酵母での脂質リサイクルにおけるオートファジーの意義 (公募: 阪井 *Autophagy* 2015)、シロイヌナズナでの強光ストレスとペルオキシソーム分解との関連 (公募: 後藤 (山田) *Plant Cell Physiol* 2015) など、幅広く研究が展開された。

生理機能に関連する技術として新規オートファジー活性レポーター (GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G) を開発し、ゼブラフィッシュやマウス個体でのオートファジー活性評価に成功した (水島 *Mol Cell* 2016)。

## D. 制御化合物の探索 (A01 と A02 の共通項目)

バルクオートファジーおよび選択的オートファジーを対象とした新しい創薬スクリーニング法を複数確立した。これらの新規スクリーニング系および既存のスクリーニング系を用いて、大規模化合物ライブラリーや既存薬ライブラリーを対象にして新規オートファジー制御化合物の探索を行った。その結果、新規オートファジー誘導剤 (遺伝子を含む) や阻害剤が取得された (吉森、水島、斉木、公募：株田)。一部については論文発表 (水島 *Mol Cell* 2016、小松 *Nat Commun* 2016)、6 件の特許出願 (水島、斉木、株田) に至っている。さらに、生体内化合物の網羅的探索から、パーキンソン病患者血漿 / 血清においてオートファジー誘導作用を持つ化合物 2 種を同定し、疾患バイオマーカーとしての利用可能性を報告した (斉木 *Sci Rep* 2017、*Neurology* 2018)。

以上、有用な化合物スクリーニング系の構築と制御化合物の同定については、順調に進展したと判断される。これには領域内での情報やマテリアル交換も有用であった。現在も関連研究者によって探索が続けられ、企業との連携を含めて今後のさらなる展開が期待できる状況である。

### 特許出願

- 「オートファジー誘導剤」(斉木) 出願番号 2017-226641、出願日 2017 年 11 月 27 日 (国内)
- 「オートファジー阻害剤」(水島) 特許権・PCT/JP2017/023683、出願日 2017 年 6 月 28 日 (外国)
- 「オートファジー誘導剤」(水島) 特許権・PCT/JP2017/019848、出願日 2017 年 5 月 29 日 (外国)
- 「パーキンソン病の重症度判定方法」(斉木) 出願番号 2016-210465、出願日 2016 年 10 月 27 日 (国内)
- 「化合物又はその塩、及びパーキンソン病治療薬又は予防薬」(斉木) 出願番号 2013-091903、出願日 2016 年 7 月 7 日 (国内)
- 「パーキンソン病診断指標」(斉木) 出願番号 2016-017794、出願日 2016 年 2 月 2 日 (国内)
- 「オートファジーの測定に好適な融合タンパク質、前記融合タンパク質をコードする核酸、及びそれらの利用」(水島) 特許権・PCT/JP2015/064568、出願日 2015 年 5 月 21 日 (外国)
- 「異常核酸分解誘導剤」(株田) 特許権・特願 2014-209340、出願日 2014 年 10 月 10 日 (国内)

### 領域内共同研究

領域内部では活発な共同研究が推進され、多くの成果を挙げた。実際に領域内共同研究として論文発表に至ったものは以下の通りである (合計 41 件)。

- 血管平滑筋におけるオートファジー欠損の形態学的評価 (綿田・小池) (*Autophagy* 2018)
- リポファジーを利用した受精卵における脂肪滴の役割の解明 (板倉・塚本) (*Development* 2018)
- 内耳機能におけるオートファジーの意義の解析 (藤本千里・水島) (*Cell Death Dis* 2017)
- 内皮細胞の A 群連鎖球菌に対するオートファジー減弱効果 (野田健司・吉森) (*PLoS Pathog* 2017)
- Rab2 によるオートファゴソームとリソソームの融合制御機構の解明 (福田・水島) (*eLife* 2017)
- ブルキンエ細胞死におけるオートファジー・リソソーム系の意義 (小池・小松) (*Am J Pathol* 2017)
- オートファジー内膜分解における ATG 結合系の意義 (水島・小池) (*Science* 2016)
- 新規オートファジーフラックスレポーターの開発 (水島・塚本) (*Mol Cell* 2016)
- 神経系特異的オートファジー回復マウスの解析 (水島・塚本・板倉) (*Dev Cell* 2016)
- 液胞酵素 Ape1 の選択的オートファジーの機構の解明 (野田展生・中戸川・鈴木) (*Cell Rep* 2016)
- UBA5 をコードする遺伝子変異と遺伝性発達障害 (小松・和栗) (*AJHG* 2016)
- 選択的基質 p62 による転写因子 Nrf2 活性化異常とがん代謝 (小松・和栗) (*Nat Commun* 2016)
- MTMR3 による m TORC1 不活性化とオートファジー誘導 (野田健司・吉森) (*FEBS Lett* 2016)
- オートファジータンパク質 Atg9a 内の輸送モチーフの発見 (野田健司・吉森) (*J Cell Sci* 2016)
- OATL1 のオートファゴソーム外膜への局在化機構の解明 (福田・和栗) (*Autophagy* 2016)
- リソソーム膜上亜鉛トランスポーターのリソソーム酸性化機構の検討 (斉木・小池) (*BBRC* 2016)
- リソソーム膜タンパク質 Atp13a2 の神経系特異的欠損マウス解析 (佐藤栄人・小池) (*Am J Pathol* 2016)
- マイトファジーにおける Drp1 非依存的ミトコンドリア分裂 (神吉・阪井・吉森) (*J Cell Biol* 2016)
- 非アルコール性脂肪性肝疾患における Rubicon の役割 (吉森・竹原) (*Hepatology* 2016)
- オートファジー誘導 Atg1 複合体の高次会合体形成機構の解明 (野田展生・山本) (*Dev Cell* 2015)
- オートファジー因子の構造解析への耐熱性酵母の応用 (野田展生・山本) (*J Biol Chem* 2015)
- p62 モニタリングマウスの開発と解析 (小松・和栗) (*J Cell Sci* 2015)
- Atg8 ホモログの脱脂質化反応に関する研究 (中戸川・岡本) (*EMBO J* 2015)

哺乳類オートファジー因子 Atg13-Atg101 の構造解析 (野田展生・水島) (*Nat Struct Mol Biol* 2015)  
心筋形成におけるミトコンドリア DNA の配置と分裂の意義 (石原・水島) (*Mol Cell Biol* 2015)  
出芽酵母 Atg3 の機能解析 (鈴木・中戸川) (*J Biol Chem* 2015、*FEBS Lett* 2015)  
神経変性疾患関連エンドソーム・リソソームタンパク質の動態に関する超微形態観察 (斉木・小池) (*FEBS Lett* 2015、*PLoS One* 2014)  
酵母 *Pichia pastoris* マイトファジー因子 Atg32 の発現制御機構 (神吉・阪井) (*J Cell Sci* 2014)  
細菌感染時のオートファジー装置のエンドソームへの召集機構 (中戸川・齊藤・野田健司・吉森) (*J Cell Biol* 2014)  
オートファジー誘導 Atg1 複合体形成機構の解析 (野田展生・山本) (*Nat Struct Mol Biol* 2014)  
受精卵のミトコンドリア品質管理におけるミトコンドリア分裂の意義 (石原・水島) (*Curr Biol* 2014)  
受精によって誘導されるオートファジーの制御機構の解析 (水島・塚本) (*Biol Reprod* 2014)  
ATG9A、ATG14 遺伝子欠損細胞の解析 (水島・齊藤) (*J Cell Sci* 2014)  
隔離膜形成における管状構造体の同定とその動態解析 (和栗・小松) (*Mol Cell Biol* 2014)  
プロテアソーム機能障害にตอบสนองしたオートファジーの動態解析 (小松・和栗) (*J Biol Chem* 2014)  
酵母オートファジー活性調節因子のスクリーニング (野田健司・吉森) (*Autophagy* 2014)  
Syntaxin17 によるミトコンドリア分裂の制御機構 (新崎・石原) (*Dev Cell* 2014)  
膵β細胞におけるヒト IAPP 発現とオートファジー不全による細胞障害機構の解明 (綿田・小池・吉森) (*J Clin Invest* 2014)  
選択的オートファジーに連動した転写因子 Nrf2 活性化機構 (小松・和栗・吉森) (*Mol Cell* 2013)

## 班会議・国際会議開催

第1回班会議 (平成25年12月): 参加者172名、口頭発表48題、ポスター55題  
第2回班会議 (平成26年11月): 参加者161名、口頭発表36題、若手発表18題、ポスター46題  
第3回班会議 (平成27年11月): 参加者179名、口頭発表39題、若手発表18題、ポスター60題  
第4回班会議 (平成28年11月): 参加者210名、口頭発表42題、若手発表22題、ポスター80題  
第5回班会議 (平成29年11月): 参加者111名、口頭発表29題  
第8回オートファジーに関する国際会議 (平成29年5月29日～6月1日): 参加者353名 (日本158名、海外195名)、講演44題、ポスター168題

※第1～4回班会議はオートファジー研究会と共催としてオープン形式とし、第2～4回班会議では若手の会も開催した。第5回班会議は同年に国際会議を開催したため、班会議のみとした。



2013年12月（於：掛川）



2015年11月（於：淡路島）



2016年11月（於：越後湯沢）  
大隅良典先生ノーベル生理学医学賞発表直後





The 8th International Symposium on Autophagy  
Nara Kasugano International Forum  
May 29 - Jun 1, 2017



2018年11月 (於：掛川)





## 総括班評価者による評価

### 岩井 一宏 京都大学・大学院医学研究科・教授

オートファジーは日本が世界をリードしてきた研究分野である。しかし近年、ユビキチンが選択的なオートファジーのシグナルとなることなどもあり、他分野から有力研究者が多数オートファジー研究に参入している。そのような状況下で本新学術領域は日本のオートファジー研究のセンターとして組織された。世界的に認知されている領域代表者の優れたリーダーシップのもとで、領域メンバーが有機的に連携して研究を推進し、オートファジーの分子メカニズム、生理、病的役割、臨床への展開、制御薬の開発などの計画したすべての研究項目で非常に優れた研究成果をあげ、大成功といえる領域研究であろう。以下に、本領域の特筆すべき点を2点挙げたい。まず、本領域の主催する国際会議である。外部評価委員である大隅博士のノーベル賞受賞の翌年に開催され、非常に多くの195名もの外国人研究者が参加した。研究発表はすべて高いレベルであったが、その中でも本領域の研究者の発表は出色であった。もう1点は、本領域が年1回開催する領域全体会議を領域だけには限定せず、日本の研究コミュニティに開放していた点である。その試みは大成功を収め、日本のオートファジー研究の底上げに大きく貢献した。今後の新学術領域研究のあり方に一石を投じたと思われる。

### 内山 安男 順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授

本研究では、1) オートファジーの分子機構と膜動態と2) 生理と病態の解明を目指した。計画班員は、ほぼ全員それぞれの目標を十分にこなし、多大な成果を収めた。研究の過程で、計画班員同士あるいは、公募班員との共同研究が進み、大きな成果を得ている点は注目に値する。計画・公募班員のみならず班員以外の研究者も参加した班会議・オートファジー研究会を毎年実施し、webの上でも研究論文の紹介を常に実施して、共同研究や底辺のレベル引き上げを考慮して運営に当たった点が高く評価される。具体的な成果として、オートファジーの始動から、成熟に至るまでの分子機構、特に、始動に関わる、Atg分子複合体、反応の場と成熟に必須な機構を明らかにした点は評価できる。さらに、オートファジーの選択性に関する分子機構でも様々な発見があった。また、オートファジーと神経疾患についても多くの発見があり、特に、オートファジーの破綻が神経細胞の溜まり病に重要な因子となり得ることがわかってきた点は、今後の研究の方向性を示唆するものと考えられる。選択的オートファジーと発がん機構、さらに、オートファジーと創薬スクリーニングの解析が進み、特許の申請も散見された点は、今後の発展のシードとなり得るものと考えられる。また、本研究の期間にノーベル生理学医学賞が大隅良典博士に贈られた点は、本研究に参加した全員の励みになったことも事実である。

### 大隅 良典 東京工業大学・科学技術創成研究院・栄誉教授

従来、様々な領域に分散して進められてきたオートファジー研究者を糾合した組織の構築をめざした新学術領域として、非常に大きな成果を挙げている。世界をリードする領域代表者をはじめとする計画班員は、それぞれ国際的にも高い評価を受ける優れた成果を挙げている。医療、健康などの分野への展開を意識的に取り組み、着実な成果が出つつある点も評価される。現在も広がりを見せる領域を反映して、計44件の公募研究には多様な研究者の参画が計られ、今後の新しい展開を予感させる新しい研究が多数ある点でもこの領域の更なる展開が期待される。世界的な規模で拡大するオートファジー研究の中にあって、多数の優れた論文発表がなされ、数やインパクトファクターなどでは計れない研究の質の高さを堅持し、国際的な高い評価が継続されている。一方で中国を始め、諸外国でのオートファジー研究の急速な展開を考えると、数少ない国際的にリードする本領域をさらに発展させるためには、新しい研究手法の導入、共同研究を進展させるための新たなシステム作りなど更なる戦略を工夫することが望まれる。

領域代表者のリーダーシップの下、運営面での工夫がなされた。班会議をオープンにしたことで、多数の若手研究者の参加が可能となった点、班会議と連動した若手の会も大学院生、ポスドクの交流に有効であったと評価できる。

## 大野 博司 理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

オートファジーは基本的細胞機能として重要であるばかりでなく、多細胞生物では初期発生や、感染・炎症・細胞変性疾患の制御など、多様な生命機能に関与することが知られている。本邦におけるオートファジー研究は、一昨年のノーベル賞受賞に端的に表される大隅良典博士の先駆的研究や、それに続く本領域代表の水島博士や計画研究代表の吉森博士等を中心とした世界トップクラスの研究により、世界を牽引する希少かつ重要な研究分野のひとつである。本領域では、このように世界的に活躍する研究者らによる計画研究に加え、公募研究により新たな研究の裾野を着実に広げ、領域会議や国際シンポジウムによる情報交換や領域内での活発な共同研究などにより、世界的先進性・優位性を維持し、世界における本邦のオートファジー研究の地盤をさらに確固たるものにした。

国際誌論文発表も年間 80～90 報から最終平成 29 年度には 134 報を数え、その成果はテレビに延べ 20 回、新聞には延べ 195 回も取り上げられるなど、社会的な注目度も非常に高かった。また、一般向けの講演会や小・中・高向け授業などを数十回ずつ行うなど、特に理科離れが危惧される児童・生徒に向けての啓蒙を積極的に行ったことは高く評価できる。本領域の高い評価の客観的指標として、期間中に賞等受賞者を多数輩出すると共に、教授への昇進 2 名、特任から常勤准教授への異動、講師や助教への着任など、多くのキャリアアップを輩出した。このように、当新学術領域は極めて順調に研究を推進したと評価する。

## 木南 英紀 順天堂大学・学長特別補佐、医学部 名誉教授

本領域研究は、オートファジーのメカニズムの全容解明とヒト疾患との関連解明という基本的かつ重要な課題を正面から取り組み、公表された論文の質、量からみて予想以上の成果を挙げたと言える。代表者のリーダーシップの下、構造生物学から臨床医学までを含めた本邦のオートファジー研究のトップランナーと次代を支える若手研究者が結集し、様々な視点・切り口、研究手法からアプローチする集学的研究体制が構築された。その上で領域内の共同研究、WEB を活用した情報や研究資料の共有化が進められ、班員間の実質的な連携が進んだ結果、領域の研究が大きく進展・深化したと考える。具体的には、オートファゴソーム膜の形成と成熟という基本命題、選択的オートファジーの機構と生理的意義、さらに神経変性疾患、がん、感染症などのヒトの疾患におけるオートファジーの意義の解明やオートファジーの制御化合物の開発について着実に、一部思わぬ進展がみられた。本領域研究期間中の平成 28 年に、オートファジーに必須な遺伝子群の同定とオートファジーの分子メカニズム解明への道筋を開いた大隅良典博士にノーベル生理学・医学賞が授与された。国際的なオートファジー研究のイニシアティブを牽引する組織である本領域研究にとっても大きな喜び、誇りとなった。日本発のオートファジー研究を今後も日本が牽引していくことを期待したい。その研究の流れの中で、本領域研究は極めて大きな役割を果たした。

## 田中 啓二 東京都医学総合研究所・理事長

オートファジー研究は、近年、基盤となる遺伝子群が発見されたことを契機に未曾有の発展を遂げてきた。これまで我が国の研究が世界を牽引してきたが、最近、欧米や中国の研究者たちから猛追をうけており、我が国の優位性が脅かされる事態になってきた。実際、オートファジー研究は、黎明期から成熟期・円熟期に入り、世界との抜き差しならない競争が展開されている。このような状況で、我が国独自の幅広いグループ研究として「新学術研究」が組織されたことは、時宣にかなった選択だった。この間、オートファジー研究の基盤である膜の動態研究では、その形成機構やオートファゴソームがリソソームと融合後、二重膜の内膜のみが消化される機構の解明など傑出した成果が随所に見られた。最近、選択的オートファジー経路が相次いで発見され、オートファジー研究の拡大に拍車をかけた。そして本研究期間に、タンパク質やオルガネラ（リソソーム、小胞体、核）などを選択的に分解するオートファジーの仲介因子が続々と見出された。またオートファジーの生理学・病理学研究においては、パーキンソン病などの神経変性疾患やガン、そして細菌感染などの領域でも独自性の高い研究が活発に遂行された。このように本新学術研究は、多様な課題に対して世界を先導する様々な成果を挙げてきたと同時に、人材育成にも成功し、オートファジー研究領域の推進に大きな貢献を果たしてきたと総括できる。しかしオートファジーは未解明な課題も山積しており、今後、さらなる研究の進捗を期待したい。



## 中間評価

### A + (研究領域の設定目的に照らして、期待以上の進展が認められる)

#### 総合所見

オートファジーの分子機構と生理機能における未解決の重要課題の解明という観点から、詳細な分子機構の解明が進んでおり、領域全体として研究は順調である。期待以上の成果も見られ、領域内連携にも積極的に取り組んでいる。後半についても波及の拡大と機構解明の深化が計画されており、さらなる進展が期待できる。

#### 評価に当たっての着目点ごとの所見

##### (1) 研究の進展状況

当初の研究領域の設定目的のほとんどにおいて研究が進捗している。オートファジーに関わる分子群の構造的解析を中心に、選択的オートファジーの新知見なども含めて、期待以上に成果が現れている。分子機能と病態の関係及び臨床的視点の補完についても、公募研究の選定や計画研究との連携を通して対策を講じており、研究成果を上げている。当初の目的の1つであるオートファジーの制御化合物の開発についてはスクリーニング探索中であり、今後の進展を期待する。

##### (2) 研究成果

研究成果を着実に上げて一流学術誌に公表し、世界のオートファジー研究を牽引しており高く評価できる。アウトリーチ活動や新聞などへの公表活動も活発に行われており、後半でますますの成果を期待したい。

##### (3) 研究組織

計画研究代表者同士、公募研究—計画研究の連携、基礎と臨床とのつながり、すべての点で積極的に取り組まれており、すでに発表に至った研究領域内共同研究だけでなく、現在進行中で未発表の共同研究についても数多く推進している。公募研究の採択課題についても多様性が担保されている。研究領域内の会議やホームページを介したウェブサイトの開設を通して、若手研究者の育成や研究交流についても多くの機会を設けている。

##### (4) 研究費の使用

先端的なイメージング装置を積極的に導入するなど有効に使われており、特に問題となる点は見受けられない。

##### (5) 今後の研究領域の推進方策

予想を超える進展のあったオートファジー関連分子の複合体に関する全体構造の追究や、ノックアウトマウスを用いたヒト疾患モデルの作製、新規物質スクリーニング、新学術領域研究「ユビキチンバイオロジー」との連携、公募研究で今後カバーすべき研究分野に対する推進方策など適切に考慮されており、今後の成果が期待される。さらに後半で、新しい切り口により、新たなオートファジー研究の流れが出るのを期待したい。

##### (6) 各計画研究の継続に係る経費の適切性

適切であると思われ、特に問題点はなかった。



## 事後評価

### A+（研究領域の設定目的に照らして、期待以上の成果があった）

#### 審査部会における所見

本研究領域はオートファジーの分子機構と生理・病態生理学的意義の解明を目指し、オートファジーの誘導・形成に関わる詳細な分子機構解明、リソゾームの新たな機能の発見、関連タンパク質の分子構造理解など広範囲に重要な成果を上げている。特に医学領域では、動物モデルとヒト疾患を結びつける成果を上げ、オートファジー制御化合物の発見や特許取得などは、臨床への応用を期待させるものであり、その波及効果は十分である。これら世界に冠たる実績を上げたことから、期待以上の成果があったと評価できる。

これらは個々のメンバーの努力もさることながら、領域代表者を中心とした計画研究代表者の科学的実力と牽引力に負うところが大きい。また、基礎、医学領域にまたがる計画研究と公募研究、計画研究同士の積極的な共同研究も大きな成果に結びついた一因と考えられる。さらに、実験手法のプロトコル化、国際会議の開催など成果の公表についても十分な努力がなされていることや、「若手の会」の開催を通じて積極的に若手研究者を鼓舞し続けたことも評価に値する。

このように、本研究領域の成果は非常に高いものであり、研究領域発足時と比べてオートファジー研究は成熟段階に入ったようにみえる。今後、オートファジー研究としてどのような新しい分野を切り開くことができるかが大きな課題となるであろう。今後のより一層の発展が期待される。



## 各研究課題の成果

### 計画研究 A01

酵母・無細胞系を用いたオートファジー関連因子の分子機能の解明 .....	20
代表者 中戸川 仁 東京工業大学・生命理工学院・准教授	
オートファジーを担う Atg タンパク質群の構造基盤 .....	22
代表者 野田 展生 微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長	
オートファジーの膜動態：分子機構と疾患との関わり .....	24
代表者 吉森 保 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	

### 計画研究 A02

オートファジー選択的基質による細胞制御とその病態生理 .....	26
代表者 小松 雅明 新潟大学・医歯学系・教授 (現：順天堂大学・大学院医学研究科・教授)	
パーキンソン病病態解析に基づくオートファジー調節化合物の開発 .....	28
代表者 斉木 臣二 順天堂大学・大学院医学研究科・准教授	
オートファジーの生理・病態生理学的意義とその分子基盤 .....	30
代表者 水島 昇 東京大学・大学院医学系研究科・教授	

### 公募研究 A01 (平成 26 ~ 27 年度)

オートファジーが関与する小胞体品質管理機構の解明 .....	32
代表者 潮田 亮 京都産業大学・総合生命科学部・研究助教	
選択的オルガネラ・オートファジーの分子機構 .....	33
代表者 岡本 浩二 大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授	
新規オートファジーシステムの分子機序及び病態との関連 .....	34
代表者 株田 智弘 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長	
植物ペルオキシソームの品質管理におけるオートファジー制御機構の解明 .....	35
代表者 後藤 (山田) 志野 京都大学・大学院理学研究科・研究員 (現：Jagiellonian University・MCB・Project leader)	
Atg 分子群による脂質・オルガネラ動態制御の新しい分子機構 .....	36
代表者 阪井 康能 京都大学・大学院農学研究科・教授	
線虫初期胚で誘導される選択的オートファジーの分子機構と生理機能 .....	37
代表者 佐藤 美由紀 群馬大学・生体調節研究所・准教授	
オートファゴソーム膜コンポーネントの網羅的同定 .....	38
代表者 鈴木 邦律 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授	
オートファジー活性のファインチューニング機構の研究 .....	39
代表者 野田 健司 大阪大学・大学院歯学研究科・教授	
膜輸送を介したオートファジー誘導のシグナル制御機構の統合的解析 .....	40
代表者 福田 光則 東北大学・大学院生命科学研究科・教授	
オートファジー膜形成における燐脂質動態の研究 .....	41
代表者 藤本 豊土 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授	
オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析 .....	42
代表者 山本 林 東京大学・大学院医学系研究科・講師	

## 公募研究 A02 (平成 26 ~ 27 年度)

レジオネラ菌による Syntxin17 分解機構とその生理的意義の解明.....	43
代表者 新崎 恒平 東京薬科大学・生命科学部・講師 (現：東京薬科大学・生命科学部・准教授)	
ミトコンドリア品質管理における融合・分裂の役割の再検討.....	44
代表者 石原 直忠 久留米大学・分子生命科学研究所・教授 (現：大阪大学・大学院理学研究科・教授)	
オートファジー不全を伴う慢性膵炎発症メカニズムの解明.....	45
代表者 大村谷 昌樹 熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授 (現：兵庫医科大学・医学部・教授)	
神経細胞内の異常なリソソームとオートファゴソームの関わりについての遺伝学的研究.....	46
代表者 小池 正人 順天堂大学・大学院医学研究科・教授	
オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御.....	47
代表者 齊藤 達哉 徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授 (現：大阪大学・大学院薬学研究科・教授)	
腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるオートファジーの解析.....	48
代表者 津久井 久美子 国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官	
オートファジーの内耳生理機能および加齢性内耳障害への関与.....	49
代表者 藤本 千里 東京大学・大学院医学系研究科・助教 (現：東京通信病院・耳鼻咽喉科・医長)	
オートファジー関連神経変性疾患の治療法開発に向けた iPS 細胞の樹立と病態解明.....	50
代表者 村松 一洋 群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (現：自治医科大学・小児科・准教授)	
ショウジョウバエモデルによるクローン病発症の分子機構解明.....	51
代表者 矢野 環 東北大学・大学院薬学研究科・准教授	
膵β細胞オートファジー不全と p62 陽性の封入体形成.....	52
代表者 綿田 裕孝 順天堂大学・大学院医学研究科・教授	

## 公募研究 A01 (平成 28 ~ 29 年度)

Crinophagy による分泌顆粒膜融合経路のメカニズム解析.....	53
代表者 板倉 英祐 千葉大学・大学院理学研究院・助教	
マイトファジー誘導時に駆動されるミトコンドリア分裂の分子基盤.....	54
代表者 岡本 浩二 大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授	
非小胞輸送型オートファジーの分子メカニズム.....	55
代表者 株田 智弘 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長	
マイクロオルガネロファジーの分子機構.....	56
代表者 阪井 康能 京都大学・大学院農学研究科・教授	
父性オルガネラオートファジーの選択性を制御する新規アダプターの解析.....	57
代表者 佐藤 美由紀 群馬大学・生体調節研究所・准教授	
隔離膜伸展におけるユビキチン様修飾システムの役割.....	58
代表者 鈴木 邦律 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授	
オートファジー終結因子 Tag1 の作動機序の探求.....	59
代表者 野田 健司 大阪大学・大学院歯学研究科・教授	
栄養条件に依存してオートファゴソームの成熟過程を制御する Rab の統合的機能解析.....	60
代表者 福田 光則 東北大学・大学院生命科学研究所・教授	
マイクロオートファジーによるマウス胚着床前後の発生制御.....	61
代表者 和田 洋 大阪大学・産業科学研究所・准教授	

## 公募研究 A02 (平成 28 ~ 29 年度)

病原菌感染や結合タンパク質を介した <b>Syntaxin 17</b> の生理機能の解明 .....	62
代表者 新崎 恒平 東京薬科大学・生命科学部・講師 (現：東京薬科大学・生命科学部・准教授)	
病変型 <b>mtDNA</b> の選別・浄化におけるマイトファジー関連膜動態の役割 .....	63
代表者 石原 直忠 久留米大学・分子生命科学研究所・教授 (現：大阪大学・大学院理学研究科・教授)	
<b>Parkin</b> 非依存的ミトコンドリアオートファジーの研究 .....	64
代表者 神吉 智文 新潟大学・医歯学系・教授	
イネの生殖・免疫・代謝制御におけるオートファジーの役割の統合的理解 .....	65
代表者 朽津 和幸 東京理科大学・理工学部・教授	
白血病幹細胞の維持におけるオートファジーの機能的役割の解明 .....	66
代表者 黒川 峰夫 東京大学・大学院医学系研究科・教授	
オートファジー破綻がもたらす病態の <b>Nrf2</b> を標的とした治療戦略 .....	67
代表者 田口 恵子 東北大学・大学院医学系研究科・講師	
肝細胞と脂肪細胞における <b>Rubicon</b> を介した脂肪代謝の制御 .....	68
代表者 竹原 徹郎 大阪大学・大学院医学系研究科・教授	
腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるオートファジー遺伝子 <b>Atg8</b> の機能解明 .....	69
代表者 津久井 久美子 国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官	
<b>Mitophagy</b> における直鎖状ユビキチン鎖の寄与 .....	70
代表者 徳永 文稔 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授	
幹細胞発生・分化におけるオートファジーチェックポイント機構 .....	71
代表者 平尾 敦 金沢大学・がん進展制御研究所・教授	
液胞/リソソームにおける核酸分解過程の生理生化学的解析 .....	72
代表者 堀江(川俣) 朋子 東京工業大学・科学技術創成研究院・助教	
疾患 <b>IPS</b> 細胞によるオートファジー関連神経変性疾患の病態解明と治療法開発 .....	73
代表者 村松 一洋 自治医科大学・小児科・准教授	
選択的オートファジーにおける新規アダプター分子の検索 .....	74
代表者 森田 英嗣 弘前大学・農学生命科学部・准教授	
平滑筋オートファジー不全に基づく血管不全病態の解明 .....	75
代表者 綿田 裕孝 順天堂大学・大学院医学研究科・教授	

計画研究 A01  
A02

公募研究 A01  
A02

# 酵母・無細胞系を用いたオートファジー関連因子の分子機能の解明

代表者 中戸川 仁

東京工業大学・生命理工学院・准教授



## 研究目的

オートファジーの分解対象は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜胞内に隔離され、リソソーム/液胞に輸送され、分解される。これまでの研究により、Atg タンパク質群を中心に、オートファゴソームの形成に必要な因子が同定された。しかし、これらの分子機能や細胞内動態には未解明の問題が多く残されていた。また、オートファゴソーム形成における膜動態についても、膜の前駆体や供給源といった基本的な問題が明らかとなっていなかった。一方で近年、いくつかのタンパク質や細胞小器官がオートファジーによって選択的に分解されることが明らかとなりつつあったが、そのメカニズムにも不明な点が残されており、オートファジーによって選択的に分解される細胞成分の全体像の把握も重要な課題となっていた。

そこで、本研究では、分子機構の解明に優れたモデル生物である出芽酵母と、分子機能を明確かつ詳細に調べることができる無細胞系（精製タンパク質や人工膜を用いた試験管内解析系）を用いて、オートファゴソームの形成機構および選択的オートファジーに関する上記の問題を解決することを目的とした。

## 研究成果

### (1) Cvt 経路とペキソファジーの制御機構の解明：

Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路は、いくつかの液胞内酵素（Ape1 や Ams1 など）をオートファゴソームに積み込み、細胞質から液胞内へ輸送する選択的オートファジー関連経路であり、これらの酵素を認識するレセプターとして Atg19 と Atg34 が機能する。ペキソファジーは、ペルオキシソームの選択的オートファジーであり、Atg36 をレセプターとする。本研究では、これら 3 つのレセプターをリン酸化するキナーゼとして Hrr25（カゼインキナーゼ 1δ）を同定した。リン酸化により各レセプターと Atg11 との相互作用が増強され、Atg11 によりオートファゴソーム形成を媒介する Atg タンパク質群が隔離対象上にリクルートされることを明らかにした。

さらに、Hrr25 が Atg36 をリン酸化するためには、Atg36 がペルオキシソームタンパク質である Pex3 と結合することが重要であることを見いだした。また、無細胞系を用いて、Pex3 には直接 Hrr25 による Atg36 のリン酸化を促進する機能があることを明らかにした。このような制御機構は、Atg36 がペルオキシソームに正しく局在化したときのみ、オートファジーによるペルオキシソーム分解を誘導するために獲得されたものと考えられる。

### (2) 核と小胞体の選択的オートファジーの発見：

核および小胞体の断片がオートファジーで選択的に分解されることを世界で初めて明らかにし、それぞれに必要なレセプタータンパク質として Atg39 および Atg40 を同定した（図 1）。核および小胞体の分解は窒素源飢餓条件下で誘導される。核の分解は窒素飢餓時の酵母の生存に重要であることを示した。Atg40 は哺乳類における小胞体の選択的オートファジーのレセプターである FAM134B の機能的ホモログであることが示唆された。

さらに、Atg40 がレディキュロンと呼ばれる小胞体の形態形成に必要なタンパク質と似た構造を持っており、実際に小胞体膜上で高い膜曲率を生み出す（膜を曲げる）機能があることを明らかにした。また、複数の Atg40 が Atg8 との結合を介して小胞体上で会合することを発見した。以上の結果から、Atg40 は、隔離膜上の Atg8 との結合を介して隔離膜と接する小胞体領域に濃縮され、これにより小胞体が折り曲げられ、切断されてオートファゴソームに積み込まれるというモデルを提唱した。

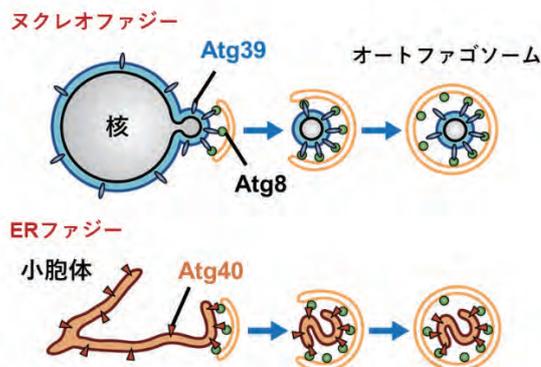


図 1

### (3) 核膜孔複体の選択的オートファジーの発見：

Atg8 と結合する因子として核膜孔複合体を同定し、同複合体がオートファジーで選択的に分解されること、またそのメカニズムを明らかにした。

### (4) 隔離膜前駆体の発見と形成機構の解明：

オートファゴソームは隔離膜と呼ばれるカップ状の膜が伸張して形成される。隔離膜がどのようにして形成されるのかについては不明であった。本研究により、ゴルジ体から形成される Atg9 を含む膜小胞が、pre-autophagosomal structure (PAS) に局在化した後、他の Atg タンパク質に依存して互いに融合し、隔離膜の前駆体を形成することを明

らかにした。またこの融合反応に関わると考えられる Atg9 小胞上の SNARE タンパク質を複数同定した。

#### (5) オートファゴソーム形成における膜供給源の解明：

オートファゴソーム膜の由来については様々なオルガネラが提唱されてきたが、明快なデータに基づくモデルはこれまでになかった。本研究では、小胞体から形成される COPII 小胞の積荷膜タンパク質 Axl2 を小胞体に過剰に蓄積させ、COPII 小胞に高濃度に積み込むシステムを利用して、Axl2 が COPII 小胞を経由して隔離膜およびオートファゴソーム膜に局在化することを免疫電子顕微鏡解析により明らかにした。すなわち、COPII 小胞がオートファゴソーム形成における膜供給源の 1 つであることを示した。

#### (6) Atg2 の分子機能の解明：

Atg2 は、オートファゴソームの形成に必須であり、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) 結合タンパク質である Atg18 と複合体を形成するが、その機能は未知であった。本研究では、Atg2 の N、C 両末端にオートファゴソーム形成に重要な領域を特定し、これら領域はどちらも高曲率の膜に結合することを示した。さらに、C 末端領域での膜結合は、Atg18 の PI3P への結合に重要であり、従って Atg2-Atg18 複合体の PAS への局在化に重要であることを明らかにした。一方、N 末端領域は、隔離膜の伸張に重要であることを示した。さらに、この機能は小胞体との結合を介して発揮されることを示唆する結果を得た。以上の結果およびこれまでの報告に基づき、Atg2 は 2 つの膜結合領域を用いて、PAS および隔離膜の伸張端を小胞体に繫留することで、小胞体からの膜供給を媒介するとのモデルを提唱した (図 2)。



図 2

#### (7) Atg16 複合体のオートファゴソーム形成場への局在化機構の解明：

Atg12-Atg5-Atg16 複合体 (以下、Atg16 複合体) は、ユビキチン様タンパク質 Atg8 のホスファチジルエタノールアミンへの結合を触媒する E3 酵素である。Atg5 の免疫沈降産物の質量分析の結果、オートファゴソームの形成を始動する Atg1 キナーゼ複合体が検出された。これら複合体間の相互作用は Atg12 の N 末端領域を介すること、Atg16 複合体の PAS への局在化に重要であることを明らかにした。この局在化機構と既知の PI3P 依存的な局在化機構の両者を同時に欠損させると、Atg16 複合体の PAS への局在化および Atg8 の脂質化は全く起こらなくなり、オートファジーは完全に停止した。以上の結果から、Atg16 複合体は、2 つの異なる経路を介して PAS に局在化することが明らかとなっ

た。さらに、新規経路を介してリクルートされる Atg16 複合体には、“Atg1 複合体による PAS の足場形成の促進” という新たな役割もあることを明らかにした。

#### 主な発表論文

1. Kotani T, Kirisako H, Koizumi M, Ohsumi Y, [\\*Nakatogawa H](#). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:10363-10368 (2018).
2. Yamasaki A, Watanabe Y, Adachi W, Suzuki K, Matoba K, Kirisako H, Kumeta H, [Nakatogawa H](#), Ohsumi Y, Inagaki F, [\\*Noda NN](#). Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* 16:19-27 (2016).
3. Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, [Nakatogawa H](#), Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, [\\*Okamoto K](#). Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.* 34:2703-2719 (2015).
4. Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, [\\*Nakatogawa H](#). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* 522, 359-362 (2015).
5. Sakoh-Nakatogawa M, Kirisako H, [\\*Nakatogawa H](#), [\\*Ohsumi Y](#). Localization of Atg3 to autophagy-related membranes and its enhancement by the Atg8-family interacting motif to promote expansion of the membranes. *FEBS Lett.* 589:744-749 (2015).
6. [\\*Knorr RL](#), [Nakatogawa H](#), Ohsumi Y, Lipowsky R, Baumgart T, [\\*Dimova R](#). Membrane morphology is actively transformed by covalent binding of the protein Atg8 to PE-lipids. *PLoS One* 9:e115357 (2014).
7. Mochida, K, Ohsumi Y, [\\*Nakatogawa H](#). Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of  $\alpha$ -mannosidase under nitrogen starvation conditions. *FEBS Lett.* 588: 3862-3869 (2014).
8. Tanaka C, Tan LJ, Mochida K, Kirisako H, Koizumi M, Asai E, Sakoh-Nakatogawa M, Ohsumi Y, [\\*Nakatogawa H](#). Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J. Cell Biol.* 207:91-105 (2014).
9. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, [Nakatogawa H](#), Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, [\\*Noda T](#), [\\*Yoshimori T](#). Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* 203:115-128 (2013).

#### 主な学会発表

1. [Nakatogawa H](#). "Revealing the mechanisms of nucleophagy and ER-phagy using the yeast model system" The KSBMB International Conference. 2017.
2. [Nakatogawa H](#). "Mechanisms of membrane nucleation and expansion during autophagosome formation" The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.
3. [Nakatogawa H](#). "Molecular mechanisms of ER-phagy and nucleophagy in yeast" Gordon Research Conference. 2016.



# オートファジーを担う Atgタンパク質群の 構造基盤

代表者 野田 展生

微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長



## 研究目的

オートファジーは飢餓により誘導される、真核細胞に保存された基本的な細胞内分解システムである。高等生物ではオートファジーは様々な生理的機能を担い、その異常は神経変性疾患等の重篤な疾病を引き起こす。酵母をモデル生物としたこれまでの研究で、オートファジーに必須な Atg タンパク質群が 30 以上同定されてきた。そして Atg 結合系に関わる 8 つの Atg 因子について立体構造が明らかとなってきた。しかしオートファゴソーム形成に関わる主要 Atg 因子群や選択的基質認識に関わるアダプター因子群に関する構造情報は決定的に不足しており、オートファゴソーム形成や選択的基質認識の分子機構の理解は遅れている。さらに Atg 因子の哺乳類と酵母の間の構造的差異に関する研究もほとんどされておらず、高等生物固有のオートファジー制御機構の理解が遅れている。

本研究課題では、酵母の主要 Atg 因子群、様々な選択的基質認識に関わるアダプター因子群、そして哺乳類オートファジーを制御する因子群の構造解析を行い、オートファゴソーム形成機構や選択的基質認識機構など、オートファジーの未解決課題解明に向けて構造基盤を確立することを目指した。

## 研究成果

### (1) 出芽酵母 Atg1 複合体の構造とオートファジー始動機構:

オートファジーは飢餓で強く誘導される。出芽酵母では飢餓依存的に Atg13 が脱リン酸化し、Atg1、Atg17 などと Atg1 複合体を形成し、オートファジーの始動に働く。Atg13 の天然変性領域内に Atg1 結合領域および Atg17 結合領域を同定し、小型化した Atg1-Atg13 複合体および Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体の結晶構造を決定した。その結果、Atg1 は MIT ドメインを持ち、Atg13 は MIT 相互作用モチーフ (MIM) を用いてそれに結合すること、一方 Atg13 は短い Atg17 結合領域 (17BR) で Atg17 の疎水性ポケットに結合することが明らかとなった。さらに飢餓依存的に脱リン酸化を受ける Atg13 の残基を LC-MS/MS により網羅的に同定し、MIM および 17BR のリン酸化が Atg1 および Atg17 との相互作用を負に制御していることを明らかにした。飢餓時に酵母内では Atg1 複合体は数十コピー集積することが知られている。Atg13 のさらなる機能解析を進めた結果、天然変性領域内に第二の Atg17 結合領域 (17LR) を持つことがわかり、その結合構造を決定した。構造情報に基づいた機能解析の結果、Atg13 の 17BR と 17LR は互いに独立に Atg17 に結合できるにも関わらず両方ともオートファジーに必須であること、その一方で両者は同時には同一の Atg17 に結合できないことが明らかと

なった。さらなる機能解析の結果、Atg13 はニヶ所の結合領域を異なる 2 分子の Atg17 に結合させること、その結果 Atg13 はひも状の構造を用いて Atg17 分子同士を繋ぎとめ、Atg1 複合体の高次会合体形成を引き起こすことで、オートファゴソーム形成の場である PAS の構築に働くことを明らかにした (図 1)。以上の結果から、栄養飢餓によって Atg13 が脱リン酸化し、それが PAS の構築を引き起こすことでオートファジーが始動するモデルが考えられた。

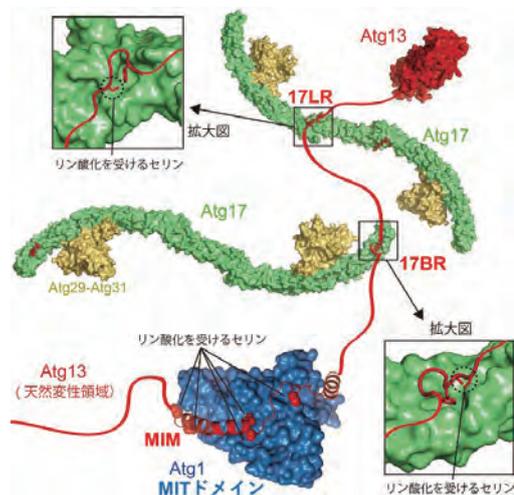


図 1

### (2) 高等生物のオートファジー始動を制御する Atg101 の構造機能解析:

計画研究の水島グループと共同で、オートファジー始動複合体サブユニットの Atg101-Atg13 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。その結果、Atg101 は HORMA ドメイン構造を持ち、Atg13 が持つ HORMA ドメインと HORMA-HORMA ヘテロ二量体を形成することが明らかとなった。興味深いことに Atg101 を保存する種では Atg13 の HORMA ドメインは不安定な構造を取ることが明らかとなった。Atg101 が結合することでそれが安定化されることが明らかとなった。また Atg101 は外に突き出した特徴的なループである WF フィンガーをもち、それをを用いて下流の Atg 因子のオートファゴソーム形成場への集積に重要な働きを担うことを明らかにした。

### (3) 高等生物における Atg8 ホモログ間の構造の差異と機能分担との関連の解明:

Atg8 はオートファジーにおける中心的な制御因子であり、高等生物では複数ホモログが存在することが知られてい

る。線虫の Atg8 ホモログ LGG-1、LGG-2 の結晶構造を多様な結合相手との複合体状態で決定し、これまでに報告された哺乳類ホモログとの構造比較を行った結果、LGG-1 および哺乳類 GABARAP ファミリーはクローズ型、LGG-2 および哺乳類 LC3 ファミリーはオープン型の N 末端構造を取ることが明らかとなった。詳細な機能解析の結果、クローズ型構造は膜の融合活性に必要であることが示唆された。また 2 つのファミリー間でターゲットの特異性に違いがあることも明らかとなり、高等生物における Atg8 ファミリーの機能分担解明のための構造基盤の確立に成功した。

#### (4) 酵母における Ape1 の選択的オートファジーの構造基盤:

出芽酵母におけるオートファジーの選択的積荷である Ape1 について、単独あるいはアダプター蛋白質である Atg19 との複合体として結晶構造を決定した。その結果、Ape1 はホモ 12 量体からなる正四面体構造を取り、12 本のプロペプチドを外に提示していること、プロペプチドはホモ三量体コイルドコイル構造を取ること、その結果 Ape1 はホモ 12 量体同士がプロペプチドでつながれ、凝集体を形成することが明らかとなった。興味深いことに、アダプター Atg19 のコイルドコイルはプロペプチドと 2:1 のヘテロ三量体コイルドコイル構造を取り、それはプロペプチドのホモ三量体構造と酷似していた。その結果 Atg19 の結合はプロペプチドの自己会合と競合し、Ape1 凝集体のサイズを適度に調節することが明らかとなった。酵母内での Atg19 の局在を調べた結果、Atg19 は Ape1 凝集体の表面選択的な結合を示した。以上の結果から、Ape1 凝集体の表面に結合した Atg19 が凝集体サイズの制御をするとともに、隔離膜上の Atg8-PE と結合することで、隔離膜が Ape1 凝集体表面に沿って伸長するモデルが考えられた (図 2)。

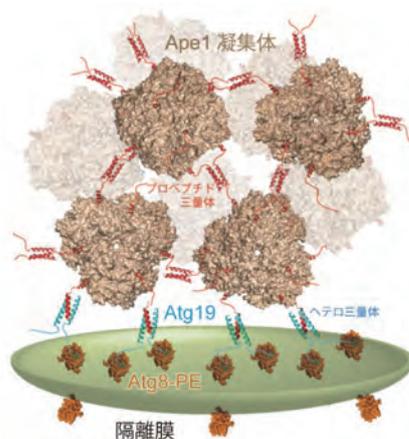


図 2

#### 主な発表論文

1. Yamaguchi M, Satoo K, Suzuki H, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F, \*Noda NN. Atg7 activates an autophagy-essential ubiquitin-like protein Atg8 through multi-step recognition. *J. Mol. Biol.* 430: 249-257 (2018).
2. Suzuki H, \*Noda NN. Biophysical characterization of Atg11, a scaffold protein essential for selective autophagy in yeast. *FEBS Open Bio* 8: 110-116 (2017).
3. Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, \*Noda NN. Structural biology of the core autophagy machinery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 43: 10-17 (2017).
4. Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, \*Noda NN, \*Ohsumi Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular

assembly of autophagy initiation complexes. *Dev. Cell* 38: 86-99 (2016).

5. Yamasaki A, Watanabe Y, Adachi W, Suzuki K, Matoba K, Kirisako H, Kumeta H, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F, \*Noda NN. Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* 16: 19-27 (2016).
6. \*Noda NN, \*Mizushima N. Atg101: not just an accessory subunit in the autophagy-initiation complex. *Cell Struct. Funct.* 41: 13-20 (2016).
7. Wu F, Watanabe Y, Guo XY, Qi X, Wang P, Zhao HY, Wang Z, Fujioka Y, Zhang H, Ren JQ, Fang TC, Shen YX, Feng W, Hu JJ, \*Noda NN, \*Zhang H. Structural basis of the differential function of the two *C. elegans* Atg8 homologs, LGG-1 and LGG-2, in autophagy. *Mol. Cell* 60: 914-929 (2015).
8. Yamamoto H, Shima T, Yamaguchi M, Mochizuki Y, Hoshida H, Kakuta S, Kondo-Kakuta C, \*Noda NN, Inagaki F, Itoh T, Akada R, \*Ohsumi Y. The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy. *J. Biol. Chem.* 290: 29506-29518 (2015).
9. Suzuki H, Kaizuka T, \*Mizushima N, \*Noda NN. Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in mammalian autophagy initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22: 572-580 (2015).
10. \*Noda NN, \*Inagaki F. Mechanisms of autophagy. *Annu. Rev. Biophys.* 44: 101-122 (2015).
11. Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, \*Ohsumi Y, \*Noda NN. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21: 513-521 (2014).

#### 主な学会発表

1. Noda NN. "Molecular mechanisms of initial steps of autophagy" 24th IUBMB Congress. 2018.
2. Noda NN. "Identification of helical AIMs as a novel type of Atg8-interacting motif" The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.
3. Noda NN. "Structural insights into ubiquitin-like modifications essential for autophagy" 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. 2014.

# オートファジーの膜動態： 分子機構と疾患との関わり

代表者 吉森 保

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



## 研究目的

1950年代には既に観察されていたオートファジーであるが、その分子機構の解明の進展は1993年の大隅良典博士による酵母オートファジーに必須の遺伝子群 ATG の同定を待たねばならなかった。このブレイクスルー以降オートファジーの分子メカニズムが次第に明らかになり、またその生理的病理的意義が示されるようになった。当初年間数十報だった関連論文も今や五千報を超える。しかし、細胞内の他の膜動態と比べても極めてユニークなオートファジーの分子機構は複雑であり、まだ全貌の1~2割が明らかになったに過ぎない。一方、オートファジーが広範な病態を抑制していることが次々と報告されてきたが、その詳細は不明でありオートファジーを標的とした治療戦略を考えるためには、オートファジーによる病態抑制の機序を知る必要がある。

本研究では、この特異な膜動態により遂行されるオートファジーについて、その分子機構の解明を進めると同時にオートファジーの膜動態と病態の関わりを明らかにすることを旨とした。材料は主として哺乳類培養細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡等によるイメージング、生化学、分子生物学、細胞生物学の最先端手法を多角的に組み合わせ課題にアプローチした。

## 研究成果

リン脂質脱リン酸化酵素の INPP5E が、リソソームにおけるアクチン重合を介してオートファゴソームとリソソームの融合を促進することを示した(図1)。具体的には、INPP5E がリソソームの膜の PI(3,5)P<sub>2</sub> を PI3P に変換することによってアクチン重合に働くタンパク質 cortactin をリソソーム上に安定化する。その結果形成されるアクチン線維がオートファゴソーム-リソソーム融合を促進する。この成果は、不明の部分が多かったこの融合過程の分子機構の理解を進めるものとして一流国際学術誌 EMBO J に掲載され分野に大きなインパクトを与えた。また INPP5E の変異は、

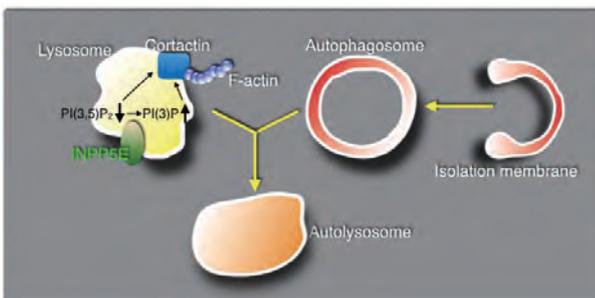


図 1

脳の形成不全を来す先天性疾患ジューベル症候群の原因となることが知られている。我々は患者で発見されている複数の変異 INPP5E がいずれもオートファジーを進行させる能力を欠くことを示した。ジューベル症候群がオートファジーの低下によって起こっている可能性を示唆しており注目を集めた。

我々は過去に上皮細胞や線維芽細胞ではオートファジーが細胞内に侵入した病原細菌を選択的に隔離し殺すことを示した。今回、内皮細胞は上皮細胞と異なり細胞内に感染した病原細菌をオートファジーによって殺せないという事実を明らかにした(図2)。内皮細胞でも通常のオートファジーは起こっているが、菌を認識しユビキチン化する活性が低下していた。菌のユビキチン化が起こらないとオートファゴソームが菌の周囲に形成されない。この事実は、皮膚や粘膜では比較的軽微な細菌感染症が、菌が血管内に入ると激化する例を説明しているのかもしれない。この成果は一流国際学術誌 PLOS Pathog に掲載された。

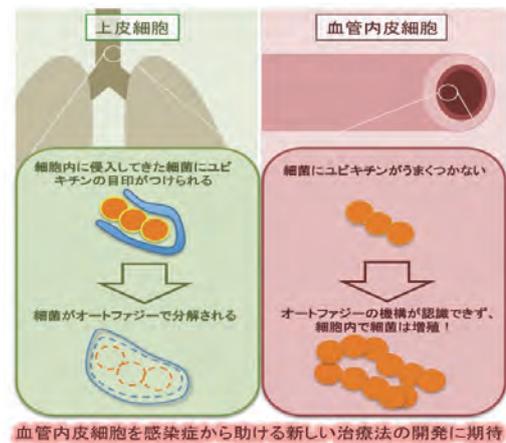


図 2

オートファゴソーム形成に関わる Atg9 は膜タンパク質であり、普段はゴルジ体やエンドソームを膜小胞に乗って循環しており、オートファゴソーム形成時にはそこに輸送される。我々は、エンドソームからの輸送に必要な Atg9 内の特定配列を同定し、それを欠く Atg9 はエンドソームに留まりオートファゴソームが形成されなくなることを示した。本成果は一流国際学術誌 J Cell Sci に掲載された。

以上の成果は、オートファジーの膜動態の分子機構及び病態との関わりを明らかにしたものである。さらにまだ論文未発表のためここでは述べないが分子機構や病態との関わりについて複数の成果を得ており、本研究の目的は十分に達成されたと考えている。

## 主な発表論文

1. Lu SL, Kawabata T, Cheng YL, Omori H, Hamasaki M, Kusaba T, Iwamoto R, Arimoto H, Noda T, Lin YS, \*[Yoshimori T](#). Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*. *PLOS Pathog*. 13, e1006444 (2017)
2. Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Youngae L, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley D, [Yoshimori T](#), \*Yamamoto M. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat. Immunol*. 18, 899-910 (2017)
3. Yamashita S, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, [Yoshimori T](#), Sakai Y, Mihara K, \*Kanki T. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol*. 215, 649-65 (2016)
4. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, \*[Yoshimori T](#), \*Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 64, 1994-2014 (2016)
5. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, \*Noda T, \*[Yoshimori T](#). Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci*. 129, 3781-91 (2016)
6. Hasegawa J, Iwamoto R, Otomo T, Nezu A., Hamasaki M, \*[Yoshimori T](#). Autophagosome-Lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert Syndrome. *EMBO J*. 35, 1853-67 (2016)
7. Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, Fujita N, Saitoh T, Akira S, [Yoshimori T](#), Sibley LD, \*Hwang S, \*Virgin HW. The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. *Immunity*. 40, 924-35 (2014)
8. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, \*Noda T, \*[Yoshimori T](#). Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J Cell Biol*. 203, 115-128 (2013)
9. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, [Yoshimori T](#), \*Tanaka K, \*Yamamoto M, \*Komatsu M. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Mol Cell*. 51, 618-31 (2013)
10. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, \*[Yoshimori T](#). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J*. 32, 2336-47 (2013)

## 主な学会発表

1. [Yoshimori T](#). "Autophagy: Its Membrane Dynamics and Implications in Diseases" Plenary Lecture in LS2 Annual Meeting 2018 "Metabolism & Signaling in the Life Sciences". 2018.
2. [Yoshimori T](#). "New Insights into Membrane Dynamics in Autophagy" Keystone Symposia "Autophagy Network Integration in Health and Disease (B2)". 2017.
3. [Yoshimori T](#). "Selective Autophagy and Diseases" Keynote Session in The Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development & Disease. 2016.



# オートファジー選択的基質による細胞制御とその病態生理

代表者 小松 雅明

新潟大学・医歯学系・教授  
(現：順天堂大学・大学院医学研究科・教授)

分担者 和栗 聡

福島県立医科大学・医学部・教授



## 研究目的

オートファジーがユビキチン化タンパク質凝集体や変性ミトコンドリアをはじめとしたユビキチン化カーゴを選択的に排除するという発見により、選択的オートファジーの生理機能が注目されるようになってきた。我々は、臓器特異的オートファジー欠損マウスの解析からオートファジーの破綻がユビキチン陽性の凝集体形成を伴った神経変性、肝障害、腫瘍形成等を引き起こすこと、それら病態発症の背景にはオートファジーによって選択的に代謝されるべき基質群の蓄積が存在することを明らかにしてきた。しかし、選択的オートファジーの病態生理についてはほとんど手つかずの状態であり、オートファジー選択的基質に関わる研究を分子から個体レベルまで包括的に推進する必要があった。

そこで本研究課題では、オートファジーの選択基質群ないしは選択的オートファジー関連分子の遺伝子改変マウスの網羅的解析を基軸に、1. 様々なヒト疾患で確認される凝集体形成機構、2. 選択的オートファジーの分子機構、3. 選択的オートファジーによる細胞内制御機構、そして1. から3. を統合することで4. 選択的オートファジーとヒト疾患との関連を明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

### (1) オートファジーによる p62 分解機構とその生理作用の解明：

我々はオートファジーの減弱により異常蓄積した p62 がユビキチンリガーゼアダプタータンパク質 Keap1 を不活性化し、Keap1 のターゲットであるストレス応答性転写因子 Nrf2 を活性化することを見出していた。さらに、肝細胞がん患者組織においては p62 が蓄積することで恒常的に Nrf2 が活性化し、肝細胞がんの微小環境下での生存を可能にすることも報告してきた。これらの事実は、p62 と Keap1 との結合を標的とした化合物が肝細胞がんの新しい創薬候補となることを意味する。本研究課題 (1) では、p62 による Nrf2 活性化の分子機構、生理的役割を明らかにするとともに、既に確立したアッセイ法を駆使し p62 を標的とした抗がん剤スクリーニングを行った。

構造解析から p62 の 351 番目のセリン残基のリン酸化により Keap1 との親和性が著しく上昇し Nrf2 を活性化すること、そして細胞生物学的解析からそのリン酸化が選択的オートファジー発動時に引き起こされることを突き止めた。このことは、二つの主要な生体防御機構である Keap1-Nrf2 システムと選択的オートファジーが p62 のリン酸化を介して連動することを意味する (図 1)。

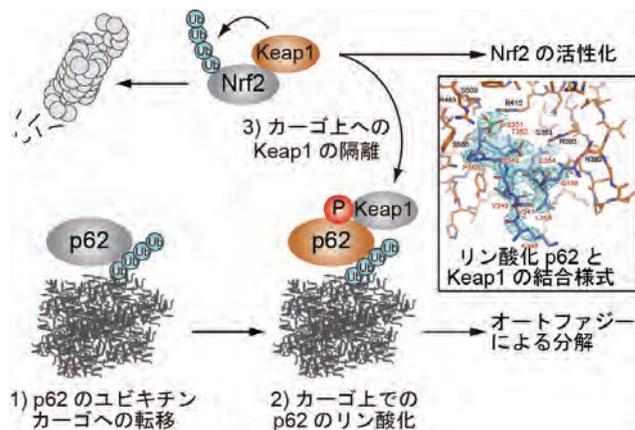


図 1

肝細胞がんにおいて p62-Keap1-Nrf2 経路が恒常的に活性化し、糖代謝、アミノ酸代謝の再編成を起すこと、その結果としてグルクロン酸経路およびグルタチオン合成を亢進させ腫瘍の増殖、抗がん剤耐性に寄与することを見出した。さらに、p62-Keap1-Nrf2 経路を標的とした抗がん剤スクリーニングを実施し、ヒット化合物 K67 を同定するとともに、その誘導体を合成した (図 2)。

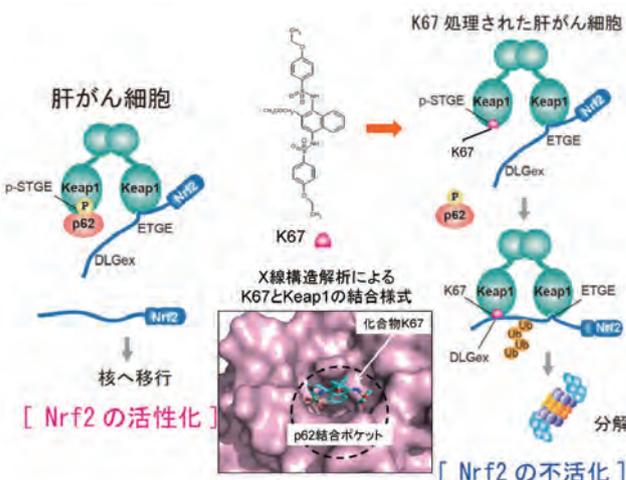


図 2

p62-GFP ノックインマウスを開発、様々な条件下における細胞あるいは生体内における p62 の動態解析が可能となった。

p62 の pre-mRNA スプライシングにより生じるバリエーションが、全長型 p62 タンパク質とは対照的に Keap1-Nrf2 経路を負に制御することを見出した。

遺伝学的にプロテアソーム活性を減弱させたマウス肝臓においてオートファジーおよび p62-Keap1-Nrf2 経路が活性化することを見出した。

## (2) UFM1 システムの異常と遺伝性重度発達障害：

Atg8 ファミリータンパク質である GABARAP に相互作用する E1 様酵素 UBA5 をコードする遺伝子の変異を複数の小頭症を伴う重篤発達障害家系において同定、UBA5 の酵素活性低下が遺伝性重度発達障害を引き起こすことを明らかにした。さらに、UBA5 により活性化されるユビキチン様分子 UFM1 の神経特異的欠損マウスが小頭症を呈して生後数日で死亡することを明らかにした。

UBA5 が活性化するユビキチン様分子 UFM1 あるいは活性化された UFM1 が転移される E2 様酵素 UFC1 をコードする遺伝子の変異を複数の重度発達障害家系から同定、UFM1 システムの機能減弱が遺伝性重篤発達障害を引き起こすことを確定させた。

## (3) Alfy と GABARAP の結合様式の決定：

選択的オートファジー関連タンパク質である Alfy とオートファゴソームに局在する GABARAP とが特異的に相互作用することを見出し、Alfy の GABARAP-interacting motif と GABARAP との共結晶構造解析にも成功した。Alfy の GABARAP 結合不能変異体を用いた細胞生物学的解析から、GABARAP は Alfy との相互作用依存的にオートファゴソームへ移行することが示唆された。

## (4) 新規オートファジー選択的基質 NCoR1 の同定と NCoR1 分解の生理機能解析：

NCoR1 は、核内受容体とヒストン脱アセチル化酵素とに相互作用し、ヒストンを脱アセチル化することで核内受容体の転写活性を抑制する。栄養飢餓などの刺激により NCoR1 と NCoA1 が入れ替わると、NCoA1 に結合するヒストンアセチル化酵素によりヒストンがアセチル化され核内受容体の転写活性が活性化される。我々は、NCoR1 が栄養飢餓に応じてオートファジーにより選択的に分解されること、オートファジー欠損細胞では NCoR1 の過剰蓄積によりヒストン脱アセチル化が亢進、PPAR  $\alpha$  や LXR  $\alpha$  といった細胞内代謝を司る核内受容体の不活化が起こっていることを見出した。つまり、オートファジーは NCoR1 の量的調整を行うことでヒストンのアセチル化、脱アセチル化による遺伝子発現を制御していると考えられる。

## (5) オメガソーム微細構造の解明：

飢餓誘導性オートファジーにおいて、隔離膜前駆体として知られるオメガソームの 3 次元微細形態について、光学 - 電子顕微鏡相関法および電子線トモグラフィ法により解析した。その結果、オメガソームが小胞体と隔離膜をつなぐ多数の細管構造から構成され、主に隔離膜閉鎖部近傍に位置していることを見出した。

### 主な発表論文

1. Saito, T., [Waguri, S.](#) (19人中17番目), [\\*Komatsu, M.](#) (19人中19番目). Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1. *Nat Commun* in press (2019).
2. Nahorski, MS., [\\*Wood, CG.](#), [\\*Komatsu, M.](#) (27人中26番目), [\\*Alkuraya FS.](#) Biallelic *UFM1* and *UFC1* mutations expand the essential role of ufmylation in brain development. *Brain* 141: 1934-1945 (2018).
3. Kageyama, S., Saito, T., Obata, M., Koide, RH., Ichimura, Y., [\\*Komatsu, M.](#) Negative regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by a p62/Sqstm1 splicing variant. *Mol Cell Biol* 38: e00642-17 (2018).

4. Muona, M., [Waguri, S.](#) (28人中26番目), [\\*Lehesjoki, AE.](#), [\\*Komatsu, M.](#) (28人中28番目). Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet* 99: 683-694 (2016).
5. Saito, T., [Waguri, S.](#) (38人中34番目), [\\*Komatsu, M.](#) (38人中38番目). p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun* 7: 12030 (2016).
6. Eino, A., Kageyama, S., Uemura, T., Annoh, H., Saito, T., Narita, I., [\\*Waguri, S.](#), [\\*Komatsu, M.](#) Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *J Cell Sci* 128: 4453-4461 (2015).
7. Kageyama, S., Sou, YS., Uemura, T., Kametaka, S., Saito, T., Ishimura, R., Kouno, T., Bedford, L., Mayer, RJ., Lee, MS., Yamamoto, M., [Waguri, S.](#), Tanaka, K., [\\*Komatsu, M.](#) Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem* 289: 24944-24955 (2014).
8. Uemura, T., Yamamoto, M., Kametaka, A., Sou, YS., Yabashi, A., Yamada, A., Annoh, H., Kametaka, S., [Komatsu, M.](#), [\\*Waguri, S.](#) A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Mol Cell Biol* 34: 1695-1706 (2014).
9. Lystad, AH., Ichimura, Y., Takagi, K., Yang, Y., Pankiv, S., Kanegae, Y., Kageyama, S., Suzuki, M., Saito, I., Mizushima, T., [\\*Komatsu, M.](#), [\\*Simonsen A.](#) Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 15: 557-565 (2014).
10. Ichimura, Y., [Waguri S.](#) (20人中2番目), [\\*Tanaka, K.](#), [\\*Yamamoto, M.](#), [\\*Komatsu M.](#) (20人中20番目). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell* 51: 618-631 (2013).

### 主な学会発表

1. [Masaaki Komatsu](#) "p62/Sqstm1, friend or foe?" EMBO Conference "Autophagy: From molecular principles to human diseases". 2017.
2. [Masaaki Komatsu](#) "p62/Sqstm1 regulates glucose and glutamine metabolism through a transcription factor NRF2" Keystone Symposium on Autophagy: Molecular and Physiological Mechanism. 2016.
3. [Masaaki Komatsu](#) "Metabolic reprogramming in human hepatocellular carcinoma by p62/Sqstm1" American Association for the study of Liver Diseases (AALD) Basic Science Symposium: Autophagy in the Liver. 2015.



# パーキンソン病病態解析に基づくオートファジー調節化合物の開発

代表者 齊木 臣二

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

分担者 佐藤 栄人

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

連携 服部 信孝

研究者 順天堂大学・大学院医学研究科・教授

井本 正哉

慶應義塾大学・理工学部・教授



## 研究目的

パーキンソン病 (以下 PD) は有病率 150 人 /10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患で、中脳黒質の進行性神経細胞死を特徴とする。PD 病態では異常蛋白蓄積、ミトコンドリア機能異常が深く関与するため、それぞれオートファジー、ミトコンドリアオートファジー (以下マイトファジー) が重要な役割を果たすことが確立されつつあるものの、主病変の黒質神経細胞死・ドパミン分泌不全におけるオートファジーの役割は不明である。また現在まで対症療法に限定され根本的治療法のない PD では、経年的なミトコンドリア機能不全状態の存在が示唆されるため、オートファジー調節機構に立脚した新規治療法は、発症 / 進行予防による先制医療に繋がる可能性を秘める。応募者は遺伝性 PD 原因遺伝子産物 PINK1/parkin によるマイトファジー制御 (JCB 2010, FEBS Lett 2010)、リソソームの空間的制御によるオートファジー調節機構 (Nat Cell Biol 2011)、低分子化合物を用いたオートファジー調節による神経変性疾患治療薬開発 (Autophagy 2011, Nat Chem Biol 2008, HMG 2008) を一貫して研究していることから、本計画研究では (1)PD 黒質神経細胞死へのオートファジーの関与の検討、(2) PINK1/parkin 介在性マイトファジー特異的促進化合物の探索・同定、(3) オートリソソーム形成特異的に作用する化合物の薬効評価を行い、(2), (3) にて同定された候補化合物は (4)PD 特異的 iPS 細胞由来神経細胞での標的・薬効評価を完遂することにより、複数モデルでのオートファジー分子機構に基づく臨床応用に繋がらうる化合物の特定を目指す。

## 研究成果

(1) static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA) についての臨床遺伝学的検討：

本領域発足直前に領域代表者水島らは鉄沈着を伴う黒質神経細胞死によるパーキンソンニズムを一症状とする SENDA の責任遺伝子 WDR45 を同定し (Nat Genet 2013)、進行性黒質神経細胞死におけるオートファジー不全の一端を明らかにしたため、本研究領域発足後、研究代表者らは臨床的に SENDA と考えられる日本人症例において同遺伝子変異をダイレクトシーケンスにより検索し、その頻度が 28 症例中 7 例と高いことを報告した (表)。

(2) パーキンソン症状を主徴とする Perry 症候群原因遺伝子産物のオートファジーへの影響についての検討：

高齢発症のパーキンソン症状・呼吸不全を主徴とする Perry 症候群の原因遺伝子産物 p150<sup>glued</sup> (dynein の component の一つ) の病因変異による機能変化を培養細胞

モデルで検証し、アポトーシスの生じるメカニズム並びにリソソーム分布不全によるオートファジーフラックス障害について報告した。

表

症例の特徴	患者数 (MF)	採取時年齢	発症年齢	罹病期間	変異の有無					
					WDR45	PANK2	PLA2G6	C19orf12	COAST1	FA2H
精神発達遅滞を伴う早期にパーキンソン症状を呈する症例群	28 (10:18)	33.0 ± 9.6 (range 12-50)	23.8 ± 11.2 (range 3-40)	10.8 ± 12.1 (range 1-43)	7 (25.0%)	0	0	0	0	0
2) Infantile neuroaxonal dystrophy	4 (3:1)	5.0 ± 2.8 (range 3-9)	0.25 ± 0.50 (range 0-1)	4.8 ± 2.9 (range 3-9)	0	0	1 (p.R635X single hetero)	0	0	0
3) 精神発達遅滞を伴わない早期にパーキンソン症状を呈する症例群	98 (48:18)	32.8 ± 12.0 (range 5-83)	22.0 ± 7.6 (range 2.5-30)	10.4 ± 11.9 (range 0-72)	0	NA	NA	NA	NA	NA

(3) PD 黒質神経細胞死へのオートファジーの関与解明：

a) PANK2、SENDA 疾患 iPS 細胞の解析：患者由来 iPS 細胞分化誘導後に細胞外フラックスアナライザー XFe24 によるミトコンドリア機能評価およびオートファジー活性を評価し、呼吸鎖機能低下を確認した。

b) 黒質神経細胞死における AAT の役割について：精製 AAT を定位脳手術にて中脳黒質に注入したモデルマウスを独自に樹立したモノクローナル抗体を用いて評価したが、特に黒質神経細胞死は誘導されなかった。

c) Atg7flox/flox TH-IRES Cre マウス (tyrosine hydroxylase 発現神経細胞特異的オートファジーノックアウトマウス) にて、孤発性 PD と同様に中脳黒質ドパミン神経細胞および青斑核ノルアドレナリン神経細胞の細胞質内封入体を確認し、同封入体はレビー小体と同様に alpha-synuclein を構成成分としており、ユビキチン陽性であった。

d) 新規家族性 PD 責任遺伝子 CHCHD2 を同定し、本遺伝子産物 CHCHD2 がミトコンドリアマトリックスに局在し、呼吸鎖機能に関与することを報告したが、オートファジー・マイトファジー分子機構への直接的な関与は確認できなかった。

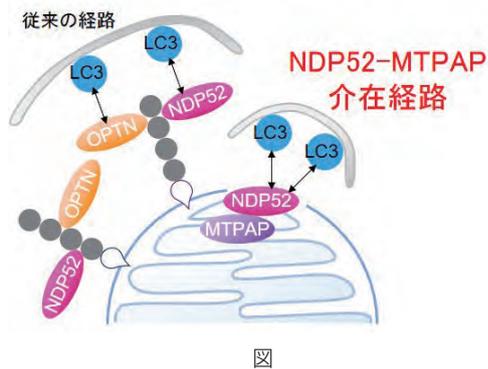
(4) PINK1/parkin 介在性マイトファジー特異的調節化合物の探索・同定：

既存薬ライブラリースクリーニングを行い、メマンチン・クレマスチンが本分子作用を促進することを確認した。

(5) PINK1/parkin 介在性マイトファジーの分子機構の解明：

パーキンソン病責任遺伝子産物 PINK1 および parkin による膜電位依存的 mitophagy は 2008 年以降、その分子メカニズムが次々に明らかになっている。我々は、本マイトファ

ジーにおけるアダプター蛋白質 NDP52 が、ミトコンドリアマトリックス蛋白 MTPAP と結合し、同マイトファジーを正の方向に制御することを示した (図)。



(6) オートリソソーム形成促進化合物 SO286 の疾患モデルでの薬効評価：

SO286 およびその誘導体 (最もオートファジー誘導効果の高いもの) がオートファジーを誘導し、ハンチントン病モデルマウスの寿命を延長する作用を確認した。

(7) PD 特異的 iPS 細胞由来神経細胞でのヒット化合物の標的・薬効評価：

(2) にて同定されたマイトファジー制御化合物、(3) にて SO286 およびその誘導体の中から最も薬効が期待できるものについて、PARK2/6/9 および孤発性 PD 患者由来 iPS 細胞由来神経細胞に添加し、薬効を評価し、メマンチン・クレマスチンが PARK2/6 由来 iPS 細胞由来神経細胞でオートファジーを誘導し、MPP+ 添加による細胞死を抑制した。

(8) オートファジー調節機能を持つ PD 患者血漿・血清代謝産物変化の同定：

150 症例、200 症例規模のパーキンソン病とコントロールを含む患者血漿 / 血清のメタボローム解析を実施し、オートファジー誘導作用を *in vitro* にて確認済みの oleoylethanolamine および palmitoylethanolamine がパーキンソン病患者で有意に上昇していることを確認した。

主な発表論文

- Ishikawa-KI, Saiki S\*, Furuya N, Imamichi Y, Tsuboi Y, Hattori N\*. p150glued deficiency impairs effective fusion between autophagosomes and lysosomes due to their redistribution to the cell periphery. *Neurosci Lett* 690:181-187 (2019) (\*joint corresponding authors)
- Furuya N, Kakuta S, Sumiyoshi K, Ando M, Nonaka R, Suzuki A, Kazuno S, Saiki S, Hattori N. NDP52 interacts with mitochondrial RNA poly(A) polymerase to promote mitophagy. *EMBO Rep* 19, e46363 (2018)
- Ren Q, Ma M, Yang J, Nonaka R, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Kobayashi K, Murayama S, Hwang SH, Saiki S, Akamatsu W, Hattori N, Hammock BD, Hashimoto K. Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease: A new therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E5815-E5823 (2018)
- Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep* 8:2813 (2018)
- Fujimaki M, Saiki S\*, Li Y, Kaga N, Taka H, Hatano T, Ishikawa KI, Oji Y, Mori A, Okuzumi A, Koinuma T, Ueno SI, Imamichi Y, Ueno T,

Miura Y, Funayama M, Hattori N\*. Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson's disease. *Neurology* 90:e404-e411 (\*joint corresponding authors) (2018)

- Saiki S, Hatano T, Fujimaki M, Ishikawa KI, Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Fukuhara T, Koinuma T, Imamichi Y, Nagumo M, Furuya N, Nojiri S, Amo T, Yamashiro K, Hattori N. Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient  $\beta$ -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease. *Sci Rep* 7:7328 (2017)
- Yamada D, Saiki S\*, Furuya N, Ishikawa KI, Imamichi Y, Kambe T, Fujimura T, Ueno T, Koike M, Sumiyoshi K, Hattori N\*. Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 471:109-116 (2016) (\*joint corresponding authors)
- Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:295-301 (2016)
- Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, Mochizuki Y, Mori-Yoshimura M, Murata M, Yamasita C, Nakamura N, Konishi Y, Ohi K, Ichikawa K, Terada T, Ohi T, Funayama M, Saiki S, Hattori N. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young-onset parkinsonism. *Neurobiol Aging* 36:2004.e9-2004.e15 (2015)
- Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. Identification of a gene associated with autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 14:274-82 (2015)

主な学会発表

- Saiki S. "Development of plasma metabolite biomarker for Parkinson's disease" RIKEN Young Researcher Workshop, RIKEN, Wako 31May2017.
- Saiki S. "Novel autophagy inducers against Parkinson Disease" The 8th International Symposium on Autophagy. Nara, 29May2017-1June2017
- Saiki S. "Plasma Biomarkers for Parkinson's disease." XXI World Congress on Parkinson's disease and related disorders. Milan, Italy. 6-9 Dec 2015



# オートファジーの生理・病態生理学的意義とその分子基盤

代表者 **水島 昇**  
 東京大学・大学院医学系研究科・教授

分担者 **塚本 智史**  
 量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・主任研究員

連携研究者 **松本 直通**  
 横浜市立大学・大学院医学研究科・教授



## 研究目的

これまでオートファジーの基本分子基盤の解明とともに、オートファジーが飢餓適応、細胞内浄化、初期胚発生、免疫応答、神経変性疾患・がん抑制などの広範な生命現象に関与していることが明らかにされてきた。しかし、これらの基本フレームが理解された現在でも、残された課題や新たに見つかった課題が多く存在する。例えば、オートファゴソーム形成部位やオートファゴソームとリソソームの融合機構については未解明の課題が多い。また、個体レベルでのオートファジーの生理機能の理解もまだ進展途中である。ヒト疾患との関わりについては、神経変性疾患 (SENDA) などでオートファジー遺伝子との関連が示され始めたに過ぎず、分子機構との関連は明確になっていない。

そこで、本研究課題では、特にオートファゴソーム形成およびオートファゴソームとリソソームとの融合過程の細胞生物学的解析、これらの分子基盤に基づいたオートファジーおよびリソソーム関連新規分解系のマウス個体での機能解析、新規オートファジー制御化合物の同定を行い、ヒト疾患の病態形成におけるオートファジーの役割の理解と制御へとつなげることを目指した。

## 研究成果

### (1) オートファゴソーム形成過程の超微形態学的解析：

オートファゴソーム形成に関わる個々の ATG 因子群が具体的にどのような膜動態を制御しているかは明らかではなかった。そこで、今回、代表的な ATG 因子のノックアウトおよびノックダウン細胞の電子顕微鏡を用いた超微細構造解析を網羅的に行い、各 ATG 因子または複合体が機能するオートファゴソーム形成ステップを特定した。また、同時にオートファジー選択的基質としてフェリチンを特定した。

### (2) オートファジー始動複合体の構造と機能解析：

計画研究の野田展生グループと共同で、オートファジー始動に関わる ULK 複合体サブユニット ATG101-ATG13 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。その結果、ATG101 は ATG13 の N 末端領域と同様に HORMA ドメイン構造を持ち ATG13 と HORMA-HORMA 複合体を形成すること、その反対面に特徴的な WF フィンガーをもち下流の ATG 因子の集積に重要であることを明らかにした。

また、オートファゴソーム膜関連構造体の生化学的解析を行い、ULK 複合体がまず小胞体膜に局在し、次に PI3K 依存的に ATG9A 陽性の隔離膜構造体に局在することを見いだした。ULK 複合体が局在する小胞体膜上には、ホスファチ

ジルイノシトール合成酵素などの脂質合成酵素が豊富に存在していることから、このような特殊なドメインがオートファゴソーム形成に重要であることを示唆した。

### (3) オートファゴソームとリソソームの融合における繫留因子と SNARE の発見：

私たちはこれまでにオートファゴソームとリソソームの融合過程に必要な SNARE 因子としてシンタキシン 17 (STX17) を同定した。今回 STX17 に結合する因子を探索した結果、リソソームとエンドソームの融合に必要であることが知られている繫留因子 HOPS 複合体を同定し、それがオートファゴソームとリソソームとの融合に必要であることを明らかにした。

一方で、STX17 を欠損した細胞でもオートファゴソームとリソソームの融合が部分的に残存することを見だし、それを相補する新規オートファゴソーム SNARE として YKT6 を同定した。YKT6 は STX17 と依存的に完成したオートファゴソームに局在し、SNAP29、リソソームの STX7 と結合することで融合を仲介することが示唆された。

また STX17N 末端領域欠損体が優勢阻害効果を示すことを発見し、それを用いて簡便にオートファゴソームを蓄積させる系を構築した。

### (4) オートファゴソーム膜閉鎖と内膜分解に関する研究：

哺乳類細胞におけるオートファゴソームの成熟過程を解析し、オートファゴソームとリソソームの融合とそれに引き続くオートファゴソームの内膜の分解を生細胞でとらえることに初めて成功した。さらに、オートファゴソームの SNARE タンパク質である STX17 をマーカーとして用いることで、ATG 結合系はオートファゴソームの閉鎖に必要であり、それによる外膜と内膜の切り離しがオートファゴソーム内膜の効率的分解に必要であることを示唆した (図 1)。

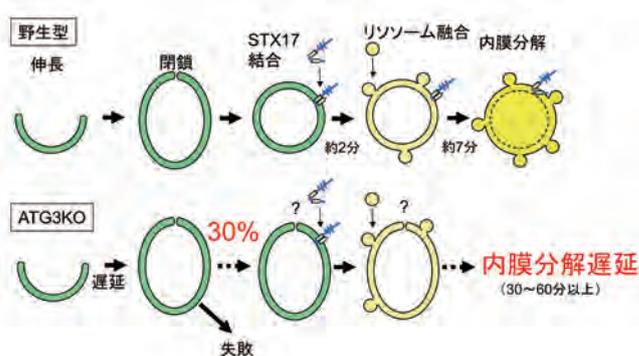


図 1

(5) オートファジー活性評価レポーターの開発とそれを用いた制御化合物の同定：

オートファジー活性（フラックス）を簡便かつ定量的に測定できる新規レポーター GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G を開発した。本レポーターを用いて培養細胞だけでなく動物個体内でもオートファジー活性を測定しえた。その結果、マウスやゼブラフィッシュの受精卵、水晶体などで高いオートファジー活性を認めた。さらに既承認薬ライブラリーから新規オートファジー誘導薬・阻害薬を同定した。今後、本プローブの利用によってオートファジーの基礎研究や疾患研究が進展することが期待される。本法は特許を出願した。

また、本レポーターと CRISPR-Cas9 法を用いてゲノムワイドのオートファジー遺伝子スクリーニングを行い、TMEM41B という小胞体膜タンパク質がオートファゴソーム膜伸長に必須であることを見いだした。

(6) 新規マウスモデルを用いたオートファジーの生理的意義の解析：

オートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスは生後 1 日で死亡するが、神経細胞にのみ *Atg5* 遺伝子を再導入したマウスは成獣まで生存できるようになった。よって、*Atg5* 欠損マウスの新生仔期における死因は神経異常にあったことがわかった。さらにこのマウスは鉄吸収不全による貧血や性ホルモン低下を伴う性腺萎縮を呈することから、オートファジーがもつ新しい生理機能の存在が示唆された（図 2）。

中国 Hong Zhang 博士と共同でヒト SENDA 病のモデ

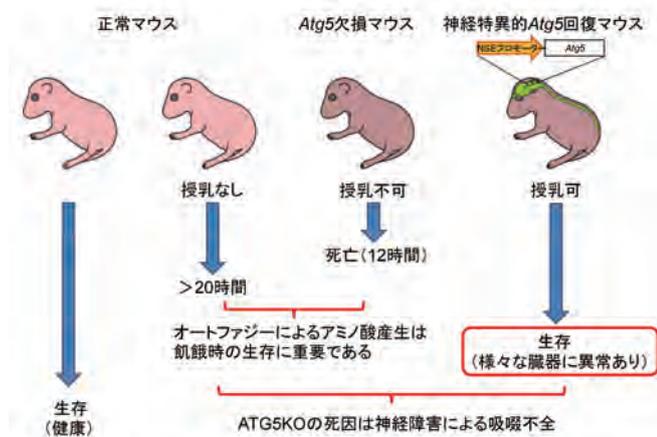


図 2

ルとして WIPI4/WDR45 ノックアウトマウスを作製・解析した。このマウスではオートファジー基質の蓄積とともに学習障害、運動障害が観察され、ヒト SENDA 病の解析に有用であることが示唆された。

一方、ULK 複合体のサブユニットである ATG13 の遺伝子ノックアウトマウスを作製・解析したところ、胎生致死となり、心筋の発達異常がその原因と考えられた。ATG13 と共同して機能する FIP200 を欠損するマウスも胎児期に死亡するが、他の多くの ATG 遺伝子ノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、ATG13-FIP200 がもつ非オートファジー機能が心臓発生に寄与していると考えられた。

(7) 人為的脂肪滴分解法の開発：

オートファジーの分解基質を脂肪滴表面に局在させるとオートファジーによる脂肪滴の選択的分解が起こることを示し、マウス受精卵にリポファジーを誘導することで胚発生における脂肪滴の必要性を明らかにした。

主な発表論文

1. Morita K, Hama Y, Izume T, Tamura N, Ueno T, Yamashita Y, Sakamaki Y, Mimura K, Morishita H, Shihoya W, Nureki O, Mano H, \*Mizushima N. Genome-wide CRISPR screen identifies *TMEM41B* as a gene required for autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 217: 3817-3828 (2018).
2. Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, \*Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J. Cell Biol.* 217:2633-2645 (2018).
3. Tatsumi T, \*Itakura E, \*Tsukamoto S. (11 人中 11 番目), Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse. *Development* 154(4) (2018).
4. Nishimura T, Tamura N, Kono N, Shimanaka Y, Arai H, Yamamoto H, \*Mizushima N. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J.* 36:1719-1735 (2017).
5. Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, \*Mizushima N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354:1036-1041 (2016).
6. Kaizuka T, Morishita H, Hama Y, \*Tsukamoto S, Matsui T, Toyota Y, Kodama A, Ishihara T, Mizushima T, \*Mizushima N. An autophagic flux probe that releases an internal control. *Mol. Cell* 64: 835-849 (2016).
7. Yoshii SR, Kuma A, Akashi T, Hara T, Yamamoto A, Kurikawa Y, Itakura E, \*Tsukamoto S, Shitara H, Eishi Y, \*Mizushima N. Systemic analysis of *Atg5*-null mice rescued from neonatal lethality by transgenic ATG5 expression in neurons. *Dev. Cell* 39: 116-130 (2016).
8. Kaizuka T, \*Mizushima N. Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice. *Mol. Cell Biol.* 36: 585-595 (2015).
9. Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, \*Mizushima N. Ultrastructural analysis of auto-phagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.* 127:4089-4102 (2014).
10. Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, \*Mizushima N. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25:1327-1337 (2014).

主な学会発表

1. Mizushima N. "Maturation of the autophagosome" EMBO Conference "Autophagy-from molecular principles to human diseases". 2017.
2. Mizushima N. "Novel Methods for Monitoring Autophagosome Maturation and Autophagic Flux" Keystone Symposium: Autophagy Network Integration in Health and Disease. 2017.
3. Mizushima N. "The Life of the Autophagosome" Keystone Symposium Autophagy: Molecular and Physiological Mechanisms. 2016.



# オートファジーが関与する小胞体品質管理機構の解明

代表者 潮田 亮

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

連携研究者 永田 和宏

京都産業大学・総合生命科学部・教授  
(現：京都産業大学・タンパク質動態研究所・教授)



## 研究目的

小胞体におけるタンパク質品質管理にはミスフォールドタンパク質を速やかに小胞体からサイトゾルへ排除し、ユビキチンプロテアソーム系で分解する小胞体関連分解(ERAD)が存在する。我々は、小胞体で初めて還元活性に特化した還元酵素 ERdj5 を同定した。ERdj5 は分解基質のジスルフィド結合を還元し、立体障害を減らすことで小胞体からサイトゾルへの逆行輸送を効率化していることを明らかにした (R. Ushioda *et al. Science* 2008, M. Hagiwara *et al. Mol. Cell* 2011)。しかし、小胞体内腔で巨大な凝集体を形成するいくつかの基質は ERAD ではなく、オートファジー経路で分解される。本研究では凝集体の蓄積が引き起こす小胞体膜を超えたオートファジーの生物学的意義に着目した。また、ERdj5 と同様に J ドメインとチオレドキシソム様ドメインを有する新規タンパク質 ERdj8 を同定し、このタンパク質がオートファジーに関与することが示唆される証拠を得た。我々は ERdj8 がどのようにオートファジーに寄与するのか詳細なメカニズムの解明を目指した。

## 研究成果

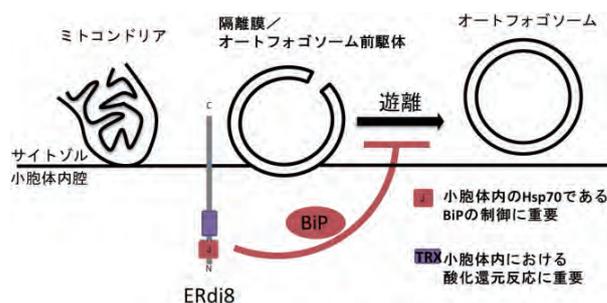
### (1) 肝星細胞での凝集コラーゲンのオートファジー分解：

凝集体コラーゲンをを用い、コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 をノックアウトさせることにより凝集体コラーゲンを小胞体内腔に蓄積させた。肝星細胞において、コラーゲンの蓄積は、小胞体ストレス依存的なアポトーシスを引き起こすが、タンパク質品質管理としてオートファジー分解されることで恒常性が保たれることを明らかにした。このことを利用し、コラーゲン産生細胞である肝星細胞において Hsp47 をノックアウトし、さらにオートファジーを阻害することで、凝集体コラーゲンを小胞体に効率よく蓄積させ、アポトーシスによって肝臓から肝星細胞の数を減少させることができた。このことは肝硬変の新しい治療戦略の一つになることが期待される (K.Kawasaki, R.Ushioda *et al. J. Biol. Chem.* 2015)。連携研究者の下、新しく Hsp47 阻害剤の開発がなされており、オートファジー阻害併用した治療戦略が期待される。

### (2) 新規小胞体タンパク質によるオートファジー制御：

我々は J ドメインとチオレドキシソム様ドメインを有する新規小胞体タンパク質 ERdj8 を同定した。ERdj8 は小胞体-ミトコンドリアのコンタクトサイト MAM に局在し、オートファジーに関与することを見出した。ERdj8 はオートファゴソーム膜形成において小胞体からの遊離を遅延させることで、オートファゴソームの伸長を制御することを明らかにした (図)。ミトコンドリアなど大きなオルガネラを分解する場合、ERdj8 欠損ではオートファゴソーム膜がミトコンド

リアを十分に取り囲めないことがわかり、未だ詳細が明らかになっていないオートファゴソーム膜の形成過程の一端を明らかにした (Under review)。



## 主な発表論文

1. K. Maegawa, S. Watanabe, K. Noi, M. Okumura, Y. Amagai, M. Inoue, R. Ushioda, K. Nagata, T. Ogura, and \*K. Inaba The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation *Structure* 25:846-857 (2017)
2. \*K. Araki, R. Ushioda, H. Kusano, R. Tanaka, T. Hatta, K. Fukui, K. Nagata, and T. Natsume A crosslinker-based identification of redox relay targets *Anal Biochem* 1(520):22-26 (2017)
3. R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, and \*K. Nagata Redox-assisted regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(41): E6055-E6063 (2016)
4. Kawasaki K, \*Ushioda R, Ito S, Ikeda K, Masago Y, \*Nagata K Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem.* 290. 3639-3646 (2015)
5. Avezov E, Konno T, Zyryanova A, Chen W, Laine R, Crespillo-Casado A, Melo E, Ushioda R, Nagata K, Kaminski CF, Harding HP, \*Ron D. Retarded PDI diffusion and a reductive shift in poise of the calcium depleted endoplasmic reticulum *BMC Biol.* 10;13(1):2(2015)

## 主な学会発表

1. Ushioda R. "Maintenance of ER Homeostasis through Disulfide Reductase ERdj5" International Workshop of the CSSI 1<sup>st</sup> J-protein meeting, Gdansk(Poland), 2018.04.04
2. Ushioda R. "Regulation of proteostasis and Ca<sup>2+</sup>, homeostasis in the ER by the disulfide reductase ERdj5" 13th ER & Redox club meeting, Hamburg (Germany), 2017.04.29



# 選択的オルガネラ・オートファジーの分子機構

代表者 岡本 浩二

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授



## 研究目的

従来、オートファジーは大規模かつ非特異的な分解システムとして認識されてきたが、特定のタンパク質やオルガネラの選択的分解にも重要な役割を果たしていることが理解されつつある。私たちがこれまでに同定した選択的ミトコンドリア分解機構「マイトファジー」の関連因子の中には、タンパク質の生合成に関与する新生ポリペプチド結合複合体 NAC の構成因子 Egd1 が含まれていた。興味深いことに、Egd1 は進化的に保存されたタンパク質であり、ペルオキシソーム・オートファジー（ペクソファジー）にも重要な役割を果たす。本研究では、Egd1 とその相互作用因子がいつ・どこで・どのようにマイトファジーやペクソファジーに関与しているかについて、明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

酵母において、NAC は 2 つのサブユニット  $\alpha$  と  $\beta$  から成るヘテロダイマーを形成する。 $\alpha$ -NAC にはユビキチン結合に関与する UBA ドメインを持つ Egd2、 $\beta$ -NAC にはリボソーム結合に関与する RRKxxKK モチーフを持つ Egd1 と Btt1 が存在している。Egd2 と Btt1 はマイトファジーに重要でないこと、栄養飢餓誘導型のオートファジーやタンパク質を積み荷とした選択的オートファジーは、Egd1 欠損細胞でも正常であった。これらの結果は、従来知られている NAC がマイトファジーに機能しているのではなく、Egd1 が NAC とは独立してマイトファジーに働いている可能性を提起している。

次に、Egd1 のリボソーム結合の意義を検討した。Egd1 の RRKxxKK モチーフにアラニン置換を導入すると (RRK/AAA 変異体)、マイトファジーが障害された。加えて、Egd1 と相互作用することが示唆されているリボソーム・サブユニット Rpl31 の欠損細胞においても、Egd1 の発現には影響が見られないにもかかわらず、同様の障害が見られた。一方、野生型の Egd1 や RRK/AAA 変異体をリボソームへ強制的にアンカーさせると、マイトファジーはほぼ正常に起こることから、遊離型の Egd1 はマイトファジーに重要でないことが示唆された。

そこで、Egd1 と相互作用する新生ポリペプチド鎖を同定するため、マイトファジー誘導条件下の細胞から Egd1 をアフィニティー精製し、得られた mRNA についてマイクロアレイ解析を行った。その結果、比較対照の全 RNA に対して 5 倍以上濃縮されている因子を 90 以上同定した。その中の新規因子の欠損株を調べたところ、マイトファジーの部分的抑制を見出した。以上の知見により、マイトファジーに働く因子が Egd1 依存的に生合成され、機能発現していることが示唆された。

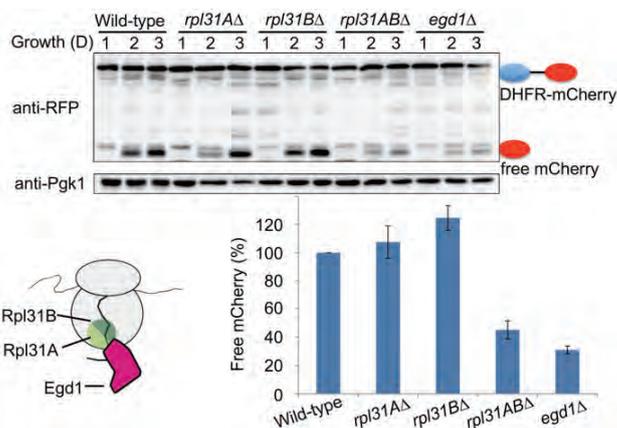


図 free mCherry の蓄積量を指標としたマイトファジーアッセイ。egd1 欠損および rpl31AB 二重欠損で mitophagy は抑制されることがわかった。

## 主な発表論文

1. Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, \*Okamoto K. Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.*, 34: 2703-2719 (2015).
2. Eiyama A, \*Okamoto K. Protein N-terminal acetylation by the NatA complex is critical for selective mitochondrial degradation. *J. Biol. Chem.*, 290: 25034-25044 (2015).
3. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, \*Okamoto K, Sakata Y, \*Otsu K. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.*, 6: 7527 (2015).
4. Eiyama A, \*Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 33: 95-101 (2015).
5. Liu L, Sakakibara K, \*Chen Q, \*Okamoto K. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.*, 24: 787-795 (2014).
6. \*Okamoto K. Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.*, 205: 435-445 (2014).
7. \*Kanki T, \*Okamoto K. Assays for autophagy II: Mitochondrial autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 1163: 165-173 (2014).

## 主な学会発表

1. \*Okamoto K. "Multiple pathways regulating mitochondria-specific autophagy" Cold Spring Harbor Asia Conference on Mitochondria. Suzhou, China. October 14, 2015.
2. \*Okamoto K. "Targeting autophagy for mitochondrial clearance" 7th International Symposium on Autophagy. Anhui, China. March 21, 2015.



# 新規オートファジーシステムの分子機序及び病態との関連

代表者 株田 智弘

国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所・室長



## 研究目的

これまでに知られていた数種類のタイプのオートファジーに加えて、我々は「リソソームが ATP 依存的にまた直接的に RNA・DNA を取り込み、分解する」という新しい現象を見だし、それぞれ RNautophagy、DNautophagy (ここではまとめて RDA と表記) と名付けた。同時に、これらの経路で機能するリソソーム膜上の核酸受容体の 1 つ LAMP2C を同定した。しかしながら、核酸取り込みのメカニズムや基質選択性、生理的役割や病態との関わりなど不明な点が多く残されている。そこで本研究では、RDA の詳細なメカニズムの解明を目的とし、この解明を通じて RDA の生物学的意義・病態生理学的意義を明らかにすることも目指した。

## 研究成果

### (1) LAMP2C の核酸結合配列の同定：

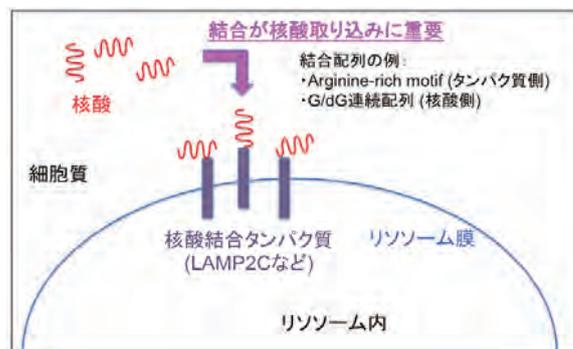
今回 LAMP2C 細胞質側配列に変異を導入したペプチドなどを用いて、LAMP2C の細胞質側配列が典型的な RNA 結合モチーフのひとつ、arginine-rich motif を有し、アルギニン残基が RNA や DNA との結合に必要であることを見いだした。さらに、LAMP1 や LAMP4/CD68 の細胞質側配列もアルギニン残基を豊富に有し、核酸と直接結合することを見いだした。これらの結果と、以前報告した LAMP2C ノックアウトマウス由来のリソソームにおいても RDA 活性が残存しているという結果から、LAMP2C 以外のリソソーム膜上の核酸結合タンパク質も RDA において機能していることが示唆された ( 図 )。

### (2) RDA における基質選択性の解析：

まず単一の塩基から成る 8 種類の 1 本鎖 RNA または DNA、poly-A, U, C, G, dA, dT, dC, dG を作製し、LAMP2C の細胞質配列との結合性を解析した。その結果、LAMP2C 配列は poly-G/dG と顕著に結合し、その他とは結合しなかった。さらに、単離リソソームを用いた *in vitro* 核酸取り込み実験を行ったところ、poly-G/dG は ATP 依存的にリソソームに取り込まれた一方、その他の 6 種類の核酸は取り込まれなかった。以上の結果から、基質取り込みの段階において、RDA には何らかの選択性が存在することがわかった。また、取り込みには核酸とリソソーム膜上の核酸結合タンパク質との結合が必要であることが強く示唆された ( 図 )。LAMP2C ペプチドは 4 から 6 塩基からなる poly-dG または poly-G と結合したことから、G/dG の連続配列は結合 motif の 1 つとして機能すると考えられた。2 本鎖 DNA や GC リッチなリピート配列についても検討したところ、やはり G/dG の連続配列が結合に重要であった。また筋萎縮性側索硬化症の原因に関与する GGGGCC リピート RNA も単離リソソームにおいて RDA の基質となることも見いだした。

### (3) RNA トランスポーターの同定：

線虫 SID-1 は双方向 RNA トランスポーターとして働くことが報告されている。本研究では、その脊椎動物 ortholog である SIDT2 がリソソームに局在する膜タンパク質であることを示した。また、SIDT2 を過剰発現またはノックダウンさせた細胞由来リソソームにおいて、RNautophagy 活性がそれぞれ増強、減弱することを、単離リソソームを用いたアッセイ系により示した。SIDT2 の発現量の変動はリソソーム pH やリソソーム内の分解酵素活性に影響を与えなかったという結果もあわせ、SIDT2 がリソソームによる RNA 取り込みを仲介することを明らかにした。細胞レベルでは、MEF において、24 時間内で分解される総 RNA のうち約 50% の分解が SIDT2 のノックダウンにより阻害された。クロロキン存在下では SIDT2 ノックダウンによる RNA 分解抑制効果が有意には見られないこと、SIDT2 のノックダウンは macroautophagic flux に影響しないこと、また atg5 KO MEF でも同様の結果が得られたことから、SIDT2 を介した RNautophagy は細胞内の RNA 分解において主要な経路の 1 つであることが強く示唆された。



図

## 主な発表論文

- Hase K, Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Hakuno F, Takahashi S, Wada K, \*Kabuta T. RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nucleic Acids Res.* 43, 6439-6449 (2015)
- Fujiwara Y, Hase K, Wada K, \*Kabuta T. An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 281-286 (2015)
- Aizawa S, Fujiwara Y, Contu VR, Hase K, Takahashi M, Kikuchi H, Kabuta C, Wada K, \*Kabuta T. Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy.* 12, 565-578 (2016)

## 主な学会発表

- 株田智弘. RNautophagy/DNautophagy のメカニズム. 第 67 回日本細胞生物学会大会. 2015.
- 株田智弘. リソソームにおける新たな核酸分解システム. 第 87 回日本生化学会大会. 2014.



# 植物ペルオキシソームの品質管理におけるオートファジー制御機構の解明

代表者 後藤 (山田) 志野

京都大学・大学院理学研究科・研究員  
(現: Jagiellonian University・Malopolska Centre of Biotechnology・Project leader)

連携研究者 西村 幹夫

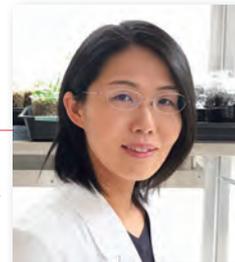
基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・教授  
(現: 甲南大学・理工学部・特別研究員)

真野 昌二

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・助教  
(現: 基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・准教授)

及川 和聡

新潟大学・農学部・特任助教  
(現: 理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員)



## 研究目的

ペルオキシソームは真核細胞に存在し、脂質の代謝、ビタミン合成など様々な機能を担う、生命維持に必須のオルガネラである。しかし、これら代謝系が活性酸素を発生させるため、ペルオキシソームを構成するタンパク質は常に障害の危機に曝されており、異常タンパク質の速やかな修復・除去システムが要求される。酵母や動物細胞ではオートファジーによる選択的なペルオキシソーム分解、すなわちペキソファジーが報告されており、統制された品質管理システムの存在が明らかにされてきた。これまでに多数のオートファジー関連因子が同定されているが、その全てが植物に保存されているわけではない。特に、ペルオキシソームの選択的分解を決定する因子については全く解析がなされておらず、植物におけるペキソファジーの詳細な分子機構は明らかになっていない。

本研究課題では、シロイヌナズナを用いた新規ペキソファジー抑制因子の機能解析およびペルオキシソーム分解欠損株の解析を行い、植物ペキソファジーに関わる分子機構の理解を目指した。

## 研究成果

### (1) 植物におけるペキソファジー関連遺伝子の探索:

顕微鏡スクリーニングにより得られた、ペルオキシソーム分解異常をきたすシロイヌナズナ *peup* 変異体群の遺伝子同定を進めた。染色体マッピングと、次世代シーケンサーによる網羅的な変異同定法を併用することで、大規模かつ短期間で原因遺伝子の同定を可能にする系を確立した。その後の解析から、複数のペキソファジー関連因子を単離することに成功した。

### (2) ペキソファジー抑制機構の解析:

これまでに、プロテアーゼ LON2 のシャペロンドメインがペキソファジーを抑制することを明らかにした。LON2 相互作用因子の単離を行った結果、動物細胞においてプロテアソームとオートファジー分解系のバランスを左右する因子のホモログが同定された。加えて、LON2 が多数のペルオキシソームタンパク質と結合することを明らかにし、恒常的にペルオキシソームタンパク質のメンテナンスに寄与する可能性を示唆した。

### (3) オートファジー隔離膜形成に関する研究:

シロイヌナズナのオートファジー変異体 *atg2* および *atg7* に、*GFP-2 xFYVE* を発現させ、隔離膜の可視化を行った。酵母とは異なり、シロイヌナズナの変異株においては隔離膜

伸長が認められた。ATG 遺伝子の多くが生物種にまたがって保存されている一方で、その制御は種特異的である可能性を示唆した。

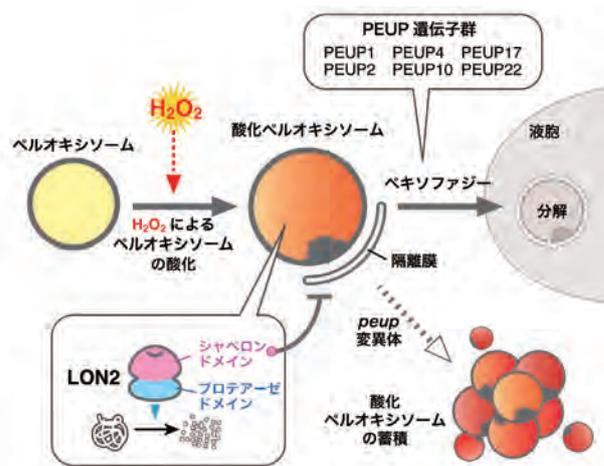


図 植物におけるペルオキシソームの品質管理

## 主な発表論文

1. Kamigaki A, Nito K, Hikino K, Goto-Yamada S, Nishimura M, Nakagawa T, \*Maňoř S. Gateway vectors for simultaneous detection of multiple protein-protein interactions in plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *PLoS One*. 11: e0160717 (2016)
2. Goto-Yamada S, Maňoř S, Yamada K, Ojikawa K, Hosokawa Y, Hara-Nishimura I, \*Nishimura M. Dynamics of the light-dependent transition of plant peroxisomes. *Plant Cell Physiol*.56:1264-71 (2015)
3. Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, \*Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Front Plant Sci*.6:234 (2015)

## 主な学会発表

1. Goto-Yamada S. "The quality control mechanisms on plant peroxisomes" 11th International Conference: Plant Functioning Under Environmental Stress. 2018.
2. Goto-Yamada S. "Identification of pexophagy-related mutants in Arabidopsis" 29th International Conference on Arabidopsis Research. 2018.



# Atg 分子群による脂質・オルガネラ動態制御の新しい分子機構

代表者 阪井 康能

京都大学・大学院農学研究科・教授



## 研究目的

これまで、オートファジーと脂質代謝の関連性については、主に脂質がオートファジーをどのように駆動するか、という点を中心に解明されてきた。一方、逆にオートファジーおよび Atg タンパク質群機能が細胞内脂質代謝にどのような影響を与えるのかについては未解明な部分が多い。また、微生物の栄養源の変化が、オルガネラ分解を含めいかなるオートファジーを誘導するのかについても解明すべき点が多い。本研究では、この2つの問いに対する答えとなる分子機構を明らかにすることを主たる目的とした。

## 研究成果

### (1) 出芽酵母の液胞内リパーゼ Atg15 欠損株における脂肪滴・中性脂質動態の解析：

Atg タンパク質機能が細胞内中性脂質量に及ぼす影響を調べるため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* オートファジー膜形成の核となる Atg1-Atg18 までのそれぞれのタンパク質欠損株に対して、その生育定常期におけるトリアシルグリセロール (TAG) 量を測定した結果、野生株より増加する株と減少する株の両方が存在することが分かり、Atg タンパク質が中性脂質合成・代謝制御に複合的に関与することを見出した。特に液胞内のリパーゼをコードする Atg15 の欠損株において TAG 量が少なく、また脂肪滴の数も減少していた。

続く解析の結果、Atg15 欠損株における TAG 量低下は、他の Atg タンパク質群によるオートファジーの活性と、脂肪滴表面のリパーゼによる中性脂質分解機構 (リポリシス) 活性の両方に依存することが分かった。特に Atg15 欠損株においてリポリシスに機能するリパーゼ群が脂肪滴に野生株より密に接触し、リン酸化状態も変化していたことから、本欠損株でリポリシス活性が亢進していることが強く示唆された。この結果は、オートファジーとリポリシスとの新たな機能連関を示している。

### (2) 植物葉上生育酵母において選択的オートファジーが果たす機能の発見：

これまでの研究から、メタノール資化性酵母の1つ *Candida boidinii* が植物葉上で生育すること、またその生育には本酵母の持つペルオキシソーム特異的オートファジー (ペキシソファジー) 機能因子を含む、多くの Atg タンパク質が必要であることを見出していた (Kawaguchi *et al.*, *PLoS ONE*, 2011)。本研究では、植物葉上で酵母の利用できる窒素源の変化に着目した。生育する植物 (モデルとして *Arabidopsis thaliana* を使用した) の葉が若葉から老葉、枯葉となるに従い、葉上生育する *C. boidinii* 窒素源代謝酵素の1つ、硝酸レダクターゼ (Ynr1) の発現量が減少し、代わっ

てメチルアミンを代謝するアミノオキシダーゼの発現量が増加することを見出した。この葉上の窒素源変化 (硝酸イオンからメチルアミン) を模した培地変換により、Ynr1 が細胞内に点状分布を示すようになること、またその点状分布が選択的オートファジーの基質であるアミノペプチダーゼ Ape1 と共局在することが分かった。Ynr1 量の減少がオートファジーに広く機能するキナーゼ Atg1 および選択的オートファジーの足場タンパク質とされる Atg11 に依存していたことから、Ynr1 が選択的オートファジーにより量制御を受けることが分かった。

続く解析から、メチルアミン添加による Ynr1 選択的オートファジーの誘導は、培地中に硝酸イオンが残っていても起こることが分かり、メチルアミンが選択的オートファジーの強力な誘導物質であることが示された (下図)。



図 メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* 葉上生育窒素源変換と選択的オートファジー

## 主な発表論文

1. Maeda, Y., Oku, M., \*Sakai, Y. Defect of vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis. *Autophagy* 11:1247-1258 (2015).
2. Shiraishi K, Oku M, Uchida D, Yurimoto H, \*Sakai Y. Regulation of nitrate and methylamine metabolism by multiple nitrogen sources in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEMS Yeast Res.* 15: fov084 (2015).
3. Shiraishi K, Oku M, Kawaguchi K, Uchida D, Yurimoto H, \*Sakai Y. Yeast nitrogen utilization in the phyllosphere during plant lifespan under regulation of autophagy. *Sci. Rep* 5: 9719 (2015)
4. Tamura, N, Oku, M, \*Sakai, Y. Atg21 regulates pexophagy via its PI(3)P-binding activity in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 14: 435-444 (2014)

## 主な学会発表

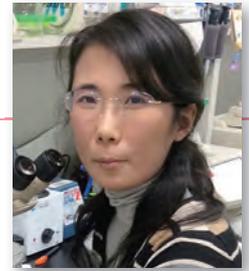
1. Sakai Y. "The emerging role of selective autophagy and lipid metabolism in microbes proliferating on plant leaves." Northeastern Asian Symposium on Autophagy, Busan, Korea. 2014



# 線虫初期胚で誘導される 選択的オートファジーの 分子機構と生理機能

代表者 佐藤 美由紀

群馬大学・生体調節研究所・准教授



## 研究目的

選択的オートファジーはタンパク質凝集体や感染病原菌、不良ミトコンドリアなどを選択的に分解に導くシステムとして細胞内の恒常性維持に寄与していること、またその異常はさまざまな疾患の発症に関与することが近年明らかとなってきている。われわれは線虫 *C. elegans* の受精卵を用いた解析から、受精後に精子から持ち込まれたミトコンドリアや MOs (精子特異的リソソーム様オルガネラ) を選択的にオートファゴソームに取り込み分解する新たな選択的オートファジー経路・アロファジーを見出した (図)。本研究では線虫アロファジーをモデル系に、遺伝学・生化学的手法によりアロファジー特異的制御因子の同定を試み、基質選択性や時期特異的誘導のメカニズムの解明を目指した。

## 研究成果

選択的オートファジーでは、オートファジーレセプター (アダプター) と呼ばれる因子が選択性を規定している。アロファジーについては既知のオートファジーレセプターの関与が認められなかったため、新たな因子の存在が考えられた。そこでまず、GFP-LGG-1 (線虫 LC3 ホモログ) の集積を指標にした網羅的 RNAi スクリーニングを行い、哺乳類の TBK1 や IKKε キナーゼのホモログをコードする *ikke-1* を同定した。さらに、IKKE-1 に結合する因子の探索と RNAi による二次スクリーニングにより新規遺伝子 R102.5 を同定し、*allo-1* と命名した。ALLO-1 はオートファジーレセプターに共通する LIR (LC3-interacting region) モチーフを持っていたが、それ以外は既知のレセプターと類似性がなく、機能未知の因子であった。

*ikke-1* または *allo-1* の変異体では受精卵でアロファジーが誘導されず、父性オルガネラの分解が共通して阻害されていた。一方で、これら変異体においてもバルクなオートファジーは正常であったことから、IKKE-1 や ALLO-1 は選択的経路特異的因子であると考えられた。ALLO-1 は卵子において発現しており、受精直後の非常に早い時期に父性オルガネラ周囲に局在化することが明らかとなった。また、この局在化はオートファジー制御因子を必要とせず、逆にオートファジー制御因子のリクルートには ALLO-1 が必須であった。さらに精製タンパク質を用いた解析から、ALLO-1 は LIR を介して直接 LGG-1 と結合することも明らかとなった。これらの結果から、ALLO-1 は allophagy においてオートファジー制御因子を基質の周囲へリクルートするアダプターの役割を担っていると考えられた。また、免疫沈降法により ALLO-1 と IKKE-1 は線虫受精卵中でも結合することが確認できたことから、協働して働く因子であると考えられた (図)。

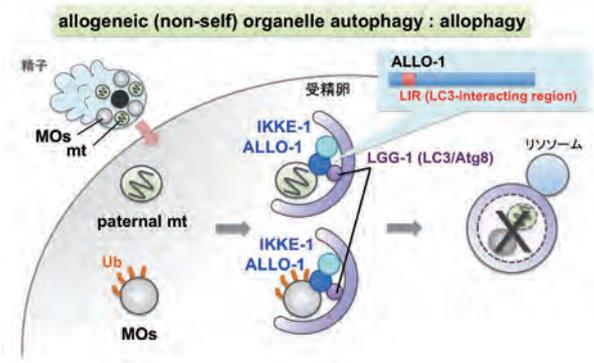


図 アロファジーによる父性オルガネラ分解

## 主な発表論文

1. Zhang H, Sato M (17人中15番目) et al. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 11: 9-27 (2015).

## 主な学会発表

1. 佐藤美由紀, 戸村琴音, 佐藤克哉, 佐藤健. "父性ミトコンドリア選択的オートファジーのメカニズム" 第67回日本細胞生物学会大会. 2015.
2. Sato M, Konuma R, Sato K, Tomura K, Sato K. "Dynamic Regulation of Autophagy and Endocytosis for Cell Remodeling during Early Development in *C. elegans*" 第37回日本分子生物学会年会. 2014.



# オートファゴソーム 膜コンポーネントの 網羅的同定

代表者 鈴木 邦律

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・  
准教授



## 研究目的

単細胞真核生物である出芽酵母では、オートファジーが誘導されると、pre-autophagosomal structure と名付けられた構造体から袋状の膜が伸展して隔離膜となり、最終的に端が閉じて、被分解物を内包した球状の二重膜胞であるオートファゴソーム（以下 AP）が完成する。オートファジー研究において依然として大きな問題は、AP 膜の供給元の同定と膜供給の分子メカニズムである。そこで、我々は AP 膜に局在する膜タンパク質に注目した。膜タンパク質は細胞内の小胞輸送システムを介して標的となるオルガネラに供給されるので、膜タンパク質を同定することは、AP 膜がどのオルガネラから供給されているのかという基本的な問いの解明に直接つながる研究となる。出芽酵母において AP 膜に局在する膜タンパク質としては、ゴルジ体を経由して AP 膜に供給される Atg9 が唯一知られるのみだった。最近になって、AP 形成と ER との関係が示唆されるようになってきたが、AP 膜に局在する ER の膜タンパク質は未だに知られていない。本研究では、AP の精製系を確立し、AP 膜に局在する膜タンパク質をプロテオーム解析により網羅的に同定することを目的とする。本研究を通じて、AP 膜を構成するタンパク質や脂質成分の起源を解明する手がかりを得たい。

## 研究成果

出芽酵母において、隔離膜のマーカートとなる Atg タンパク質を同定するために Ape1 を過剰発現した細胞を使用して蛍光顕微鏡による Atg タンパク質の局在解析を行った。その結果、Atg8 が隔離膜に局在することが確かめられた。そこで、Atg8 を基準に他の Atg タンパク質の局在を詳細に解析したところ、Atg タンパク質は隔離膜形成時にそれぞれ特徴的な局在を示すことが分かった (Suzuki *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2013) 平成 27 年度は、本手法を利用して、局在未知の Atg3 が隔離膜に局在することを報告した (Ngu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2015)。

AP の解析に関しても大きな進展があった。これまでは細胞破砕液中の AP の安定性に関する明確な結果は得られてこなかった。我々は、本研究を通じて、細胞破砕液中では、AP は浸透圧の低下に敏感に反応し、崩壊すること、細胞破砕液中で AP を形態的に検出するには、積荷タンパク質である Ape1 の過剰発現が必須であること、GFP-Ape1 を蛍光顕微鏡観察することによって AP の存在をモニターできること、これらのモニタリング法を利用し、密度勾配遠心法を用いて AP を濃縮した画分が得られること、(図) ショットガンプロテオミクスにより、AP 内部に取り込まれるタンパク質を網羅的に同定できることを示してきた。

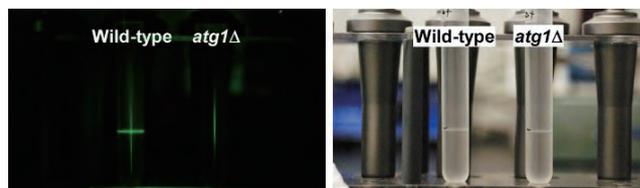


図 オートファゴソーム画分の単離  
緩衝液中で細胞を破砕し、密度勾配遠心法によりオートファゴソーム画分を得た。GFP-Ape1 をマーカーとし、GFP の蛍光によりオートファゴソーム画分を可視化した (左) 通常の明視野像 (右)

我々は、プロテオミクスのデータを分析することにより、AP 内部に選択的に積み込まれるタンパク質の候補を数十個同定した。リボソームを構成するタンパク質や、Ald6 などが候補に含まれていることから、この解析は妥当であるといえよう。リボソームや Ald6 が AP に選択的に取り込まれる機構は未知だったので、リボソームと Ald6 の分解を指標に細胞質タンパク質が AP 内部に選択的に取り込まれる分子機構を解析し、それに関わっているタンパク質を同定した (Suzuki *et al.*, *PLoS ONE*, 2014)。

## 主な発表論文

1. Ngu, M., Hirata, E., \*Suzuki, K. Visualization of Atg3 during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 290:8146-8153 (2015)
2. \*Suzuki, K., Nakamura, S., Morimoto, M., Fujii, K., Noda, NN., Inagaki, F., Ohsumi, Y. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 9:e91651 (2014).

## 主な学会発表

1. 平田恵理, 鈴木邦律 出芽酵母のオートファゴソーム形成における Atg4 の機能解析, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
2. 鈴木邦律 Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*., 第 14 回日本タンパク質科学学会年会 (招待講演), 2014 年 6 月 25 日, ワークピア横浜 (横浜市)



# オートファジー活性の ファインチューニング機構の 研究

代表者 野田 健司

大阪大学・大学院歯学研究科・教授



## 研究目的

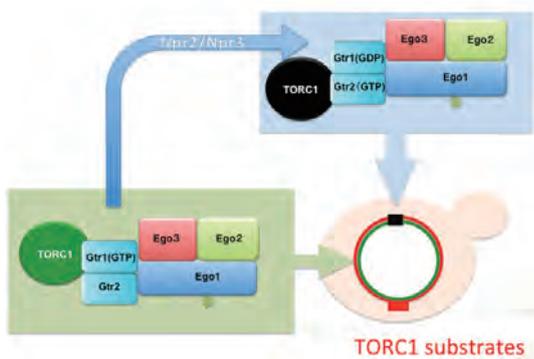
酵母においてオートファジーが発見されて以来オートファジーの基本分子が明らかにされてきたが、その活性がどのように精密に制御されているのかについて、理解は乏しい。オートファジーはそもそも自らの生命を構成する分子を部分的に分解する過程であり、その精密な制御ファインチューニングが重要であることが想定される。

そこで、本研究課題では、オートファジーの活性を制御する因子の同定とその制御機構の解明を目指した。

## 研究成果

### (1) オートファジー制御に関わる TORC1 の細胞内移動機構の解明：

オートファジーを制御する中心因子は TORC1 であるが、TORC1 がどのように制御されるのか、その詳細の理解は乏しい。我々の酵母活性に影響を与える因子のゲノムワイドスクリーニングの帰結として新規因子 Ego2 の同定に成功した。Ego2 は TORC1 を制御する G 蛋白質 2 量体 Gtr の足場を形成すると考えられた。それらの解析の結果、GTR1 が GTP を結合しているとき、TORC1 を含むこれら複合体は液胞膜全体に局在し、オートファジー制御因子 Atg13 を含む TORC1 の基質がリン酸化され、他方、GTR2 が GTP を結合するとき、これら複合体は液胞上で一部に集中して局在し、TORC1 の基質が、脱輪参加される。すなわち TORC1 の局在性がそれら基質との関係性を規定するという、新しい考え方を提案することができた。



### (2) オートファジー開始に関わる mTORC1 制御以降の解明：

これまでホスファチジルイノシトール 3 ホスファターゼである MTMR3 の活性中心の点変異体を発現させることで、オートファジーが誘導されることを報告してきたが、複雑なオートファジー関連タンパク質の誘導、特に mTORC1 による ULK1 のリン酸化抑制がどのようになされるのか不明であった。今回、MTMR3 が mTORC1 と結合することを

見出した。さらにその MTMR3 は mTORC1 の活性を抑制したことより MTMR を介した mTORC1、オートファジー制御機構が存在することが示唆された。

## 主な発表論文

1. Araki, Y., S. Kira, and T. Noda\*. 2017. Quantitative Assay of Macroautophagy Using Pho8Δ60 Assay and GFP-Cleavage Assay in Yeast. *Meth. Enzymol.* 588:307–321.
2. Ogasawara, Y., S. Kira, Y. Mukai, T. Noda\*, and A. Yamamoto\*. 2017. Ole1, fatty acid desaturase, is required for Atg9 delivery and isolation membrane expansion during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open.* 6:35–40.
3. Hao, F., T. Itoh, E. Morita, K. ShirahamaNoda, T. Yoshimori, and T. Noda\*. 2016. The PtdIns3-phosphatase MTMR3 interacts with mTORC1 and suppresses its activity. *FEBS Lett.* 590:161–173..
4. Imai, K., F. Hao, N. Fujita, Y. Tsuji, Y. Oe, Y. Araki, M. Hamasaki, T. Noda\*, and T. Yoshimori\*. 2016. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci.* 129:3781–3791.
5. Kira, S., Y. Kumano, H. Ukai, E. Takeda, A. Matsuura, and T. Noda\*. 2015. Dynamic relocation of the TORC1-Gtr1/2-Ego1/2/3 complex is regulated by Gtr1 and Gtr2. *Mol Biol Cell.* 27:382–396.

## 主な学会発表

1. Noda, T. "Autophagy Regulation by Gtr-Gia-Tag Network " The 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy, 2016
2. Noda, T. "Genome-wide survey of the factors affecting autophagic activity" The 7th International Symposium on Autophagy, 2015.



# 膜輸送を介した オートファジー誘導の シグナル制御機構の 統合的解析

代表者 福田 光則

東北大学・大学院生命科学研究所・教授



## 研究目的

低分子量 G 蛋白質 Rab は真核生物に普遍的に保存された膜 (小胞) 輸送 (membrane traffic) の制御因子で、ヒトなどの高等哺乳動物では約 60 種類の異なる Rab 分子が存在し、様々なタイプの膜輸送を制御している。ダイナミックな膜動態を伴うオートファジーも例外ではなく、近年複数の Rab 分子のオートファジーへの関与が示唆されている。しかしながら、Rab の種類数が非常に多いこともあり、Rab によるオートファジー制御の分子基盤については不明な点が多かった。そこで本研究では、当研究室で独自に開発した Rab の網羅的解析ツール『Rab panel』を駆使して、Rab を介するオートファジーのダイナミックな膜動態、特にオートファジーの誘導機構に着目して、その制御機構の解明を目指した。

## 研究成果

### (1) Rab12 活性化因子・DENND3 によるオートファジー誘導の制御機構の解析：

これまでの研究で、Rab12 は細胞膜上のアミノ酸トランスporter PAT4 をリサイクリングエンドソームからリソソームへと輸送し、その分解制御を介して間接的にオートファジーの誘導制御に関与することが明らかになっている。しかし、これまで Rab12 の活性調節因子が未同定であったため、Rab12 活性化の時空間的な制御基盤は明らかではなかった。本研究ではまず、Rab12 の上流活性化因子の探索を行い、マウス胚性線維芽細胞において、Dennd3 という分子が Rab12 の活性化因子として作用することを突き止めた。すなわち、Dennd3 を過剰発現する細胞では Rab12 の活性化による PAT4 の分解が亢進するため、細胞内アミノ酸量が減少し、結果的にオートファジーが亢進する (mTORC1 の活性が減少する) ことが明らかになった。一方、Dennd3 をノックダウンした細胞では、Rab12 の不活性化により PAT4 の分解が抑制されるため、細胞内アミノ酸量が増加した。しかし、Dennd3 のノックダウンは Akt シグナルの低下も引き起こすため、mTORC1 の活性低下を招き (アミノ酸量増大による mTORC1 活性化を相殺)、Rab12 ノックダウンほどのオートファジーの低下は認められなかった。

### (2) Rab33B 不活性化因子・OATL1 のオートファゴソーム外膜特異的な局在化機構の解析：

OATL1 は LC3 との結合を介してオートファゴソーム上にリクルートし、その成熟過程を制御することが知られている。OATL1 のターゲットとなる LC3 はオートファゴソームの内膜と外膜の両方に分布しているにも拘わらず、OATL1 は p62 とは異なりオートファジーによる分解を受けていなかった。そこで次に、OATL1 がどのような仕組み

でオートファジーによる分解を回避しているのかについて解析を行った。詳細な比較解析の結果、OATL1 の PB1 様ドメインは p62 の PB1 ドメインとは異なり、オリゴマー化能を欠損していることを見出した。また、強制的なオリゴマー化ツールを用いた解析から、オリゴマー化した OATL1 変異体や p62 はオートファゴソーム開始点に集積し分解を受けるが、オリゴマー化能の無い OATL1 はオートファゴソームの外膜に特異的に局在することが明らかになった (図 1)。

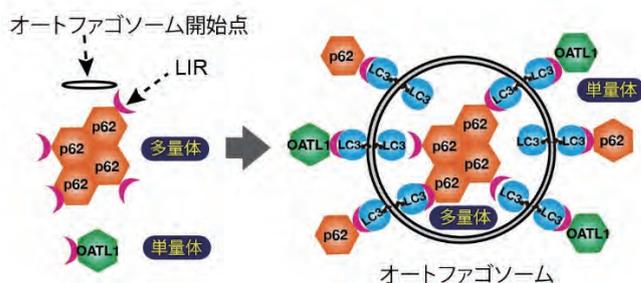


図 1

## 主な発表論文

- Hirano S, Uemura T, Annoh H, Fujita N, Waguri S, Itoh T, [\\*Fukuda M.](#) Differing susceptibility to autophagic degradation activity of two LC3-binding proteins: SQSTM1/p62 and TBC1D25/OATL1. *Autophagy* 12:312-326 (2016).
- \*Klionsky DJ, ... [Fukuda M.](#), ... et al. (2647 人中 643 番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1-222 (2016).
- Ishibashi K, [\\*Fukuda M.](#) Atg16L1 protein regulates hormone secretion independent of autophagy. *Autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging* (Hayat M.A. ed.) 7:103-112 (2015).
- Amagai Y, Itoh T, [Fukuda M.](#), \*Mizuno K. Rabin8 suppresses autophagosome formation independently of its guanine nucleotide-exchange activity towards Rab8. *J Biochem* 158:139-153 (2015).
- Matsui T, Noguchi K, [\\*Fukuda M.](#) Dennd3 functions as a guanine nucleotide exchange factor for small GTPase Rab12 in mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 289:13986-13995 (2014).

## 主な学会発表

- 野口憲太, 松井真英, [福田光則](#). "Dennd3 はマウス胚性線維芽細胞において Rab12 のグアニンヌクレオチド交換因子として機能する" 第 66 回日本細胞生物学会大会. 2014.
- [福田光則](#). "低分子量 G 蛋白質 Rab が制御する多彩な生命現象～メラニン輸送、神経回路網形成、オートファジーから感染症まで～" 国立感染症研究所・学会文化祭シンポジウム. 2014.



# オートファジー膜形成における磷脂質動態の研究

代表者 藤本 豊士

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授



## 研究目的

オートファジーの複雑な膜動態を理解するためには膜脂質の精緻な解析が必要不可欠である。本研究ではナノレベルの膜脂質分布を可視化できる急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (QF-FRL) を駆使し、同法の適用範囲を拡張するだけでなく、さらに膜脂質解析の新たな方法を導入してオートファジーにおける膜脂質動態およびそれをもたらす分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

### (1) PI(3,5)P<sub>2</sub> の解析：

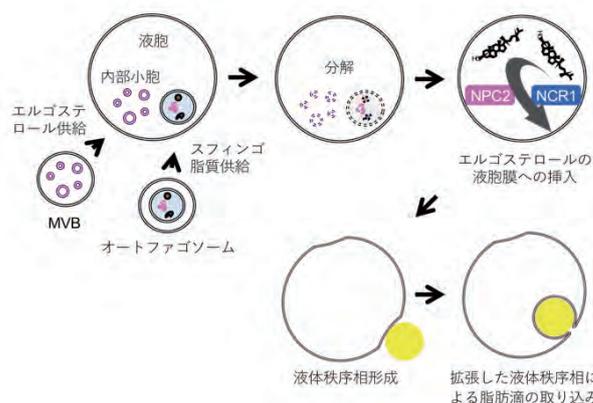
イノシトールリン脂質の 1 つである PI(3,5)P<sub>2</sub> はリソソームや液胞の機能に必須であることが知られているが、含量が非常に少なく、そのナノレベルの局在は不明であった。また PI(3,5)P と結合するプローブの多くが、PI(3,5)P より含量の多い PI3P や PI5P にも結合することも分布決定を困難にしてきた。我々は QF-FRL で PI(3,5)P を特異的に標識する方法を開発し、高浸透圧刺激下の酵母液胞膜に形成される液体秩序相に PI(3,5)P が高密度に分布することを見出した。また管・胞状の形態を示す哺乳類細胞の後期エンドソームでは、胞状部分に PI(3,5)P が集中することが分かった。このような微細なレベルで PI(3,5)P の集中が起こることは新たな発見であり、オートファジーにおける PI(3,5)P の機能についての解析が可能になった。

### (2) リポファジーについて：

静止期の出芽酵母では多数の脂肪滴が形成され、液胞で分解される。脂肪滴が液胞内に取り込まれる機構について、QF-FRL および凍結切断エッチング法で解析した。その結果、静止期酵母の脂肪滴は液胞膜に直接包まれるマイクロオートファジーのメカニズムで取り込まれること、静止期の液胞膜は液体非秩序相と液体秩序相に分化し、液体秩序相が拡大して脂肪滴を取り囲むことなどを見出した。さらに脂肪滴のマイクロオートファジーの過程は *fab1 Δ*, *vac7 Δ* などでは正常に進行せず、PI(3,5)P が関与すると考えられた。短時間の窒素飢餓でマクロオートファジーを誘導した場合にも、静止期酵母と同様の液体秩序相が形成され、類似の機序による脂肪滴のマイクロオートファジーが生じていることがわかった。

静止期および窒素飢餓時の酵母では液胞膜のエルゴステロール濃度が大きく増加しており、ニーマンピック病 C 型タンパク質のオルソログ (*Ncr1*, *Npc2*) によるエルゴステロール輸送が関与することが判明した。また窒素飢餓時の液体秩序相形成およびマイクロオートファジーに必要なエルゴステロールは multi-vesicular body の内部小胞が供給源になっていることなども分かった。これらの結果は脂肪滴のミ

クロファジーの分子機序を明らかにし、同時に ニーマンピック病 C 型タンパク質が液胞膜のステロール濃度制御に重要な役割を持つことを示した。



## 主な発表論文

1. Tsuji T, Fujimoto M, Tatematsu T, Cheng J, Orii M, Takatori S, \*Fujimoto T. Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole. *eLife* 6: e25960 (2017)
2. Tsuji T, \*Fujimoto T. Freeze-fracture-etching electron microscopy for facile analysis of yeast ultrastructure. *Bio-Protoc* 7: e2556 (2017)
3. Takatori S, Tatematsu T, Cheng J, Matsumoto J, Akano T, \*Fujimoto T. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-rich membrane domains in endosomes and lysosomes. *Traffic* 17: 154-167 (2016)
4. Takatori S, \*Fujimoto T. A novel imaging method revealed phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-rich domains in the endosome/lysosome membrane. *Commun Integr Biol* 9: e1145319 (2016)

## 主な学会発表

1. Fujimoto T. "Freeze-fracture Electron Microscopy to Define Distribution of Lipids and Lipid Domains at the Nanoscale". Keystone Symposium: Lipidomics and Bioactive Lipids in Metabolism and Disease. 2017.
2. Fujimoto T. "Lipids and Lipid Domains of the Yeast Vacuole". Gordon Research Conference: Lysosomes and Endocytosis. 2016.



# オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析

代表者 山本 林

東京大学・大学院医学系研究科・講師



## 研究目的

オートファゴソーム形成の初期過程では複数の Atg タンパク質がそれぞれ数十分子ずつ集まって高次集積体を形成する。出芽酵母において、この高次集積体の形成はオートファジー始動を司る Atg1 複合体の集積から始まるが、その分子メカニズムや相互作用の動的変化については不明な点が多い。

本研究課題では Atg1 複合体構成因子である Atg1, Atg13, Atg17-Atg29-Atg31 の 5 つに焦点を絞り、相互作用解析、結晶構造解析、質量分析など多面的なアプローチで解析を進めることで、Atg1 複合体の高次集積メカニズムおよび高次集積の意義を明らかにすることを目指した。

## 研究成果

### (1) 天然変性タンパク質 Atg13 が仲介する Atg1 と Atg17-29-31 複合体の高次集積：

Atg13 は N 末端に HORMA ドメインを持ち、C 末端に長い天然変性領域を持つ。質量分析の結果から、富栄養条件下ではこの天然変性領域が高度にリン酸化されており、飢餓に伴って速やかに脱リン酸化されることが分かった。我々は、Atg13 の天然変性領域に Atg1 との相互作用部位が 1 カ所、Atg17 との相互作用部位が 2 カ所存在することを見出し、これらの相互作用が Atg13 の脱リン酸化で亢進することを示した。計画研究の野田展生グループと共同で行った結晶構造解析および生化学的解析の結果から、Atg13 が持つ 2 つの Atg17 相互作用部位は同一の Atg17 と相互作用するのではなく、異なる 2 つの Atg17 と相互作用することが明らかとなった (図 1)。これは Atg13 の天然変性領域が 1 つの Atg1 と 2 つの Atg17-Atg29-Atg31 複合体を繋ぎ合わせる機能を持つことを示しており、この繋ぎ合わせが連続して起こることで Atg1 複合体が自己高次集積していくことが実験的に示された。また、自己高次集積の結果、Atg1 同士が近接することで trans での自己リン酸化が亢進することが明らかとなった。

### (2) Atg13 の N 末端 HORMA ドメインを介した Atg9 ベシクルのリクルート：

我々は、Atg13 の N 末端 HORMA ドメインが Atg9 と相互作用することで複数の Atg9 ベシクルを Atg1 高次集積複合体の近傍にリクルートすることを明らかにした。また、Atg9 ベシクルのリクルートが富栄養条件下においては Atg11-Atg9 相互作用に依存し、飢餓条件下では Atg13-Atg9 相互作用に依存するという使い分けがあることを見出した。飢餓条件下では、Atg1 複合体が自己高次集積することで Atg13 の局所濃度が高まり、結果として Atg9 ベシクルがリクルートされやすくなるものと考えられる。また、

Atg13 との相互作用によって Atg9 は Atg1 と近接することになり、自己リン酸化した Atg1 による Atg9 のリン酸化も亢進することが示された。

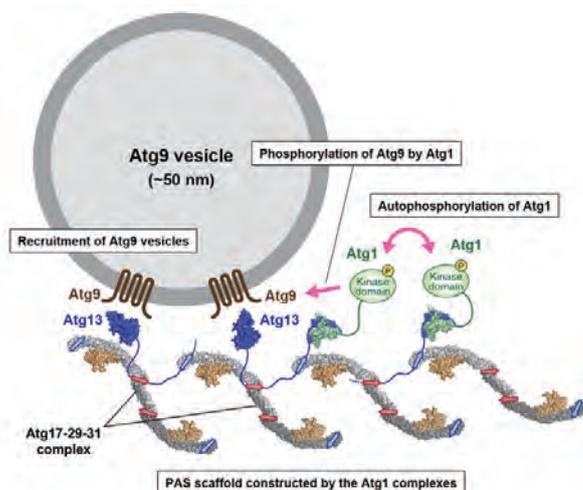


図 1 Yamamoto et al. (2016) *Dev. Cell* より改変

## 主な発表論文

1. Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, K., Hirano, H., Ando, T., Noda, N.N., and \*Ohsumi, Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Dev. Cell* 38:86-99 (2016).
2. \*Yamamoto, H., Shima, T., Yamaguchi, M., Mochizuki, Y., Hoshida, H., Kakuta, S., Kondo-Kakuta, C., Noda, N.N., Itoh, T., Inagaki, F., Akada, R., \*Ohsumi, Y. The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy. *J. Biol. Chem.* 290:29506-29518 (2015).
3. Suzuki, S.W., \*Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., \*Ohsumi, Y. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:3350-3355 (2015).
4. Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., Noda, N.N. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21:513-521 (2014).

## 主な学会発表

1. 山本 林 "オートファジー始動複合体の動的相互作用と分子集合形態の解析" ConBio2017 (ワークショップ) 2017.
2. 山本 林 "オートファジータンパク質群の動的相互作用と分子集合形態の解析" 第 54 回 日本生物物理学会年会 (招待講演) 2016.



# レジオネラ菌による Syntaxin17 分解機構と その生理的意義の解明

代表者 **新崎 恒平**

東京薬科大学・生命科学部・講師  
(現：東京薬科大学・生命科学部・准教授)



## 研究目的

細胞内発症型細菌であるレジオネラは『レジオネラエフェクター』と呼ばれる因子を宿主細胞に放出することにより細胞内の生理機能を制御し、自身の生存や増殖に都合の良い環境を細胞内に作り出す。レジオネラが制御する宿主生理機能の一つとしてオートファジーの抑制があり、RavZ と呼ばれるレジオネラエフェクターがその一旦を担っている。しかしながら、RavZ を欠損させたレジオネラ株の感染においてもオートファジーが抑制されていることから、RavZ 以外にもオートファジーの抑制に働くレジオネラエフェクターの存在が示唆されている。我々は、宿主細胞においてオートファジーの制御に関わる SNARE タンパク質である syntaxin17 (Stx17) がレジオネラ感染により分解されることを見いだした。そこで、本研究課題では Stx17 の分解に働くレジオネラエフェクターの同定とその分子機構を明らかにすると共にレジオネラが Stx17 を分解することが感染戦略にどのような意義をもたらしているのかを明らかにする。

## 研究成果

### (1) Stx17 の栄養下における役割の解析：

Stx17 は、オートファジーの開始点（隔離膜の形成）から終着点（オートファゴソームとリソソームとの融合）まで幅広く機能するタンパク質である。しかし、オートファジー以外（栄養下）での機能は不明であった。我々は栄養下における Stx17 の役割の解析も行っており、Stx17 は栄養下でミトコンドリア分裂因子である Drp1 と協調してミトコンドリアの形態制御に関わることを見いだした。また、栄養飢餓状態になると Stx17 が結合パートナーを Drp1 から Atg14L へと変換することでオートファジーに働くことも明らかにした（図 1）。

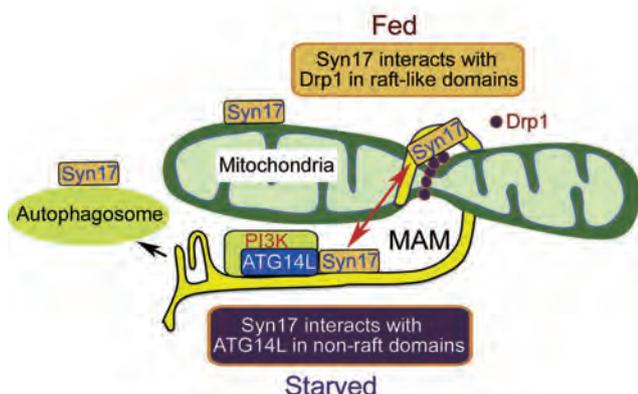


図 1

### (2) Stx17 を分解するレジオネラエフェクターの同定：

多くのレジオネラエフェクターは、レジオネラゲノム上のクラスター (island) にまとめてコードされている。そして、種々の island を欠損したレジオネラ株が作製されている。本欠損株を用いたスクリーニングを行なったところ、一つの island 欠損株において Stx17 の分解が抑制されていることを見だし、本 island にコードされている Ipg1137 を Stx17 分解に必須なレジオネラエフェクターとして同定した。

### 主な発表論文

1. Arasaki, K., Shimizu, H., Mogari, H., Nishida, N., Hirota, N., Furuno, A., Kudo, Y., Baba, M., Baba, N., Cheng, J., Fujimoto, T., Ishihara, N., Ortiz-Sandoval, C., Barlow, L. D., Raturi, A., Dohmae, N., Wakana, Y., Inoue, H., Tani, K., Dacks, J. B., Simmen, T., and \*Tagaya, M. Role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev. Cell* 32, 304-317 (2014).

### 主な学会発表

1. 新崎恒平、川端美緒、加藤郁子、多賀谷光男 レジオネラ菌感染に関わる Rab タンパク質の同定及びレジオネラ菌の小胞体定着化機構 第 88 回日本細菌学会総会（招待講演）岐阜 2015 年
2. 新崎恒平、川端美緒、野内優、多賀谷光男 レジオネラ菌の宿主小胞体への移行及び定着化の機構 第 87 回日本生化学会大会（オーガナイザー）京都 2014 年



# ミトコンドリア品質管理における融合・分裂の役割の再検討

代表者 石原 直忠

久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
(現：大阪大学・大学院理学研究科・教授)



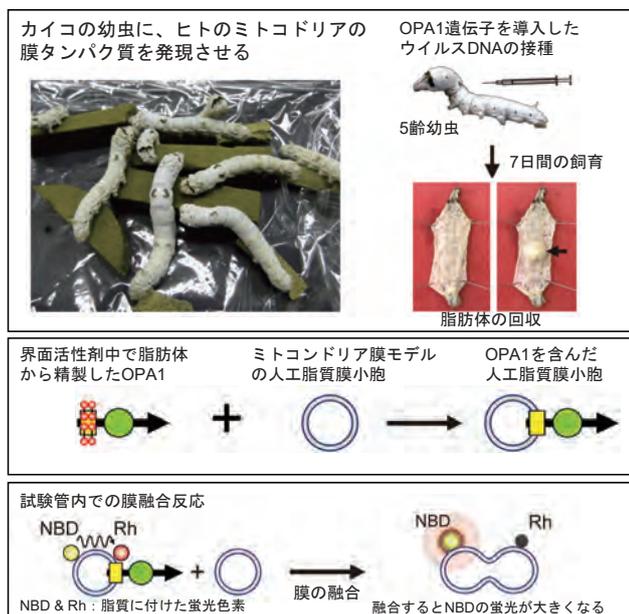
## 研究目的

家族性パーキンソン病の病因因子であるユビキチンリガーゼ Parkin が、膜電位を消失したミトコンドリアに局在化しオートファジー分解を促進するとの報告を契機としてマイトファジーの研究が発展してきた。我々は哺乳動物ミトコンドリアダイナミクスに注目し解析を進める中で、ミトコンドリアが失活し膜電位を消失すると、内膜融合を促進する GTPase タンパク質、L-OPA1 が特異的に切断され S-OPA1 に変換され、融合活性が失われることを見出している。これらの結果を基に「障害ミトコンドリアが分裂により隔離され、マイトファジー分解を受けることで、品質管理される」との経路が提案されている。本研究ではミトコンドリアダイナミクスとミトコンドリア品質管理の関連について詳細解析を行った。

## 研究成果

### (1) OPA1 によるミトコンドリア融合反応の詳細解析実験系の構築：

これまでに、ミトコンドリアが失活すると内膜融合因子 OPA1 が分解され融合活性を失うことを見出している。この制御機構をさらに詳細に調べるため、膜結合型の L-OPA1 を大量発現・精製する実験系を構築した。カイコ幼虫を用いてヒト L-OPA1 を発現させたところ、活性を持つタンパク質が精製可能となった。試験管内で膜融合反応を解析したところ、OPA1 の機能、特に GTP 加水分解の要求性や脂質に依存した膜融合反応の分子詳細を解析可能となった。



### (2) ミトコンドリア分裂による個体機能制御：

Drp1 の条件特異的欠損マウスを構築しその詳細解析を行うことで生体内でのミトコンドリア品質管理の理解を進めた。(2-1) マウス心筋のミトコンドリア分裂を抑制すると呼吸不全により新生児期致死となることがわかった。新生児期に心筋は大きく成長するが、この時期にミトコンドリア分裂が促進し、ミトコンドリア及び mtDNA が適切に配置されることがわかった(文献 1)。(2-2) 卵子特異的な Drp1 欠損マウスは不妊となり、ミトコンドリアによる細胞制御機構の停止が観察された。しかし、Drp1 の欠損により呼吸活性自体には大きな影響は見られなかった。これらのことから、ミトコンドリア分裂は重要な卵子の機能維持に重要であることがわかった(文献 5)。

## 主な発表論文

1. T. Ishihara, R. Ban-Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, A. Ichimura, S. Kyogoku, H. Aoki, S. Katada, K. Nakada, M. Nomura, N. Mizushima, K. Mihara, and N. Ishihara. Dynamics of mtDNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol. Cell. Biol.* 35: 211–223 (2015)
2. R. Ban-Ishihara, S. Tomohiro-Takamiya, M. Tani, J. Baudier, N. Ishihara, O. Kuge. COX assembly factor ccdc56 regulates mitochondrial morphology by affecting mitochondrial recruitment of Drp1. *FEBS Lett.* 589: 3126–3132 (2015)
3. T. Ishihara, H. Kohno, N. Ishihara. Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and mice development. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1350: 77–81 (2015)
4. A. Jahani-Asl, E. Huang, I. Irrcher, J. Rashidian, N. Ishihara, DC. Lagace, RS. Slack, DS. Park. CDK5 phosphorylates DRP1 and drives mitochondrial defects in NMDA-induced neuronal death. *Hum. Mol. Genet.* 24: 4573–4583 (2015)
5. O. Udagawa, T. Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, S. Tsukamoto, N. Kawano, K. Miyado, H. Shitara, S. Yokota, M. Nomura, K. Mihara, N. Mizushima, and N. Ishihara. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr. Biol.* 24: 2451–2458 (2014)

## 主な学会発表

1. 石原 直忠、ミトコンドリアの融合と分裂の生理的意義、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム、2015
2. N. Ishihara, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, T. Ban. Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and in mice development, the 11th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine: from Bench to Clinic (ASMRM 2014), 2014, Taipei, Taiwan, Nov. 2014



# オートファジー不全を伴う慢性膵炎発症メカニズムの解明

代表者 **大村谷 昌樹**

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授  
(現：兵庫医科大学・医学部・教授)



連携研究者 **桑 昭苑**

熊本大学・発生医学研究所・教授  
(現：東京工業大学・生命理工学部・教授)

## 研究目的

膵炎とは様々な要因により、膵臓が炎症を起こした総称である。ヒトおよび動物実験モデルの解析から、急性膵炎では空胞の出現が特徴の一つとされてきた。リソソームを介した細胞内分解系であるオートファジーの解明に伴い、この空胞がオートファジーに由来することが明らかとなってきた。オートファジーの機能低下、欠失によって、様々なヒト疾患に関わっていることも明らかになってきており、急性膵炎だけでなく、慢性膵炎においてもオートファジー不全がその発症に関わっている可能性が示唆されている。またオートファジーの活性低下によって蓄積する p62 タンパクによる炎症に及ぼす効果も明らかになってきており、オートファジーの制御が、膵炎治療の選択肢の一つとなる可能性がある。

本研究課題では慢性膵炎発症とオートファジー不全、膵内トリプシン活性との相関関係を遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。

## 研究成果

### (1) 膵炎とカテプシンに関する研究：

膵炎の発症には膵腺房細胞内で（異所性に）トリプシノーゲンがトリプシンに変換（活性化）されることがイニシエーションとなるが、その活性化を担うのが、カテプシン（特にカテプシン B）とされている。これまでシステインプロテアーゼのカテプシン B および L の解析はなされていたが、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D の役割は未解明であったため、順天堂大学内山教授よりカテプシン D flox マウスを譲渡していただき、膵臓特異的カテプシン D 欠損マウスを解析した。その結果、カテプシン D 欠損マウス膵臓では、オートファジーの活性に変化は見られず、また、トリプシノーゲンの活性化にも影響をおよぼさないことが明らかとなった。

新たにカテプシン B、L の flox マウスを樹立し、膵臓で特異的に BD、DL、BL の 2 重欠損マウスを樹立した結果、カテプシン BD 欠損マウスではオートファジー不全が生じ、Atg5 欠損マウスの膵臓とよく似た病理像を示すことも明らかとなった。

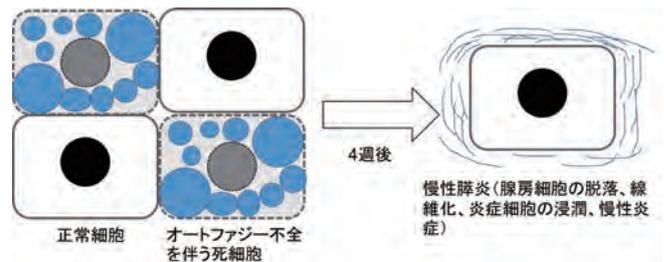
### (2) EGFR シグナル経路がオートファジーにおよぼす影響に関する研究：

オートファジーはさまざまな増殖因子によって制御されていることが知られている。我々は膵分泌性トリプシンインヒビター SPINK1 の研究を行っているが、この SPINK1（マウスのオルソログは Spink3）の欠損マウスの解析から膵腺房細胞に特異的にオートファジー不全が誘導されることを過去に示している。SPINK1 と上皮増殖因子 EGF との構造上の類似と SPINK1 が EGF レセプター（EGFR）に結合し、シグナルを活性化する点に着目し、膵特異的 Egfr 欠損マウスを作製し、オートファジーにおよぼす影響を調べたが、違

いは見られなかった。他のシグナルが代償している可能性が考えられた。

### (3) オートファジー不全を伴う細胞死が引き起こす慢性膵炎に関する研究：

Spink3 欠損マウスの膵臓にモザイク状に SPINK1 遺伝子を発現させて、正常腺房細胞とオートファジー不全を伴うネクローシス様死細胞が混在するマウスを作製した結果、生後 4 週齢でヒト慢性膵炎と類似したマウスを樹立することができた。このモデルにおいても LC-3II の上昇と p62 タンパクの蓄積が観察され、オートファジー不全と慢性膵炎の関連を示唆する結果となった（図）。



図

## 主な発表論文

1. Sakata K, Araki K, Nakano H, Nishina T, Komazawa-Sakon S, Murai S, Lee GE, Hashimoto D, Suzuki C, Uchiyama Y, Notohara K, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Yamamura KI, Baba H, [\\*Ohmuraya M](#). Novel method to rescue a lethal phenotype through integration of target gene onto the X-chromosome. *Sci Rep*. 6:37200 (2016).
2. Mehanna S, Suzuki C, Shibata M, Sunabori T, Imanaka T, Araki K, Yamamura K, Uchiyama Y, [\\*Ohmuraya M](#). Cathepsin D in pancreatic acinar cells is implicated in cathepsin B and L degradation, but not in autophagic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 469:405-11(2016).
3. Ida S, Ozaki N, Araki K, Hirashima K, Zaitu Y, Taki K, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Oki E, Morita M, Watanabe M, Maehara Y, Yamamura K, Baba H, [\\*Ohmuraya M](#). SPINK1 Status in Colorectal Cancer, Impact on Proliferation, and Role in Colitis-Associated Cancer. *Mol Cancer Res*. 13:1130-8(2015)
4. Ozaki N, Fukuchi Y, Tomiyoshi SR, Uehara H, Ida S, Wang J, Araki K, Sibilia M, Baba H, Yamamura K, [\\*Ohmuraya M](#). Autophagy regulation in pancreatic acinar cells is independent of epidermal growth factor receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 446:224-30 (2014)

## 主な学会発表

1. [Ohmuraya M](#), Gukovsky I, Notohara K, and Gukovskaya A. "Impaired Autophagy and Pancreatitis" The 10th JSGE-AGA Joint Meeting 2015
2. [Ohmuraya M](#), Sakata K, Gukovsky I, Notohara K, and Gukovskaya A. "Insufficient levels of SPINK induces impaired autophagy resulting to chronic pancreatitis" APA/JPS, 45th Anniversary Meeting 2014



# 神経細胞内の異常な リソソームとオートファゴ ソームの関わりについての 遺伝学的研究

代表者 小池 正人

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

連携 砂堀 毅彦

研究者 順天堂大学・大学院医学研究科・助教



## 研究目的

本研究課題では、神経系の異常なリソソームとオートファジーの関わりについて、カテプシン D 欠損マウスに蓄積する異常なリソソームの処理機構と、神経系における LAMTOR1 の役割に着目した遺伝学的検討を行う。加えて各種パーキンソン病モデルとオートファジー・リソソーム系の関わりについての遺伝学的検討、内在性 LC3 の免疫電顕による検出の最適化を図る。

## 研究成果

### (1) 小脳プルキンエ細胞特異的カテプシン D 欠損マウスと Atg7 欠損マウスの比較解析：

プルキンエ細胞特異的にカテプシン D および Atg7 を欠損させたマウスを作出し、その表現系を比較解析した。同マウスではともにプルキンエ細胞の変性が認められ、形態学的には、TUNEL 陰性、カスパーゼ非依存性の dark cell degeneration の特徴を示す細胞死によってプルキンエ細胞が死に至ることが明らかとなった。全身性のカテプシン D 欠損マウスに見られる海馬錐体細胞の細胞死については TUNEL 陽性であり、その一部は活性型カスパーゼ -3 が陽性であることから、カテプシン D 欠損マウスではその神経系の部位により変性過程のメカニズムが異なることを示している。加えて、プルキンエ細胞特異的カテプシン D および Atg7 欠損マウス小脳変性の時間経過を検討したところ、前者のほうが後者より約 1 ヶ月早く変性が起こることが分かった。プルキンエ細胞特異的カテプシン D 欠損プルキンエ細胞では異常なリソソーム、オートファゴソームの蓄積が顕著であり、これらが変性を加速させている可能性が示唆された(図 1)。

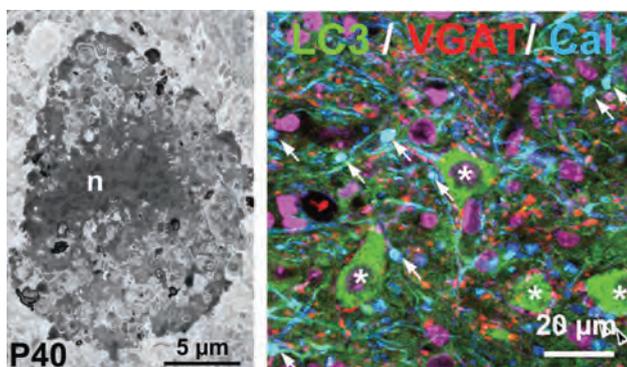


図 1 小脳プルキンエ細胞特異的カテプシン D 欠損マウス

左図は死に至るプルキンエ細胞の典型的なアポトーシスとは異なる電子顕微鏡像。右は小脳核における LC3、VGAT、カルビンジンの三重染色像で、矢印はこれらが共陽性となるプルキンエ細胞の軸索、細胞終末の腫大像を示している。

### (2) 中枢神経系における LAMTOR1 の役割：

中枢神経系特異的 LAMTOR1 欠損マウスが、生後 14 日で死に至り、グリア細胞の異常を認めることが示唆された。

### (3) 各種パーキンソン病モデルとオートファジー・リソソーム系の関わり：

IRP2 を過剰発現させた Parkin 欠損マウスにおけるドパミン細胞特異的変性を明らかにするとともに、リソソーム膜タンパク質 ATP13a2 の神経系特異的欠損マウスとカテプシン D 欠損マウスの比較解析を行い、共通する病変としてミトコンドリアの品質管理異常を認めることを明らかにした。

### (4) 内在性 LC3 の免疫電顕による検出の最適化：

ユトレヒト大学との国際共同研究により、凍結超薄切片法を用いた、内在性の LC3 の検出について、適切な一次抗体の選定、固定法、免疫反応法などについての最適プロトコルを確立した。

## 主な発表論文

1. Koike M, Shibata M, Şunaboğlu T, Yamaguchi J, Sakimura K, Komatsu M, Tanaka K, \*Uchiyama Y. Purkinje cells are more vulnerable to the specific depletion of cathepsin D than to that of Atg7. *Am J Pathol.* 187:1586-1600 (2017).
2. Koike M, Kawahara A, Shibata M, \*Uchiyama Y. Induction of autophagy in the hippocampus after hypoxic-ischemic injury to neonatal rats. *Arch Histol Cytol.* 77:13-23 (2017).
3. Sato S, Koike M, Funayama M, Ezaki J, Fukuda T, Ueno T, Uchiyama Y, Hattori N, Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain-specific ATP13a2-deficient mice. *Am J Pathol.* 186:3074-3082 (2016).
4. Nanao T, \*Koike M, Yamaguchi J, Sasaki M, \*Uchiyama Y. Cellular localization and tissue distribution of endogenous DFCP1 protein. *Biomed Res.* 36:121-133 (2015).
5. Asano T, Koike M, Sakata S, Takeda Y, Nakagawa T, Hatano T, Ohashi S, Funayama M, Yoshimi K, Asanuma M, Toyokuni S, Mochizuki S, Uchiyama Y, Hattori N, Iwai K. Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci Lett.* 588:29-35 (2015).

## 主な学会発表

1. Koike M. "The role of autophagy and lysosomal proteolysis for the maintenance of the normal environment of central nervous system" KOB (Kyushu Oral Biology) 2017.
2. De Mazière A, van Dijk S, Koike M, de Heus C, Klumperman, J. "An immunoelectron microscopy protocol for high resolution endogenous LC3 localization" Gordon Research Conference Autophagy in Stress, Development & Disease 2016.



# オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御

代表者 齊藤 達哉

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授  
(現：大阪大学・大学院薬学研究科・教授)



## 研究目的

自然免疫は、病原体の成分をパターン認識受容体により感知し、その排除を行う防御機構である。しかしながら、自然免疫は、過栄養摂取により蓄積する代謝物などにもパターン認識受容体を介して反応するため、過度の炎症を引き起こして生活習慣病などの発症要因ともなる。パターン認識受容体による異物の感知からサイトカインやインターフェロンなどの炎症性因子の産生に至るまでの情報伝達においては、オルガネラが重要な役割を果たすことが近年次々に解明されている。このオルガネラを介して誘導される自然免疫応答の制御機構として注目されているのが、オートファジーである。オートファジーは、細胞内クリアランス機構としてオルガネラターンオーバーの亢進や損傷オルガネラの除去を行うことにより、マクロファージをはじめとした自然免疫担当細胞の機能発現・恒常性維持に深く関わっている。本研究では、オートファジーが自然免疫の制御において果たす役割および自然免疫担当細胞におけるオートファジーの破綻が疾患の発症につながる機序の解明を目指して研究を行った。

## 研究成果

### (1) 自然免疫担当細胞におけるオートファジー活性と生活習慣病発症の関連性解明：

オートファジーの不足・不全により発症する疾患のモデルとして、高脂肪負荷による肥満性・糖尿病性の腎症を用いて検討を行った。自然免疫担当細胞であるマクロファージにおけるオートファジーが糖尿病性腎症の発症進展に与える影響については、未だ明らかでない。BALB/c 系統マウスは、C57BL/6 系統のマウスと比較して、腎炎に対してより高感受性を示すことが報告されていたため、マクロファージなどのミエロイド系細胞においてオートファジー関連因子 ATG7 を欠損させた遺伝子改変マウス (ATG7 flox/flox: Lyz-Cre マウス、C57/BL6 系統、小松計画班から分与を受けた) を、BALB/c 系統へと 8 世代以上バッククロスし、実験に用いた。当該マウスとコントロールマウスの腹腔や骨髄からマクロファージを回収し、脂肪酸刺激したところ、ATG7 flox/flox: Lyz-Cre マウスのマクロファージでは、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生が亢進し、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の過剰産生が誘導された。さらに、腹腔内に脂肪酸を投与したところ、コントロールマウスでは僅かな尿細管障害が惹起されたただけであったのに対して、ATG7 flox/flox: Lyz-Cre マウスでは強い尿細管障害が惹起された。本研究で樹立した BALB/c 系統 ATG7 flox/flox: Lyz-Cre マウスは、オートファジーの生理的・病理的な役割の解析に加えて、肥満性・糖尿病性の腎症を自然免疫依存的な炎症の観点から解析する際に有用なツールとなることが期待される。

### (2) 自然免疫担当細胞においてオートファジー活性と関連するバイオマーカーの探索：

オートファジー不全に陥ると、細胞外に放出されるタンパク質群に変化が起こり、周囲の健全な組織や細胞に悪影響を与えて疾患発症に至る可能性が示されている。また、オートファジー活性と関連する形で細胞外に放出されるバイオマーカーを同定することができれば、血液検査や尿検査などの簡便な手法によるオートファジー活性の評価が可能となる。そこで、プロテオミクス的手法を用いて、オートファジーバイオマーカーの探索を行った。

野生型マウスおよび ATG7 遺伝子欠損マウスから胚性肝臓由来マクロファージを調製し、生活習慣病の病態を模した条件において培養した。オートファジー活性に相関して細胞外への放出が変動する因子を、液体クロマトグラフィーおよび質量分析により網羅的に同定した。培養上清画分から約 4,000 のタンパク質を同定し、ATG7 に依存して放出されるものとしてはカテプシン類などのリソソーム内容物を同定した。マクロファージにおいては、ATG7 依存的にリソソームエキソサイトーシスが誘導されることが示唆された。当該反応がオートファジーにより制御されているのか、また当該反応にどのような生理的・病理的な意義があるのかについては、継続して解析を進めている。

## 主な発表論文

1. Takahama M, \*Akira S, \*Saitoh T. Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol Rev.* 281:62-73. (2018)
2. Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, \*Yamamoto M. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol.* 18:899-910. (2017)
3. \*Saitoh T, Akira S. Regulation of inflammasomes by autophagy. *J Allergy Clin Immunol.* 138:28-36.(2016)
4. Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, \*Yamamoto M. p62 Plays a Specific Role in Interferon- $\gamma$ -Induced Presentation of a Toxoplasma Vacuolar Antigen. *Cell Rep.* 13:223-233. (2015)
5. Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, Fujita N, Saitoh T, Akira S, Yoshimori T, Sibley LD, \*Hwang S, \*Virgin HW. The parasitophorous vacuole membrane of Toxoplasma gondii is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. *Immunity.* 40:1-12.(2014)

## 主な学会発表

1. Saitoh T. "Regulation of innate immune response by autophagy" The 2014 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists. 2014.
2. 齊藤達哉. "自然免疫応答の制御におけるオートファジーの役割" 日本病態プロテアーゼ学会. 2014.



# 腸管寄生性原虫 赤痢アメーバにおける オートファジーの解析

代表者 津久井 久美子

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官



## 研究目的

オートファジーは単細胞・多細胞生物において生体の恒常性維持に重要な役割を持ち、真核生物に広く存在する生物現象である。実際オートファジーのマーカー分子である Atg8 は真核生物の全ての系統に存在しており、真核生物の共通祖先細胞ですでに確立された分子メカニズムであったと考えられる。しかしこれを欠損する生物も多様な系統で見いだされており、進化の中で分子過程や機能の多様性が予想された。

我々は腸管寄生性原虫赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の病原機構を研究する中で、*Entamoeba invadens* を用いたシスト化モデルにおいて Atg8 の発現、脂質修飾の上昇が起こることを見いだした。よって *Entamoeba* 属原虫のシスト化にオートファジーの関与を予想していた。しかし赤痢アメーバ Atg8 は富栄養状態でも脂質修飾型が存在し、血清、グルコース飢餓による局在変化は明らかでなかった。よって赤痢アメーバ栄養体で Atg8 は飢餓ストレス誘導オートファジー以外の機能を持つと考えた。

そこで本研究では赤痢アメーバにおいて Atg8 の関与する分子過程を明らかにすることを目指した。これにより Atg 遺伝子による新しい膜輸送制御機構を解明し、オートファジーという現象の普遍性と多様性を明らかにすることが期待された。

## 研究成果

### (1) Atg8 の貪食胞成熟過程への関与：

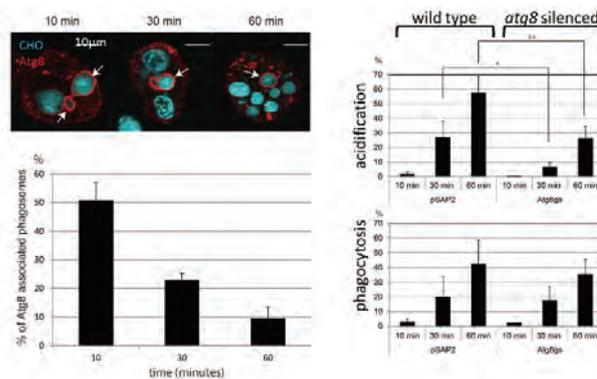
赤痢アメーバ Atg8 は動物細胞を貪食させ、貪食胞の観察を行うと閉鎖前の貪食胞および初期貪食胞に局在した (図左)。酸性化依存的に発色する色素を結合した大腸菌を貪食させると、Atg8 の遺伝子発現抑制株で酸性化が阻害されていることが示された (図右上段)。貪食効率に大きな差は無いことから (図右下段)、Atg8 は貪食胞酸性化に関与する事が示された。Atg8 がどのように貪食胞の成熟を制御するのか、今後の検討が必要である。

### (2) Atg8 結合分子の同定：

Atg8 の機能を知るため、結合分子の同定を行った。富栄養状態で培養している野生株、HA-Atg8 発現株とベクターコントロール株から、抗 Atg8 抗体または抗 HA 抗体で免疫沈降と質量分析により結合分子を同定した。Atg3, Atg7 以外に解糖系酵素が複数同定され、赤痢アメーバ Atg8 がエネルギー代謝に関与する事が示唆された。赤痢アメーバは嫌気性生物であり、ATP 産生は解糖系のみが担っている。よって Atg8 がエネルギー状態の監視やシストへの分化に関与する可能性が考えられた。

### (3) Atg5-12/16 複合体存在の証明：

赤痢アメーバには Atg5-12/16 複合体が存在するか明らかでなかった。そこで e-value  $1 \times 10^{-4}$  と弱いながら Atg12 ドメインが予想された Atg12 候補遺伝子について、発現抑制株を作製した。この遺伝子発現抑制株では Atg8 の脂質修飾が阻害されたことから、赤痢アメーバにも Atg5-12/16 複合体が存在することが実験的に示された。よって赤痢アメーバにはアミノ酸レベルでの変化は大きい、モデル生物と相同の Atg8 脂質修飾機構が保存されていると考えられた。



Atg8 の貪食胞成熟への関与

(上) CHO 細胞と示した時間共培養した赤痢アメーバ；(下) Atg8 が局在する貪食胞の割合。

(上) 酸性化依存的発色色素結合大腸菌、(下) 蛍光色素結合大腸菌、と示した時間共培養し、シグナルをもつ赤痢アメーバの割合を FACS で解析した。

## 主な発表論文

- Piczarri K\*, Nakada-Tsukui K\*, Tsuboi K, Miyamoto E, Watanabe N, Kawakami E, Nozaki T. Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 17:1510-22 (2015) (\*; equal contribution)

## 主な学会発表

- Kumiko Nakada-Tsukui, "Atg8 is involved in endosome/phagosome maturation in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*" Cell Biology 2016, ASCB Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 2016.
- Kumiko Nakada-Tsukui, "Functional analysis of autophagy protein Atg8 in *Entamoeba histolytica*", Conference on Amoebiasis, AMOEBA Meeting, Delhi, India, 2016.
- Kumiko Nakada-Tsukui, "Conservation and uniqueness of the lysosome traffic in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*." 25th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium, Athens, GA, USA, 2015.



# オートファジーの 内耳生理機能および 加齢性内耳障害への関与

代表者 藤本 千里

東京大学・大学院医学系研究科・助教  
(現：東京通信病院・耳鼻咽喉科・医長)

連携研究者 水島 昇

東京大学・大学院医学系研究科・教授

山岨 達也

東京大学・大学院医学系研究科・教授

岩崎 真一

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

吉川 弥生

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

(現：東京大学・医学部附属病院・助教)



## 研究目的

内耳の感覚細胞である有毛細胞は特化された微細構造を持ち、音や加速度といった機械的刺激を生体内の電気信号に変換するという非常に巧妙な機能を担うが、細胞分裂せず一度障害を受けると機能的再生が困難なため、細胞の恒常性維持が特に重要である。内耳の加齢変化は不可逆性であり、有効な治療法は存在しない。本研究では、細胞内品質管理機構であるオートファジーに着目し、有毛細胞における恒常的オートファジーの生理機能、有毛細胞の加齢変化におけるオートファジーの果たす役割を明らかにすることを旨とした。

## 研究成果

### (1) 蝸牛有毛細胞におけるオートファジーの活性：

まず、GFP-LC3 マウスを用い有毛細胞におけるオートファジーの活性を観察した。5 日齢蝸牛器官培養系において、リソソームプロテアーゼ阻害剤 (pepstatin A と E64d) 投与群は非投与群と比較して、LC3 puncta 数が有意に多くなっており、蝸牛有毛細胞におけるオートファジーの活性が確認された。

### (2) 蝸牛有毛細胞にてオートファジーが欠損する $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$ マウスの作製：

次に、蝸牛有毛細胞にてオートファジーが欠損するノックアウトマウス ( $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウス) を作製した。 $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre; GFP-LC3$  マウス有毛細胞内の LC3 puncta の消失を確認した。また、 $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスの蝸牛有毛細胞にて、細胞内単位面積当たりのユビキチン-p62 陽性の封入体数が、5 日齢と 14 日齢のいずれにおいても増加していることを確認した。

### (3) $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$ マウスの聴覚機能・形態解析：

$Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスの聴覚機能を聴性脳幹反応にて評価したところ、14 日齢以降において高度難聴を呈した。また、 $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスは、5 日齢では正常形態であったが、14 日齢では多くの聴毛の障害、および一部の細胞の脱落を認めた。8 週齢では、多くの有毛細胞の脱落を認めた。

さらに、5 日齢の蝸牛器官培養系を用いて、 $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスの mechanotransduction の機能を FM1-43 の取り込みにて測定したところ、すべての有毛細胞で陽性であった。一方 tip link の構造を破壊する BAPTA の存在下では、FM1-43 陽性細胞は消失した。よって上記

の取り込みは、聴毛レベルの mechanotransduction の機能を反映すると考えられた。

以上より、蝸牛有毛細胞において恒常的オートファジー不全を来す  $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスが、有毛細胞障害および先天性の高度難聴を呈することが示された。 $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスは、5 日齢においては、ユビキチン-p62 陽性の封入体形成は認められるものの、形態は正常で mechanotransduction の機能は聴毛レベルでは正常であった。よって  $Atg5^{flox/flox}; Pou4f3-Cre$  マウスでは、有毛細胞の発生異常ではなく細胞変性により先天性難聴を来すと考えられた (図 1)。マウスにおいて、有毛細胞におけるオートファジーは、マウスの生後に聴覚系が成熟するまでの期間の細胞形態の維持に重要な役割を果たすと考えられた。

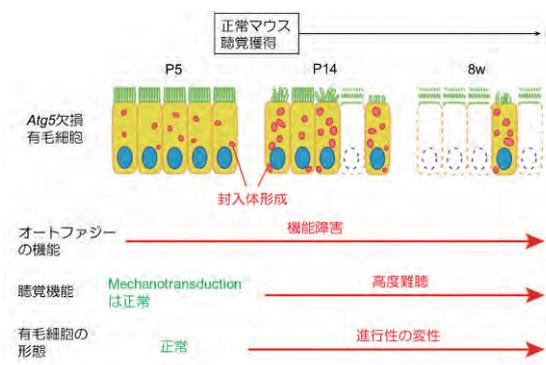


図 1

## 主な発表論文

1. [\\*Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, Morishita H, Sakamaki Y, Fujioka M, Kondo K, Mizushima N, \\*Yamasoba T.](#) Autophagy is essential for hearing in mice. *Cell Death Dis.* 11;8(5):e2780 (2017).

## 主な学会発表

1. 藤本千里、岩崎真一、浦田真次、藤岡正人、近藤健二、山岨達也。有毛細胞における恒常性オートファジーは聴覚機能に重要である。第 118 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会。2017
2. 藤本千里、岩崎真一、浦田真次、藤岡正人、近藤健二、山岨達也。オートファジー活性の低下による有毛細胞の変性。第 17 回日本抗加齢医学会総会。2017
3. [Fujimoto C, Iwasaki S, Urata S, Kondo K, Yamasoba T.](#) "Autophagy is essential for hearing in mice." IFOS 2017.



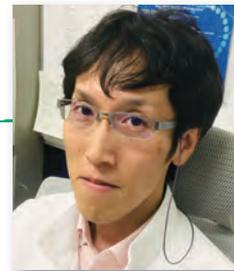
# オートファジー関連神経変性疾患の治療法開発に向けた iPS 細胞の樹立と病態解明

代表者 村松 一洋

群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
(現：自治医科大学・小児科・准教授)

連携研究者 才津 浩智

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授  
(現：浜松医科大学・医学部・教授)



## 研究目的

脳への鉄沈着、パーキンソン様症状、知的障害を主症状とした、小児期発症後成人期に急速に進行し知的退行を認め認知症を経て寝たきりとなる神経変性症の新たな垂系 SENDA の原因遺伝子が *WDR45* であること、SENDA の病態はオートファジー機能不全と密接に関与していることが明らかにされてきた (Nat. Genet. 2013)。しかしながら、これは SENDA の病態解明の第一歩に過ぎない。なぜ神経組織にのみ影響が生じるのか、なぜ脳に鉄が沈着するのか、なぜ二十数年の経過を経て急速に進行するのか、オートファジー機能を促進すれば改善するのかなど多くの疑問は現時点では未解明である。疾患の発症と進行を抑制する新たな治療法を開発することを実現するには、細胞生物学的視点に基づく詳細な病態の把握が重要であり、さらには臨床的な視点も必須である。

本研究において、SENDA 患者の多能性幹細胞の樹立すること、オートファジー機能不全が鉄代謝を介した神経細胞傷害をもたらす機構を解明すること、これらの知見を基に実際の医療へ応用することを目指す。

## 研究成果

オートファジー関連神経変性疾患の iPS 細胞樹立と病態解明を目指して研究を進め、下記の結果を得た。

### (1) 鉄代謝に与える影響：

iPS 細胞樹立までの間のパイロットスタディとして、ヒト胎児由来のドパミン細胞株 (LUHMES cell) の分化及び未分化状態での培養系を確立し、神経細胞の性質評価として各種マーカー蛋白による免疫蛍光染色を実施し、本研究での使用において適切であることを確認した。

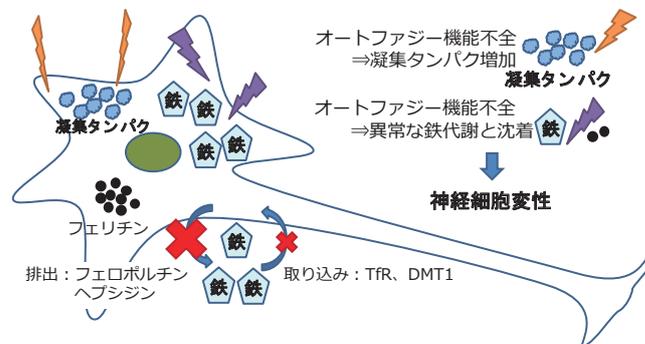
次にこの細胞株を用いて、オートファジー関連神経変性疾患である *WDR45* 異常症のモデルとして siRNA による機能抑制株を作製した。この細胞株を用いて、RT-PCR にて様々な因子の発現量を検討したところ、オートファジー関連因子や鉄代謝関連因子の発現において下記に示すような変化が見いだされた。

この細胞株では、フェリチンとヘプシジンの有意な増加、鉄の増加および鉄の排出を担うフェロポルチンの有意な低下、吸収を担うトランスフェリン受容体 (TfR) および DMT1 の低下が認められた。フェロポルチンを抑制するヘプシジンの増加とフェロポルチン自体の低下による鉄の排出機構が抑制され、TfR と DMT1 の低下による鉄の吸収低下を上回るというバランスの崩れが細胞内での鉄の排出機能不全を招き、同時にフェリチンの増加を生じているのではないかと推測された (図)。

オートファジーマーカーである *LC3A*、*ATG2A* および *ATG2B* は低下傾向を示しており、*WDR45* がコードする分子 *WIPI4* を含む *WIPIs* と相互作用を有する *ATG2* の発現に何らかの影響があることが示唆された。

*LC3B*、*IREB2* は *WDR45* の機能抑制株での変動は認められなかった。

鉄関連分子の発現の増減は細胞内外での鉄の動態に影響すると考えられ、*WDR45* 機能異常による疾患と鉄代謝異常の関係を示唆するものである。



図

### (2) 脳病理組織の解析：

剖検脳組織の解析に着手した。マクロの所見としては著明な脳萎縮があり、黒質には肉眼的にも識別可能な程に赤褐色に変色していた。淡蒼球、黒質共に鉄染色は陽性であった。今後は組織標本を作製し、オートファジー機能と鉄代謝の解析を進める。

### (3) 疾患 iPS 細胞の樹立：

疾患 iPS 細胞については患者線維芽細胞の iPS 細胞化を進めた。

### 主な発表論文

- Ozawa T, Koide R, Nakata Y, Şaitşu H, Matsumoto N, Takahashi K, Nakano I, Orimo S. A novel *WDR45* mutation in a patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA). *Am J Med Genet A*. 164A(9):2388-90 (2014)
- Ohba C, Nabatame S, Iijima Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Ozono K, Şaitşu H, Matsumoto N. De novo *WDR45* mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. *J Hum Genet*. 59(5):292-5 (2014)

### 主な学会発表

- 村松一洋 第 57 回日本小児神経学会シンポジウム「オートファジーと小児神経疾患」シンポジスト (2015) 大阪
- 村松一洋 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム「病態メカニズムへのオートファジーの多様な関与」シンポジスト (2014) 京都

# ショウジョウバエモデルによるクローン病発症の分子機構解明

代表者 矢野 環

東北大学・大学院薬学研究科・准教授



## 研究目的

オートファジーの機能不全はさまざまなヒト疾患と関連するが、中でも、炎症性腸疾患であるクローン病は、ヒト患者のゲノムワイドな疫学研究から、オートファジー因子の機能不全がその遺伝的要因となっていることが明らかとなっている。しかしながらクローン病の病態は、腸内細菌や腸管感染性ウイルスなど、腸管内の微生物が環境要因として作用することで、複雑に影響される。そのため、病態を引き起こす根本原因と、炎症が起きた結果生じてくる現象を見分けることが困難であり、疾病の根本治療の基盤となる知見が得られていないのが現状である。また、オートファジー因子の機能欠失によるモデルマウスを用いた研究では、獲得免疫による炎症の増悪がおり、発症原因の解析を困難にしている。

そこで、本研究課題では、自然免疫のみを有し獲得免疫を持たないショウジョウバエをモデル生物として用い、オートファジー不全腸管において炎症を生じさせる根本原因の種を越えて普遍的な分子機構を解析することを目的とした。

## 研究成果

### (1) 腸管上皮細胞におけるオートファジーの腸内常在菌に対する自然免疫寛容機構としての機能：

ショウジョウバエ腸管上皮組織はほ乳類と同様、組織幹細胞と分化した上皮細胞が1層の層状構造を形成している。本研究では上皮細胞特異的な各オートファジー因子ノックダウンによるオートファジー不全個体を作製し、機能解析を行った。その結果、腸管上皮細胞におけるオートファジー不全が、病原体非感染下で上皮細胞からのサイトカイン分泌亢進を介した幹細胞分裂異常亢進をおこすこと、その結果として、ほ乳類のタイトジャンクションにあたる細胞間接着部位に局在するタンパク質 Discs large (Dlg) 局在異常をおこすこと、さらに、加齢腸管でおきる腸管バリア機能の破綻が亢進してより若年で起きるようになること、それによる全身性の炎症が起きることを明らかにした。

さらに、腸管炎症に対する腸内細菌叢の関与を検討した。オートファジー不全は腸内細菌叢の細菌数とその種類を変化させず、さらに、無菌個体に菌を経口摂取させる事による腸内細菌叢の再構築実験により、オートファジーが正常に機能している腸管に対してはなんら炎症を起こさない腸内常在菌が、オートファジー不全腸管に作用して炎症を惹起することを明らかにした。また、この炎症は腸管上皮細胞が腸内常在菌に対して産生している低レベルの活性酸素種 (ROS) が腸管上皮細胞に作用しておきることを示した。すなわち、上皮細胞におけるオートファジーは、腸内常在菌に対する自然免疫寛容機構として機能していることが明らかとなった。

### (2) 選択的オートファジーの基質 Ref(2)P/p62 依存的細胞内シグナル制御：

腸管上皮細胞におけるオートファジーによる ROS 応答反応の制御の分子機構を検討し、オートファジー不全により JNK 経路の活性化と抑制性シグナル経路である Hippo 経路の不活化が、選択的オートファジーの基質である Ref(2)P/p62 をシグナルプラットフォームとして起きていること、オートファジーがこれを量的に負に制御していることを明らかにした (図 1)。

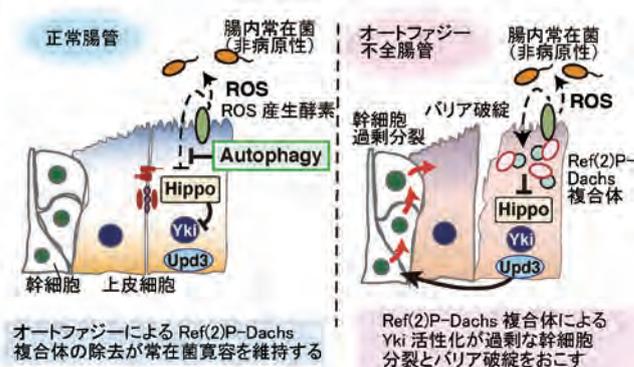


図 1

腸内常在菌によっておきる Ref(2)P/p62 を起点とした不要な損傷応答がオートファジーによって量的に制御される

## 主な発表論文

- Nagai, H. [Yano, T.](#) Kurata S. Role of Autophagy in *Drosophila* Innate Immunity. *Invert. Surv. J.* 155-157 (2015)
- [Yano, T.](#) Kurata, S. Elimination of intracellular bacteria by autophagy. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, edited by M.A. Hayat. pp203-210. Academic Press (2014)

## 主な学会発表

- [Yano, T.](#) "Autophagy-mediated intestinal homeostasis in *Drosophila*." Gordon Research Conference: Autophagy in Stress, Development and Disease. 2018.
- Nagai, H. Kurata, S. [Yano, T.](#) "Autophagy ensures homeostatic state of *Drosophila* intestinal epithelia in the response of enteric bacteria" The 8<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy 2017



# 膵β細胞オートファジー不全と p62 陽性の封入体形成

代表者 綿田 裕孝

順天堂大学・大学院医学研究科・教授



## 研究目的

これまで、糖尿病の病態生理における膵β細胞のオートファジーの意義に注目し、研究を展開してきた。その結果、ヒト 2 型糖尿病やそのモデルマウスの膵β細胞がオートファジー不全状態にあることが示唆された (Abe H. et al Endocrinology 2013)。そこで、オートファジー不全と膵β細胞不全の因果関係解明のため膵β細胞オートファジー不全モデルマウスβ ATG7KO マウスを作製した。その結果、オートファジー機構の破綻は、ブドウ糖応答性インスリン分泌不全、インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償不全等、2 型糖尿病の本質的欠陥に類似した病態を呈することが明らかになり (Ebato C. et al., Cell Metab. 2008)、オートファジー不全が膵β細胞不全の原因となりうるということが明らかとなった。

ヒト 2 型糖尿病の剖検例では、膵β細胞に頻繁にアミロイドの沈着が認められる。本アミロイドの正体は膵β細胞特異的に発現するアミロイドタンパク、Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) であるが、げっ歯類の IAPP はヒトの IAPP と異なり易凝集性がなく、細胞毒性が弱い。そこで、ヒト 2 型糖尿病の病態生理に迫るため、ヒト IAPP による膵β細胞毒性に対して、オートファジー機構がどのような作用を有するかということを中心に、オートファジー機構による膵β細胞保護効果の分子メカニズムの解明を目的とする。本研究で目指す膵β細胞のオートファジーの病態生理学的意義の解明は、膵β細胞生物学の発展に大きく貢献するだけでなく、新規糖尿病治療の新たな分子標的の同定につながると思われる。

## 研究成果

### (1) 膵β細胞株を用いたヒト IAPP によるオートファジーの誘導とその意義：

膵β細胞株 INS-1 細胞をラット IAPP とヒト IAPP で処理した。その結果、ヒト IAPP 処理によりオートファゴソーム数が増加し、さらにオートファジーフラックスが増加することが明らかとなった。

次に、このヒト IAPP によるオートファジーの活性化の意義に関して膵β細胞株の viability を評価した。そのためにテトラサイクリン誘導性 Atg7 ノックダウン (KD)INS-1 細胞株を作製した。まず、この細胞にラット IAPP とヒト IAPP を処理するとラット IAPP 処理に比べてヒト IAPP 処理により細胞数が低下した。一方、ラット IAPP 処理化で Atg7KD を誘導すると細胞数が低下したが、ヒト IAPP 処理下で Atg7KD を誘導するとラット IAPP 処理化の Atg7KD 誘導よりもさらに細胞死が著明に亢進した。したがって、膵β細胞はヒト IAPP 処理時にオートファジーが誘導されるが、この機構を通じてヒト IAPP 毒性を緩和させるものと考えられた。

### (2) 生体におけるヒト IAPP 発現とオートファジー不全の意義：

次に生体におけるヒト IAPP 発現とオートファジー不全との関連に関して検討する目的でマウス IAPP 遺伝子座をヒト IAPP 遺伝子に置換したヒト IAPP ノックイン (hiAPPKI) マウスを入手。β Atg7KO マウスとを交配させ、1) コントロールマウス 2) hiAPPKI マウス 3) β Atg7KO マウス 4) hiAPPKI マウス X β Atg7KO マウスを作製して、それぞれのマウスに正常食あるいは高脂肪食を摂取させ、膵β細胞の形状と膵β細胞容積を評価した。コントロールマウスでは高脂肪食負荷により膵β細胞容積が約 3 倍に増加したが、hiAPPKI マウスあるいは β Atg7KO マウスではその増加が約 2 倍に留まった。4) hiAPPKI マウス X β Atg7KO マウスでは膵β細胞容積の増加がほとんど認められず、インスリン抵抗性に対する膵β細胞増加不全が認められた。

また、形態変化としては、hiAPPKI マウス X β Atg7KO マウスにおいて hiAPP の toxic oligomer 形成の亢進が認められた。以上より膵β細胞のオートファジー機構は hiAPP の toxic oligomer 形成を結果的に抑制し、膵β細胞毒性から膵β細胞を保護していることが明らかになった (図 1)。

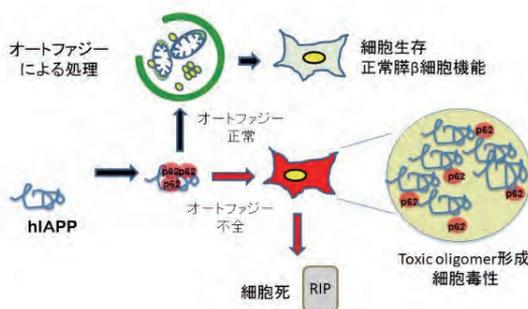


図 1

## 主な発表論文

1. Honda A, Komiya K, Hara A, Fukunaka A, Suzuki L, Miyatsuka T, Ogihara T, Fujitani Y, Watada H. Normal pancreatic β -cell function in mice with RIP-Cre-mediated inactivation of p62/SQSTM1. *Endocr J*. 2018;65(1):83-89.
2. Watada H, Fujitani Y. Minireview: Autophagy in pancreatic β -cells and its implication in diabetes. *Mol Endocrinol*. 2015;29(3):338-48.
3. Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Fujitani Y, Ueno T, Takeda S, Watada H. Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(1):19-24.
4. Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y, Watada H. Human IAPP-induced pancreatic β cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3634-44.

# Crinophagy による 分泌顆粒膜融合経路の メカニズム解析

代表者 板倉 英祐

千葉大学・大学院理学研究院・助教



## 研究目的

細胞内のタンパク質は損傷・老化・不要化すると分解酵素を含むリソソーム内などへ輸送され分解される。そのためリソソームへの輸送が阻害されると、不良タンパク質の蓄積が引き起こされ、多様な疾患の原因となりうる。リソソームへ輸送される輸送経路は複数あり、基質輸送はオートファジーやエンドサイトーシス、ゴルジ体によって形成される小胞などの膜構造体が利用される。Crinophagy は分泌顆粒小胞をリソソームへ輸送する経路である。細胞膜へ標的化されていた分泌ホルモンを含有する分泌顆粒膜が輸送経路の運命を切り替え、リソソームへと膜輸送される経路であるが、その分子メカニズムは明らかとなっていない。我々は crinophagy 経路を明らかとするため、哺乳類培養細胞で pH 感受性と非感受性蛍光タンパク質を利用してリソソーム輸送をモニターする新しい 2 種類のアッセイ法を構築し、リソソームへの輸送経路の正常性を測定する lysosome アッセイ法と、ホルモンが分泌顆粒内からリソソームへ輸送される量を測定する crinophagy アッセイ法を開発した。これらアッセイ法を用いてリソソーム輸送経路の分子機構の解明を試みた。

## 研究成果

### (1) Crinophagy 誘導経路の発見：

まず crinophagy アッセイ法によって、どのような刺激時にインスリン産生細胞内のインスリンがリソソーム分解されるのか調べた。その結果、インスリン前駆体はゴルジ体異常が起きると、分泌顆粒へ輸送されず、未成熟のままリソソームへ運ばれ分解されることがわかった。さらにインスリン顆粒の分解に着目したところ、ドーパミンシグナルに応じて成熟型インスリン顆粒がリソソーム分解されることを見出した。さらにドーパミン受容体を阻害させるとインスリン顆粒のリソソーム性分解が抑制された。これらのことから、分泌顆粒膜とリソソーム膜の融合の促進にドーパミンシグナルが関わっている可能性が示唆された (図 1)。

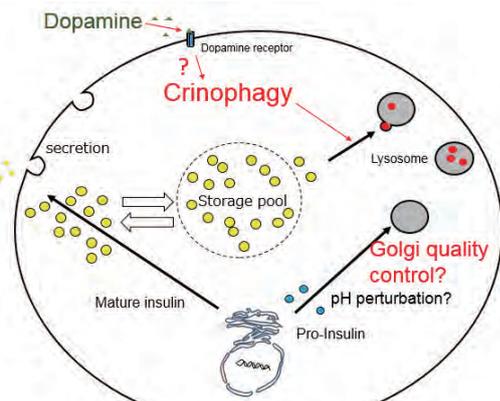


図 1

### (2) リソソーム経路制御機構の探索：

リソソーム輸送に関わる新規経路を探索するため、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いてリソソーム経路に関わる化合物を lysosome アッセイ法によって調べた。その結果、リソソームの活性化と不活性化に関わる経路が複数示唆されたため、それぞれの経路に共通する関連因子を絞り込み、輸送経路の詳細を調べた。これまでリソソームの活性化経路には転写因子 TFEB が関与することが知られているが、我々の結果から TFEB 非依存的な経路の存在が示唆された。

### (3) 強制リポファジーの開発と応用：

選択的オートファジーを人工的に操作できるシステムを構築した。脂肪滴局在タンパク質とオートファゴソーム局在タンパク質を融合させた Tip47-p62 タンパク質を細胞内に発現させると、オートファジー依存的に脂肪滴が効率的に分解されることを発見した。マウス受精卵にこのシステムを応用したところ、初期胚発生の過程に脂肪滴が重要な役割を担っていることがわかった。

## 主な発表論文

1. Tatsumi T, Takayama K, Ishii S, Yamamoto A, Hara T, Minami N, Miyasaka N, Kubota T, Matsuura A, [\\*Itakura E](#) & \*Tsukamoto S, Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse. *Development* 2018 Feb 23;145(4). pii: dev161893. doi: 10.1242/dev.161893.
2. Takayama K, Matsuura A, [\\*Itakura E](#) Dissection of ubiquitinated protein degradation by basal autophagy. *FEBS Lett.* 2017 May;591(9):1199-1211 (selected as an Editor's Choice)

## 主な学会発表

1. Ishii S., Matsuura A., [Itakura E.](#) "A novel probe for a "lysosomal integrity assay"" The 8th International Symposium on Autophagy 2017
2. Takayama K., Matsuura A., [Itakura E.](#) "Understanding the relationship between ubiquitinated proteins and constitutive autophagy." American Society for Cell Biology 2016



# マイトファジー誘導時に 駆動されるミトコンドリア 分裂の分子基盤

代表者 岡本 浩二

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授



## 研究目的

ミトコンドリアを特異的に丸ごと分別・除去する機構は「マイトファジー」と呼ばれ、ミトコンドリアの量や品質を管理するシステムとして脚光を浴びている。私の研究グループは、選択的ミトコンドリア分解に重要な新規因子として Om14 を見出した。興味深いことに、マイトファジー誘導時に起こるミトコンドリアの断片化が、Om14 欠損細胞では強く抑制されている。本研究では、Om14 とその相互作用因子がいつ・どこで・どのように、マイトファジーを促進するためのミトコンドリア分裂を制御しているかについて、明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

通常、ミトコンドリアは紐状に長く伸びたチューブラー（長さ 2-10 μm）の形態をしており、マイトファジーでミトコンドリアが効率よく隔離されるためには、オートファゴソームの大きさ（直径 0.2-0.3 μm）程度までミトコンドリアが小さくなる必要がある。酵母では、ダイナミン様 GTPase Dnm1 がミトコンドリアの分裂を駆動するが、Dnm1 欠損細胞においてもマイトファジーは約 70% の効率で起こる（未発表）。このことは、Dnm1 以外の因子によるミトコンドリア断片化を示唆している。申請者らのグループは最近、ミトコンドリア外膜タンパク質 Om14 を欠損すると、マイトファジー誘導時に起こるミトコンドリアの断片化がほぼ完全に抑制され、分解も 50% まで低下することを見出した。また、マイトファジーが誘導される非発酵性条件下において、Om14 のタンパク質レベルが発酵条件下の 10-20 倍に上昇することもわかった。なお、OM14 遺伝子にはイントロンが 1 個存在するが、Om14 のミトコンドリア断片化機能には必要ない。

興味深いことに、Om14 がミトコンドリア外膜の電位依存性陰イオンチャンネル Por1 と相互作用すること、Por1 欠損や Om14 Por1 二重欠損でミトコンドリアの形態異常が観察され、マイトファジーがそれぞれ 15% と 5% まで低下することもわかった。Por1 はミトコンドリア内膜タンパク質 Mdm31 と相互作用し、リン脂質ホスファチジン酸 (PA) の外膜から内膜への輸送に働くこと、Mdm31 欠損のミトコンドリア形態異常は Por1 欠損のそれと似ていること、PA がミトコンドリア分裂を抑制することが知られている。これらの知見から、Om14 は Por1 と相互作用することでミトコンドリア外膜の PA レベルを低下させ、ミトコンドリア断片化を駆動している可能性が提起された。

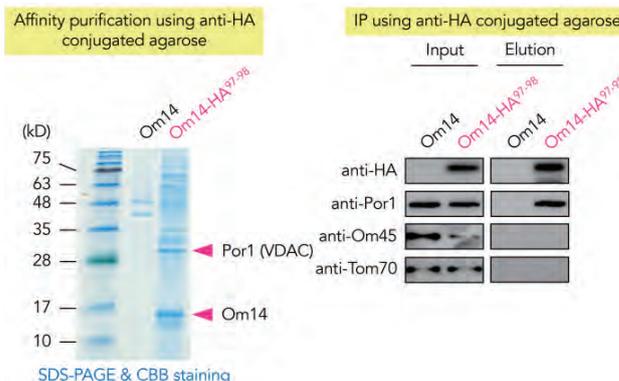


図 Om14 相互作用因子のアフィニティー精製と質量分析 Om14 と Por1 の相互作用を免疫共沈降アッセイで確認した。ミトコンドリア外膜タンパク質 Om45 や Tom70 との相互作用は見られない。

## 主な発表論文

1. Yamada T, Murata D, Adachi Y, Itoh K, Kameoka S, Igarashi A, Kato T, Araki Y, Huganir RL, Dawson TM, Yanagawa T, Okamoto K, Iijima M, \*Sesaki H. Mitochondrial stasis reveals p62-mediated ubiquitination in Parkin-independent mitophagy and mitigates nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.*, 28: 588-604 (2018).
2. Liu Y, \*Okamoto K. The TORC1 signaling pathway regulates respiration-induced mitophagy in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 502: 76-83 (2018).
3. Onishi M, Nagumo S, Iwashita S, \*Okamoto K. The ER membrane insertase Get1/2 is required for efficient mitophagy in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 503: 14-20 (2018).
4. Xu X, \*Okamoto K. The Nem1-Spo7 protein phosphatase complex is required for efficient mitophagy in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 496: 51-57 (2018).
5. Nagumo S, \*Okamoto K. Investigation of yeast mitophagy with fluorescence microscopy and western blotting. *Methods Mol. Biol.*, 1759: 71-83 (2018).
6. Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, \*Sesaki H. Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics. *Trends Cell Biol.*, 28: 67-76 (2018).
7. Eiyama A, \*Okamoto K. Assays for mitophagy in yeast. *Methods Mol. Biol.*, 1567: 337-347 (2017).

## 主な学会発表

1. Okamoto K. "Regulation of mitochondrial clearance via ER factors" Keystone Joint Symposia on Mitochondrial Biology and Selective Autophagy. Kyoto, Japan. April 24, 2018.
2. Okamoto K. "Signaling pathways regulating mitophagy in yeast" FASEB Science Research Conference on Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Health, Disease and Aging. West Palm Beach, Florida, USA. May 23, 2017.



# 非小胞輸送型オートファジー の分子メカニズム

代表者 株田 智弘

国立精神・神経医療研究センター・  
神経研究所・室長



## 研究目的

我々が見いだした新たなオートファジー RNautophagy、DNautophagy (ここではまとめて RDA と表記) と、以前から報告されているシャペロン介在性オートファジーは、ともにメンブレントラフィック (小胞輸送) などの膜動態を介さないタイプのオートファジー (非小胞輸送型オートファジー) であると考えられている。我々はこれまでに、putative RNA transporter である SIDT2 がリソソーム膜に局在し、リソソームによる RNA 取り込みにおいて機能していることを明らかにした。しかしながら、非小胞輸送型オートファジーにおける基質分子の取り込み機構や、その活性制御機構に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究課題では、前回公募研究に引き続き非小胞輸送型オートファジーの詳細な分子機構を解明することを目的とした。

## 研究成果

### (1) DNautophagy における SIDT2 の機能解析：

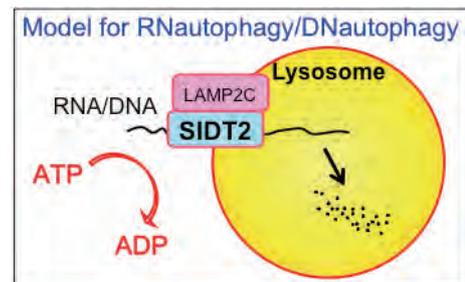
今回、DNautophagy においても SIDT2 が機能するかどうかを検討した。SIDT2 を過剰発現させた単離リソソームにおいて DNautophagy 活性が上昇し、DNA の取り込み量が増加した。DNA の取り込み量増加は生化学的手法と免疫電子顕微鏡法によって確認した。また、SIDT2 による RNA 取り込み活性を阻害する変異 (S564A) は DNA の取り込みも阻害した。SIDT2 をノックダウンさせた単離リソソームでは DNA 取り込み量が減少し、DNautophagy 活性が低下した。以上の結果から SIDT2 は DNautophagy における DNA の取り込みを仲介することが示された。

様々な核酸に対する単離リソソームの取り込み活性を測定した。RNA (主に rRNA) と直鎖状 DNA (2本鎖) のリソソーム内への取り込み量には有意な差がなかった。また、環状 DNA と比較して直鎖状 DNA (双方とも鎖長約 5.5 kbp, 1800 nm) の方が同じ時間でより多く取り込まれた。また実験に使用したリソソームの直径は約 200 nm であることを考慮すると、今回の結果は、RDA における核酸取り込みはミクロオートファジーではなくトランスポーターを介しているという仮説を支持していると考えられた (図)。

### (2) SIDT2 のリソソーム局在化機構の解明：

細胞内 RNA 分解に対する SIDT2 過剰発現の影響を neuro2a 細胞で解析したところ、過剰発現によって細胞内 RNA 分解が最大で 1.7 倍まで上昇した。我々の知る限りでは、単独で過剰発現させるだけで著しく細胞内 RNA 分解を促進できる初めての内在性細胞内タンパク質である。Bafilomycin A1 を用い、この分解促進がリソソームにおける分解であることを示した。また、これらの結果からも SIDT2 が細胞内 RNA 分解において重要な役割を果たして

いることが強く示唆された。次に SIDT2 のリソソーム膜への局在化機構について研究を進めた。SIDT2 の細胞質領域にある 3 つの YXX Φモチーフ (YGFSF, YDTL, YLCV) に変異を導入した変異体 (3YS 変異体) はリソソームに局在しなくなり、3 つの YXX Φモチーフが SIDT2 のリソソーム局在に必要であることが明らかとなった。また 3 つ YXX Φモチーフによる SIDT2 のリソソーム局在は SIDT2 を介する RNautophagy の活性に必要であることを示した。SIDT2 は adaptor protein complexes AP-1 と AP-2 と相互作用したことから SIDT2 のリソソーム局在制御の少なくとも一部は AP-1 と AP-2 を介して行われていることが示唆された。



図

## 主な発表論文

1. Contu VR, Hase K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Fujiwara Y, Kabuta C, Takahashi M, Hakuno F, Takahashi SI, Wada K, \*Kabuta T. Lysosomal targeting of SIDT2 via multiple Yxxφ motifs is required for SIDT2 function in the process of RNautophagy. *J. Cell Sci.* 130, 2843-2853 (2017)
2. Takahashi M, Contu VR, Kabuta C, Hase K, Fujiwara Y, Wada K, \*Kabuta T. SIDT2 mediates gymnososis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells. *RNA Biol.* 14, 1534-1543 (2017)
3. Aizawa S, Contu VR, Fujiwara Y, Hase K, Kikuchi H, Kabuta C, Wada K, \*Kabuta T. Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes. *Autophagy.* 13, 218-222 (2017)
4. Fujiwara Y, Wada K, \*Kabuta T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids—multiple autophagic pathways. *J. Biochem.* 161, 145-154 (2017)

## 主な学会発表

1. Kabuta T. Molecular mechanisms of RNautophagy and DNautophagy. 2017 Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology. 2017.
2. 株田智弘. 非小胞輸送型オートファジー RNautophagy/DNautophagy の分子メカニズム. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017.



# マイクロオルガネロファジーの分子機構

代表者 阪井 康能

京都大学・大学院農学研究科・教授



## 研究目的

オートファジーが現象として見出された当初から、リソソーム/液胞膜の変形によりその内部へ細胞質の成分が取り込まれる、マイクロオートファジーの存在は報告されていた。しかし、オートファゴゾーム形成を伴う、マクロオートファジーの分子機構が詳細に解明されてきたのとは対照的に、マイクロオートファジーの分子機構には不明な点が多い。酵母では複数のマイクロオートファジー経路が見出されており、核・小胞体・ペルオキシソーム・ミトコンドリア・脂肪滴を特異的に分解する、オルガネロファジーとしての機能を持つ。本研究ではマイクロオルガネロファジー分子機構の解明を主たる目的とし、さらに出芽酵母における Atg タンパク質の、マイクロオートファジー以外の機能解明を目指した。

## 研究成果

### (1) 酵母 Atg8 の持つ脂肪滴形態制御機能の発見：

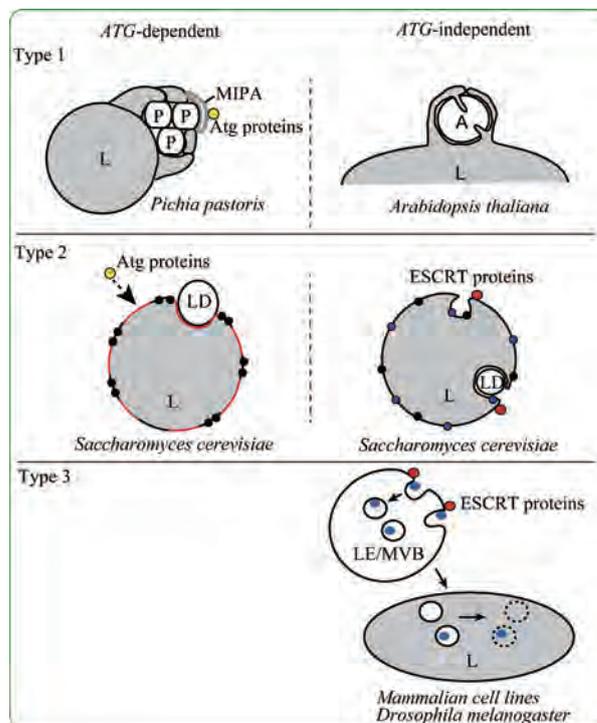
これまでの研究から、Atg タンパク質群が出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂肪滴および中性脂質量に複合的な影響を及ぼすことを見出していたが、本研究での詳細な解析から、オートファゴゾームのマーカータンパク質として知られる Atg8 の欠損が、脂肪滴・中性脂質量を減少させることを見出した。Atg8 の脂質修飾反応に働く他の Atg タンパク質欠損では脂肪滴量減少は見られなかったことから、Atg8 特異的な脂肪滴に対する機能が示唆された。さらに、Atg8 が脂質修飾に依存せず脂肪滴に一部局在すること、また本分子が持つ膜半融合活性が脂肪滴量維持に必要であることを見出した。同時に、Atg8 欠損による脂肪滴・中性脂質量の減少が脂肪滴表面に局在するリパーゼによる中性脂質の分解（リポリシス）に依存することを見出し、Atg8 の膜半融合活性による脂肪滴の形態制御が、結果的にリポリシスの抑制につながることを示した。

### (2) Atg タンパク質に依存しない新規マイクロオートファジー分子機構の発見：

液胞膜貫通タンパク質 Vph1 に EGFP タグを付加した融合タンパク質を発現させ、その分解をイムノプロットにより調べる新たなマイクロオートファジーのアッセイを構築した結果、出芽酵母の炭素源変換時（ダイオキシシフト時）にマイクロオートファジーが誘導されること、またこの過程には Atg1 から 18 までの Atg タンパク質は（液胞内リパーゼである Atg15 を除き）不要であることが分かった。一方で、エンドソームにおける多胞体形成に機能する ESCRT タンパク質群がこのマイクロオートファジーに必要であり、その中でも最初に機能する Vps27 が炭素源変換時にエンドソームから液胞膜表面へ局在変化することを見出した。Vps27 は多

くのタンパク質・脂質との相互作用領域が存在するが、その中でもクラスリンとの相互作用領域がマイクロオートファジーに特異的に重要であることも分かった。さらにこのマイクロオートファジーが脂肪滴の一部を液胞内輸送することがわかり、新規マイクロオルガネロファジーであることが分かった。

本研究代表者がこれまで取り組んできた他種酵母のマイクロオートファジーや、近年報告された様々なマイクロオートファジー研究と今回の研究結果を総合し、マイクロオートファジー分子機構の包括的な総説をまとめた（下図参照）。



マイクロオートファジー分子機構の総括・分類  
(発表論文 1 より改訂)

## 主な発表論文

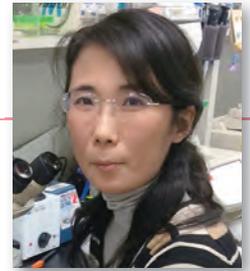
1. Oku M, \*Sakai Y. Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays* doi: 10.1002/bies. 201800008 (2018).
2. Oku M, Maeda Y, Kagohashi Y, Kondo T, Yamada M, Fujimoto T, \*Sakai Y. Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J. Cell Biol.* 216:3263-3274 (2017).
3. Maeda Y, Oku M, \*Sakai Y. Autophagy-independent function of Atg8 in lipid droplet dynamics in yeast. *J. Biochem.* 161:339-348 (2017)
4. Yamashita S, Oku M, Sakai Y, \*Fujiki Y. Experimental systems to study yeast pexophagy. *Method Mol. Biol.* 1595: 249-255 (2017).



# 父性オルガネラオートファジーの選択性を制御する新規アダプターの解析

代表者 佐藤 美由紀

群馬大学・生体調節研究所・准教授



## 研究目的

線虫 *C. elegans* の受精卵では、精子に由来するミトコンドリアや MOs (リソソーム様オルガネラ) といった父性オルガネラがアロファジーによって選択的に分解される。第 1 期の研究において、アロファジーの制御に関わる二つの因子・ALLO-1 と IKKE-1 の同定に成功した。ALLO-1 はアロファジーにおいてオートファジーアダプターとして機能する新規因子であり、IKKE-1 は哺乳類の TBK1・IKKε にホモロジーを持つキナーゼであった。本研究ではこれら因子のさらなる解析を通じて基質選択性を制御する分子メカニズムの詳細を明らかにするとともに、選択的オートファジーの生理的・進化的意義を理解することを目指した。

## 研究成果

IKKE-1 のキナーゼドメイン変異体はアロファジーを誘導できないことから、キナーゼ活性が重要であることを確認した。さらに、生化学的な解析から、ALLO-1 がリン酸化タンパク質であること、このリン酸化の一部は IKKE-1 に依存することを見出した。また、受精卵から回収した GFP-ALLO-1 の質量分析から ALLO-1 T74 を IKKE-1 依存的リン酸化標的の一つとして同定し、このリン酸化が ALLO-1 の機能に重要であることを示した (図)。一方で、ALLO-1 T74 以外にも IKKE-1 のリン酸化標的が存在することを示す結果も得ており、複数のステップまたは因子がリン酸化により調節されている可能性が考えられた。

また、ALLO-1 が標的に局在化する機構についても解析を行った。ALLO-1 は受精前の精子内ではミトコンドリア等に局在化できず、受精後の何らかの変化が必要であると考えられた。哺乳類の選択的オートファジー経路ではユビキチン化が分解シグナルとなっている場合が多い。アロファジーにおいても、線虫唯一の E1 酵素である *uba-1* をノックダウンすると ALLO-1 の父性オルガネラ上への局在化が阻害されること、受精後の父性オルガネラ上にユビキチンが検出されることなどから、受精後に標的がユビキチン化されることがシグナルとなっている可能性が示唆された (図)。

これらユビキチンの関与、TBK1 ファミリーキナーゼによるオートファジーアダプターのリン酸化制御は哺乳類のゼノファジーやマイトファジーの制御メカニズムと類似性があり、選択的オートファジー経路には生物種や標的を超えた共通原理があることが示唆された (図)。TBK は哺乳類においては自然免疫のシグナル経路においても重要な役割をしていることが知られているが、その役割は線虫においては保存されていないことから、進化的にはオートファジーにおける役割がより古いものであると考えられた。

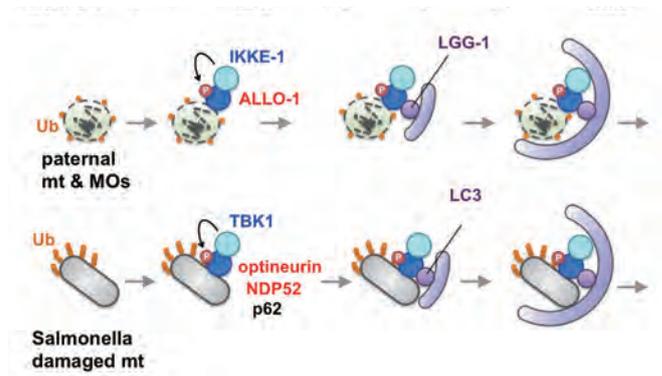


図 選択的オートファジー経路におけるアダプターとキナーゼの機能

## 主な発表論文

1. [Sato M](#), Sato K, Tomura K, Kosako H, Sato K. The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*. **Nat Cell Biol** 20: 81-91 (2018).
2. [Sato M](#), Sato K. Monitoring of paternal mitochondrial degradation in *Caenorhabditis elegans*. **Methods in Molecular Biology** 1759: 133-140 (2018).
3. Sato K, [Sato M](#). Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals. **J Biochem** 162: 247-253 (2017).

## 主な学会発表

1. [Sato M](#), Sato K, Tomura K, Kosako H, Sato K. "The mechanism of paternal mitochondria clearance via allophagy" The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.
2. [佐藤美由紀](#), 佐藤克哉, 戸村琴音, 佐藤健. "父性オルガネラ選択的オートファジーにおける基質認識のメカニズム" ConBio2017. 2017.



# 隔離膜伸展における ユビキチン様修飾システムの 役割

代表者 鈴木 邦律

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・  
准教授



## 研究目的

ユビキチン様タンパク質 Atg8 は細胞内分解システムであるオートファジーに必須なタンパク質であり、オートファジーを担う中心的なオルガネラであるオートファゴソーム (AP) の形成に機能している。オートファジーのシステムは真核生物に広く保存されているが、我々は分子生物学的・遺伝学的に多くの知見が蓄積されている出芽酵母を用いて AP 形成の根本となる分子機構の解明を進めている。Atg8 は合成された後、Atg8 の C 末端の切断を担うペプチダーゼ/アミダーゼである Atg4 によって切断を受け、グリシンが露出した Atg8<sup>G116</sup> となる。Atg8<sup>G116</sup> はユビキチン様タンパク質修飾システムを介してリン脂質 phosphatidylethanolamine (PE) と共有結合し Atg8-PE となる。Atg8-PE は Atg4 による切断を受け Atg8<sup>G116</sup> となって切断された Atg8 は再利用される。このように、Atg4 は二段階の切断を介して AP 形成に関わっている。

AP は中間構造体である隔離膜が伸展することにより形成される。本研究では、自身の開発した隔離膜可視化法を使用して、隔離膜伸展における Atg8-PE 修飾システムの意義を解析する。

## 研究成果

出芽酵母において、Atg8-PE の切断がオートファゴソーム形成過程のどの段階に必要なかについての統一した見解はなかった。今回我々は隔離膜可視化システムを用いることで、Atg8-PE 切断欠損株では Atg8 がドット状構造に局在しているものの、隔離膜伸展が阻害されていることを明らかにした。

さらに、野生株と Atg8-PE 切断欠損株のオートファジー関連構造体 (Atg8 で標識される構造体) が Octadecyl Rhodamine B (R18) で染色されたのに対し、*atg2Δ* 株のオートファジー関連構造体は R18 で染色されなかった。このことから、Atg8-PE 切断欠損株と *atg2Δ* 株で見られるオートファジー関連構造体が質的に異なるものである可能性が示唆された (図)。

これらの結果から、Atg8-PE の切断は IM 伸展のステップに重要であること、また、オートファジー関連構造体への脂質供給に Atg2 が機能している可能性が示唆された (Hirata *et al.*, *PLoS ONE*, 2017)。

出芽酵母では、前駆型 Ape1 を過剰発現し Atg8 を蛍光標識することでカップ状の隔離膜 (IM) を可視化することができる。オートファジー関連構造体の形態、特に構造体の長さ (構造体長) はオートファジー活性を反映することが知られている。我々は、画像処理と機械学習を組み合わせ、高速かつ包括的なオートファジー関連構造体の形態解析を行うシステム、Qautas (Quantitative autophagy-related structure analysis system) を開発・発表した (Kawaoka *et al.*, *Autophagy*, 2017)。

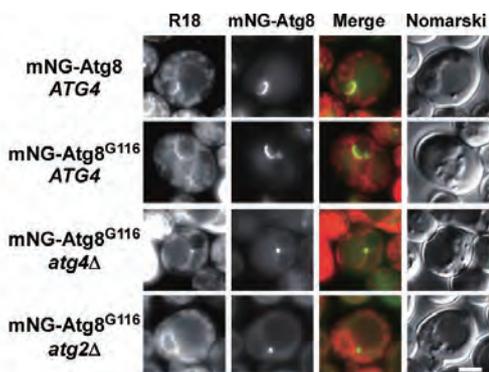


図 R18 による隔離膜の染色

上から野生株 2 つ、Atg8-PE 切断欠損株、*atg2Δ* 株。野生株と Atg8-PE 切断欠損株のオートファジー関連構造体は R18 で染色されるが、*atg2Δ* 株では染色されない。mNG は mNeonGreen の略。

Qautas は画像解析により、顕微鏡画像中の全てのオートファジー関連構造体を抽出し、機械学習によりその構造体が伸展前のドット状構造体なのか伸展した構造体なのかを分類する。伸展した構造体に注目して形態解析を行うことで、オートファジー変異株における IM 伸展能を解析することが可能となった。*atg1* 変異体を使用して Qautas の精度を検証したところ、手動で解析された先行研究の結果と一致する結果となった。しかも、解析に要する時間は圧倒的に短く済むことが分かった。

Qautas の開発により画像内の全てのオートファジー関連構造体を高速で解析することが可能となり、従来手動では手間がかかり過ぎることから解析対象から外れていた伸展途中の構造も含めた包括的な形態解析ができるようになった。

## 主な発表論文

1. Kawaoka, T., Ohnuki, S., Ohya, Y., \*Suzuki, K. Morphometric analysis of autophagy-related structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 13:2104-2110 (2017).
2. Hirata, E., Ohya, Y., \*Suzuki, K. Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 12:e0181047 (2017).
3. Ghanegolmohammadi, F., Yoshida, M., Ohnuki, S., Sukeyama, Y., Okada, H., Obara, K., Kihara, A., Suzuki, K., Kojima, T., Yachie, N., Hirata, D., \*Ohya, Y. Systematic analysis of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Mol. Biol. Cell*, 28:3415-3427 (2017).
4. Yamasaki, A., Watanabe, Y., Adachi, W., Suzuki, K., Matoba, K., Kirisako, H., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F., \*Noda, NN. Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep*. 16:19-27 (2016).



# オートファジー終結因子 Tag1 の作動機序の探求

代表者 野田 健司

大阪大学・大学院歯学研究所・教授



## 研究目的

これまでオートファジーの実行分子 Atg の理解が徐々に進行しているが、それらがどのように制御されているかの理解は未だ限定的である。我々はゲノムワイドスクリーニングをすることにより、オートファジー調節に影響を与える酵母因子の同定に成功してきた。

それらの成果を基盤として、今回オートファジーの終結に関わる新規因子 TAG1 や細胞内でグルタミンの完治に関わる Pib2 の解析をおこなってきた。

## 研究成果

### (1) オートファジー終結因子 Tag1 の解析：

酵母窒素源飢餓においておよそ 8 時間後にオートファジーは集結するが、Tag1 欠損株ではその終結が抑制されオートファジーが持続する。Tag1 タンパク質の局在性特にオートファジーに依存した変化が見出された。さらに Tag1 欠損株ではオートファジー実行分子群 Atg の局在性、またそれを規定する翻訳後修飾の変化が見出された。これらのことから、オートファジーの進行を Tag1 が感知し、その結果オートファジー実行分子 Atg の振る舞いに影響を与え、オートファジーが集結する分子機構が明らかになった。

### (2) グルタミン感知機構 Pib2 複合体の同定：

ホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合タンパク質である Pib2 と、よく知られている Gtr/Ego とともに 2 重欠損酵母株を作製すると、その生育が欠損した。Gtr 変異株で、Pib2 の発現を条件依存的に抑制すると、TORC1 の活性が消失することより、Gtr と Pib2 が平行して TORC1 の活性化経路として機能することが明らかになった。Pib2 は TORC1 と結合し、その結合はグルタミン存在下に増強し

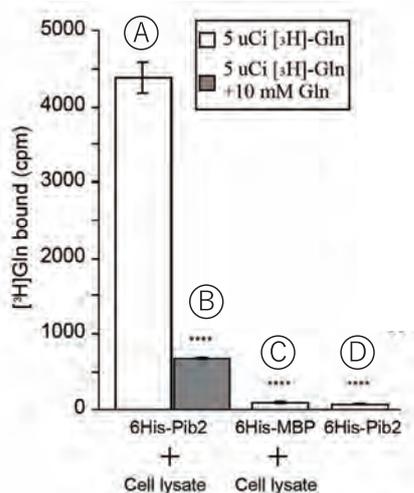
た。さらに Pib2 を含む複合体に放射能ラベルしたグルタミンが直接結合することが明らかになった。これらのことから Pib2 を含む複合体が細胞内のグルタミンセンサーとして機能して、TORC1 活性を制御し、オートファジーの調節を行っていることが明らかとなった。

## 主な発表論文

1. Ukai, H., Y. Araki\*, S. Kira, Y. Oikawa, A.I. May, and T. Noda\*. 2018. Gtr/Ego-independent TORC1 activation is achieved through a glutamine-sensitive interaction with Pib2 on the vacuolar membrane. *PLoS Genet.* 14:e1007334–25.
2. Hao, F., K. Kondo, T. Itoh, S. Ikari, S. Nada, M. Okada, and T. Noda\*. 2018. Rheb localized on the Golgi membrane activates lysosome localized mTORC1 at the Golgi-lysosome contact site. *J Cell Sci.* 131:jcs.208017.
3. Takeda, E., N. Jin, E. Itakura, S. Kira, Y. Kamada, L.S. Weisman, T. Noda, and A. Matsuura\*. 2018. Vacuole-mediated selective regulation of TORC1-Sch9 signaling following oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 29:510–522
4. Lu, S.-L., T. Kawabata, Y.-L. Cheng, H. Omori, M. Hamasaki, T. Kusaba, R. Iwamoto, H. Arimoto, T. Noda, Y.-S. Lin, and T. Yoshimori\*. 2017. Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*. *PLoS Pathog.* 13:e1006444.
5. Noda, T.\*. 2017. Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: the enigma of Atg9 vesicles. *Biochemical Society Transactions.* 45:1323–1331.

## 主な学会発表

1. 野田健司 “出芽酵母から探る TORC1 制御の仕組み” 2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2. Noda, T. “Study of termination mechanism of autophagy under prolonged starvation” The 14th International Congress on Yeasts 2016





# 栄養条件に依存してオートファゴソムの成熟過程を制御する Rab の統合的機能解析

代表者 **福田 光則**  
東北大学・大学院生命科学研究所・教授

連携研究者 **藤田 尚信**  
東北大学・大学院生命科学研究所・助教



## 研究目的

低分子量 G 蛋白質 Rab は、真核生物に普遍的に保存された膜輸送の制御因子として知られている。ヒトなどの哺乳動物では約 60 種類の異なる Rab 分子が存在し、オートファジーを含め様々なタイプの膜輸送を制御している。当研究室ではこれまで、哺乳動物に存在する全ての Rab をシステムティックに解析可能なツールを駆使して、Rab によるオートファジーのダイナミックな膜動態の制御機構の解明に取り組んで来た。本研究では、栄養状態に依存したオートファゴソムとリソソムの融合過程やオートリソソムの成熟過程に焦点を当て、これらの過程を制御する新規 Rab 分子の同定とその機能の解明を目指した。

## 研究成果

### (1) オートファゴソムとリソソムの融合を制御する新規分子・Rab2 の同定：

ショウジョウバエの幼虫から成虫への変態期において、筋細胞内で起こる筋線維や T 管の再構成過程にオートファジーが必須の役割を果たすことを初めて明らかにした。また、この過程を制御する新規因子のスクリーニングを行い、Rab2 を同定することにも成功した。Rab2 を欠損させたハエでは、筋細胞内のオルガネラの再編成が正しく行われず、細胞内にオートファゴソムが多数蓄積していた。詳細な解析の結果、Rab2 はショウジョウバエだけでなく哺乳動物の細胞においても、オートファゴソム上にリクルートし、繫留因子として知られる HOPS 複合体及びシンタキシン 17 を含む SNARE 複合体との相互作用を介して、リソソムとの融合過程に関与することを突き止めた (図 1)。

### (2) グルタミン飢餓特異的なオートリソソムの成熟現象の発見：

一般的に、オートファゴソムとリソソムの融合過程には Rab7 が関与すると考えられており、酵母の Ypt7/Rab7 ノックアウト (KO) 株では、オートファゴソムが蓄積することは周知の事実である。しかし、哺乳動物の培養細胞で Rab7 の KO 細胞株を樹立し、解析を行ったところ、哺乳動物においては、Rab7 は当初考えられていたようにオートファゴソムとリソソムの融合には必須ではなく、Rab7-KO 細胞ではオートファゴソムではなくオートリソソム (オートファゴソムとリソソムが融合したハイブリッドオルガネラ) が蓄積するという意外な事実を明らかにした。また、栄養条件下で蓄積していたオートリソソムはアミノ酸飢餓 (特にグルタミン飢餓) 特異的に、転写・翻訳を介さずに短時間で分解・消失することも明らかとなった。このグルタミン飢餓特異的なオートリソソムの分解は野生型の細胞や他の細胞種でも見られたことから、普遍的な機構と考え

られ、栄養飢餓はオートファゴソムの形成誘導だけでなくその成熟過程も促進することが示唆された。

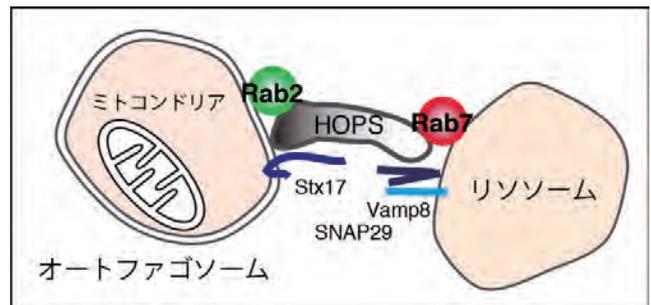


図 1

## 主な発表論文

1. Kuchitsu Y, Homma Y, Fujita N, [\\*Fukuda M](#). Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. *J Cell Sci* 131:jcs215442 (2018).
2. Takahama M, [Fukuda M](#), Ohbayashi N, Kozaki T, Misawa T, Okamoto T, Matsuura Y, Akira S, [\\*Saitoh T](#). The RAB2B-GARIL5 complex promotes cytosolic DNA-induced innate immune responses. *Cell Rep* 20:2944-2954 (2017).
3. Itoh T, [\\*Fukuda M](#). Roles of Rab-GAPs in regulating autophagy. *Autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging* (Hayat M.A. ed.) 11:143-157 (2017).
4. [\\*Fujita N](#), Huang W, Lin T-H, Groulx J-F, Jean S, Nguyen J, Kuchitsu Y, Koyama-Honda I, Mizushima N, [Fukuda M](#), [\\*Kiger AA](#). Genetic screen in Drosophila muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *eLife* 6:e23367 (2017).
5. Ishida M, Oguchi ME, [\\*Fukuda M](#). Multiple types of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for Rab small GTPases. *Cell Struct Funct* 41:61-79 (2016).

## 主な学会発表

1. Kuchitsu Y, Fujita N, [Fukuda M](#). "Blockade of autophagic flux by Rab7 knockout depends on nutrient status in mammalian cells." The 8th International Symposium on Autophagy. (2017).
2. 藤田尚信, 村川直柔, [福田光則](#). "筋細胞の再構成時に見られるオートファジー依存的な管状リソソム関連構造体" 2017 年度生命科学系学会合同年次大会ワークショップ「オートファジーの分子メカニズムと生理機能」2017.



# マイクロオートファジーによる マウス胚着床前後の 発生制御

代表者 和田 洋

大阪大学・産業科学研究所・准教授



## 研究目的

マウス初期胚の胚体外上皮組織 (VE) は、外胚葉・内胚葉・中胚葉のパターニングを制御する重要な組織として知られている。VE に大きな「液胞」があり、「液胞」への輸送は、エンドソームが丸ごと「液胞」に飲み込まれるマイクロオートファジーによっておこなわれる。

本研究課題では、マイクロオートファジーがどのように初期胚発生プログラムに関わるのか、さらにマイクロオートファジーが動物個体レベルでの普遍的な機能を担うのか、を検討し、このユニークな膜ダイナミクスが担う生理機能を明らかにすることを目指した。

## 研究成果

### (1) マイクロオートファジーができない *rab7* 変異マウスの表現型：

低分子量 GTPase, *rab7* を欠失するマウス胚はマイクロオートファジーが起きず、原腸陥入期に Wnt シグナル伝達の異常によって胚体外中胚葉が形成不全となる。マイクロオートファジーは、VE で顕著にみられるが、中胚葉の前駆組織である胚体外胚葉 (Epi) では検出できない。VE 特異的に *rab7* 機能をなくすと、遺伝的には変化がないはずの中胚葉組織の形成が阻害される。この非自律的 (non-cell autonomous) な *rab7* 欠損表現型は、Wnt を細胞外で負に調節する因子がマイクロオートファジーによって制御されると考えると理解できる。*rab7* 欠損胚では Wnt antagonist の Dkk-1 が蓄積されていた。すなわち、マイクロオートファジーによる Dkk-1 の取り込みにより Wnt シグナルの抑制が解除される機構がはたらいっている (図)。

Rab7 を胚特異的に欠失させたところ、実験的に誘起される急性膵炎の劇症度が増悪した。急性膵炎の発症にオートファジー、エンドサイトーシス経路が関与するメカニズムが存在することを大西洋英博士らとともに示した。

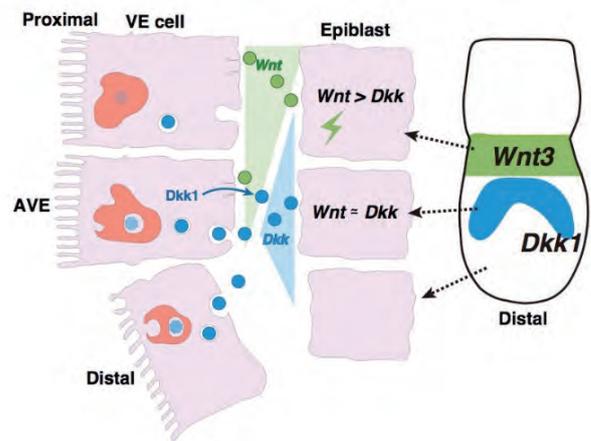
### (2) 「液胞」形成因子、HOPS サブユニット遺伝子破壊マウスの表現型：

リソソームの膜融合因子 HOPS/CORVET のサブユニット Vps18/Vam8 を欠損する初代培養繊維芽細胞 (MEF) はエンドソームの成熟が阻害され、未成熟な後期エンドソームを蓄積する。Vam8 欠損マウス胚は胚着床直後に発生を停止する。胚を構成する細胞には多様な電子密度をもつ多数の小胞が蓄積し、VE に大きな「液胞」は構築されない。また、Vam8 欠損 MEF 細胞では mTORC1 から下流へのシグナル伝達が異常となる。Wnt, Fgf シグナル経路には異常が見られない。シグナル伝達のプロファイルは MEF でも観察されることから、VE 特異的なマイクロオートファジーの欠損というよりも、エンドソーム・リソソームのインテグリ

ティの破綻が mTORC1 経路を OFF にすると考えられる。発生異常が顕著な栄養芽細胞 (TE) 系列の幹細胞の解析から mTORC1 より上流のシグナルが TE の増殖分化を支配することが明らかになった。

### (3) 小腸上皮のマイクロオートファジー：

新生仔の小腸上皮には giant lysosome として「液胞」様の構造があることが知られている。「液胞」への物質輸送の時系列からマイクロオートファジーが起きていることがわかった。腸特異的に *rab7* 遺伝子を破壊によって「液胞」の形態が異常になり、新生仔の生育に遅延が見られた。「液胞」の形成やマイクロオートファジーを伴う膜ダイナミクスは初期胚に限定されるものではなく、活発にエンドサイトーシスをおこなっている細胞で起きており、哺乳動物の生理と深く関連しているものと考えられる。



図

## 主な発表論文

1. Sato, R., Kato, A., Chimura, T., Saitoh, S.I., Shibata, T., Murakami, Y., Fukui, R., Liu, K., Zhang, Y., Arii, J., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., (17 人中 12 番目) et al. Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3-mTORC2 axis. *Nat. Immunol.* 19:1071-1082 (2018)
2. Matsumoto, N., Sekiya, M., Tohyama, K., Ishiyama-Matsuura, E., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Futai, M., and Nakanishi-Matsui, M. (2018). Essential role of the a3 isoform of V-ATPase in secretory lysosome trafficking via Rab7 recruitment. *Sci. Rep.* 8, 6701 (2018).
3. Takahashi, K., Mashima, H., Miura, K., Maeda, D., Goto, A., Goto, T., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y., and Ohnishi, H. Disruption of small GTPase Rab7 exacerbates the severity of acute pancreatitis in experimental mouse models. *Sci. Rep.* 7, 2817 (2017).



# 病原菌感染や結合タンパク質を介した Syntaxin 17 の生理機能の解明

代表者 **新崎 恒平**

東京薬科大学・生命科学部・講師  
(現：東京薬科大学・生命科学部・准教授)



## 研究目的

オートファジーを抑制する細胞内発症型細菌であるレジオネラは、Ipg1137 と呼ばれるレジオネラエフェクターを用いて syntaxin 17 (Stx17) を分解することを見いだした。しかしながら、Ipg1137 が Stx17 を分解する分子機構やレジオネラが Ipg1137 を介して Stx17 を分解することの感染戦略上の利益など不明な点が残されていた。

Stx17 は栄養状態に応じて結合タンパク質を変換し、その機能を発揮する分子スイッチである (栄養下：Drp1、ミトコンドリア形態制御、栄養飢餓下：Atg14L、オートファジー)。しかし、この分子スイッチとしての機能がどのように制御されているかは不明である。

## 研究成果

### (1) レジオネラによる Stx17 分解機構とその生理的意義：

Ipg1137 による Stx17 の分解は、プロテアーゼ阻害剤を添加した条件では著しく抑制された。また、68 番目のセリンに変異を導入すると分解活性が低下したことから、Ipg1137 は Stx17 に対するセリンプロテアーゼであることが明らかになった。また、Ipg1137 による Stx17 の分解はオートファジーのみならず Bax に依存したアポトーシスも抑制していることを見いだした (図 1)。これらの結果より、レジオネラは Stx17 の分解を通じて宿主防御機構を回避していることを明らかにした。

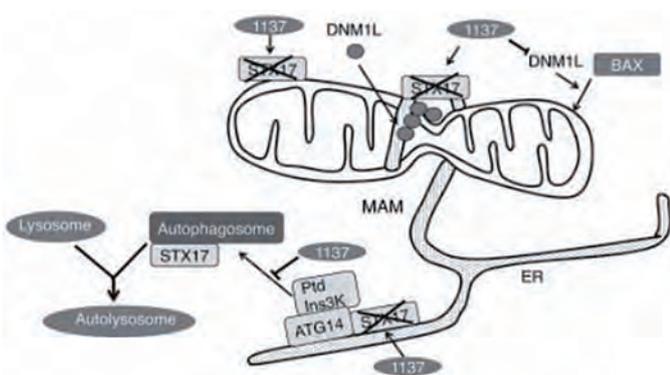


図 1

### (2) Stx17 の分子スイッチとしての機能を制御する因子の解明：

Stx17 は栄養状態に応じて結合パートナーを変換する分子スイッチとして働く。我々は Stx17 の分子スイッチとしての機能を制御するタンパク質の探索を行い、MAP1B-LC1 (LC1) を候補因子として同定した。LC1 を発現抑制

すると栄養下にもかかわらずオートファゴソーム形成が促進され、LC1 の発現は飢餓条件下でのオートファゴソーム形成を阻害した。また、Stx17 と LC1 は飢餓誘導により解離することから、LC1 は Stx17 との結合を介してオートファゴソーム形成を負に制御していることを見いだした。更に、LC1 の 217 番目のスレオニンが栄養下ではリン酸化され飢餓誘導下では脱リン酸化されることを明らかにした。以上の結果は、Stx17 の機能は LC1 との相互作用により制御されていること示唆している。

## 主な発表論文

1. Sugo M, Kimura H, Arasaki K, Amemiya T, Hirota N, Dohmae N, Imai Y, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Hattori N, Cheng J, Fujimoto T, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. Syntaxin 17 regulates the localization and function of PGAM5 in mitochondrial division and mitophagy. *EMBO J.* 37, e98899. (2018).
2. Arasaki K, Nagashima H, Kurosawa Y, Kimura H, Nishida N, Dohmae N, Yamamoto A, Yanagi S, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. MAP1B-LC1 prevents autophagosome formation by linking syntaxin 17 to microtubules. *EMBO Rep.* e45584. (2018).
3. Kimura H, Arasaki K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Ohtomo T, Yamada J, Tagaya M. *J Lipid Res.* 59, 805-819. (2018).
4. Arasaki K, Mikami Y, Shames SR, Inoue H, Wakana Y, Tagaya M. Legionella effector Ipg1137 shuts down ER-mitochondria communication through cleavage of syntaxin 17. *Nat Commun.* e15406. (2017).

## 主な学会発表

1. 新崎恒平、多賀谷光男 小胞体—ミトコンドリア接触部位における syntaxin 17 の多彩な生理機能 (招待講演) 第 90 回日本生化学会大会 2018 年 神戸
2. 新崎恒平、三上優美、James Havey、Stephanie Shames、Craig Roy、多賀谷光男 Legionella effector Ipg1137 shuts down ER-mitochondria communication through cleavage of syntaxin 17. 第 90 回日本細菌学会総会 2017 年 仙台

# 病変型 mtDNA の選別・浄化におけるマイトファジー関連膜動態の役割

代表者 石原 直忠

久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
(現：大阪大学・大学院理学研究科・教授)



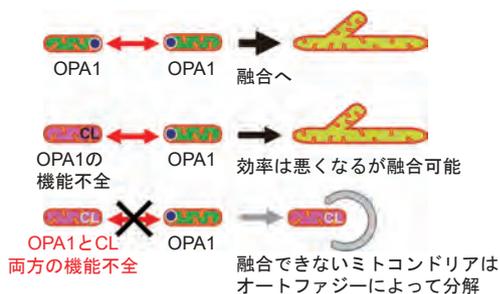
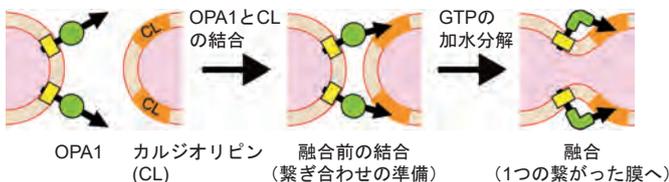
## 研究目的

オートファジーはミトコンドリアの品質管理に重要であり、機能不全となったミトコンドリアを選別する機構の理解が大きく進んでいる。現在「障害ミトコンドリアでは融合に関わる GTPase、OPA1 が分解され融合活性を失うことで隔離され、その後 Parkin が局在化しマイトファジーに導く」とのミトコンドリア品質管理の基本概念が広く認知されている。しかし融合・分裂・マイトファジーの関連に関しては未だに不明な点が多い。特に、品質不良のミトコンドリア構成因子を、どのように濃縮・選別し分解するか、というミトコンドリア内部構造の動的変化の詳細に関しては大きく理解が遅れている。そこで本研究ではミトコンドリア融合を定量的に解析し、生化学的な詳細解析から品質管理の分子基盤理解を目指した。

## 研究成果

### (1) L-OPA1 を用いたミトコンドリア品質管理の詳細理解：

L-OPA1 をカイコ幼虫発現系を用いて発現させ、ミトコンドリア品質管理への関与を試験管内及び培養細胞を用いて詳細に調べたところ、OPA1 は一方の膜だけに必須であること、カルジオリピンが膜融合に必須であることを見出した。さらに培養細胞を用いて OPA1 のミトコンドリア品質管理への関与を詳細に調べたところ、内膜融合因子 OPA1 を持たないミトコンドリアは、正常なミトコンドリアと融合可能であること、即ち OPA1 の抑制だけでは障害ミトコンドリアの選別・排除には不十分であることが明らかになった。これらの結果から、OPA1 と膜脂質の両面の変化からミトコンドリア品質が検知・選別されていることが明らかになった(文献 1)。



### (2) ミトコンドリア融合の定量的解析系の構築：

オートファジー関連遺伝子 Atg を用いて、ミトコンドリアの膜融合を検出する新たな実験系を構築した。一方のミトコンドリアのマトリックス領域に Atg4 を、もう一方のミトコンドリアに Atg8 を発現させ、単離ミトコンドリアを試験管内で反応させたところ、ミトコンドリアの融合に伴って Atg8 の切断が起きることが分かった。この反応の定量的解析から、カルシウムイオンが障害を受けたミトコンドリア融合を抑制することが明らかになった(文献 3)。

## 主な発表論文

1. T. Ban, T. Ishihara, H. Kohno, S. Saita, A. Ichimura, K. Maenaka, T. Oka, K. Mihara, and \*N. Ishihara. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* 19: 856-863 (2017)
2. H. Iihoshi, T. Ishihara, S. Kuroda, N. Ishihara\*, H. Saitoh\*. Aclarubicin, an anthracycline anti-cancer drug, fluorescently contrasts mitochondria and reduces the oxygen consumption rate in living human cells. *Toxicol. Lett.* 227: 109-114 (2017)
3. N. Ishihara, M. Maeda, T. Ban, and \*K. Mihara. Cell-free mitochondrial fusion assay detected by specific protease reaction revealed Ca<sup>2+</sup> as regulator of mitofusin-dependent mitochondrial fusion. *J. Biochem.* 162: 287-294 (2017)
4. Y. Miyazono, S. Hirashima, N. Ishihara, J. Kusukawa, K. Nakamura, K. Ohta. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Sci. Rep.* 8: 350. doi: 10.1038/s41598-017-18582-6.(2017)
5. S. Saita, T. Ishihara, M. Maeda, S. Iemura, T. Natsume, K. Mihara and N. Ishihara. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. *Genes Cells.* 21: 408-424 (2016)

## 主な学会発表

1. Tadato Ban and Naotada Ishihara, Selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin, EMBO workshop, Mitochondrial quality control. 2017
2. 伴匡人、石原孝也、太田あずさ、一村紋佳、石原直忠 ミトコンドリアの膜とゲノムのダイナミックな形態制御とその意義(シンポジウム) 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年



# Parkin 非依存的 ミトコンドリアオートファジー の研究

代表者 **神吉 智丈**  
新潟大学・医歯学系・教授



## 研究目的

ミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）は、余剰あるいは異常なミトコンドリアをオートファジーにより分解することでミトコンドリア恒常性維持に寄与すると考えられている。近年、家族性パーキンソン病の責任因子である Parkin と PINK1 が協調してマイトファジー誘導に関わっていることが明らかとなり、Parkin・PINK1 を中心としたマイトファジー研究が盛んに行われている。一方で、Parkin ノックアウト細胞でもマイトファジーが誘導されることから、Parkin 非依存的マイトファジーも存在することは明らかであるが、その分子機構や生理的意義には不明な点が多い。また、出芽酵母には Parkin や PINK1 のホモログは存在しないため、出芽酵母のマイトファジーは Parkin 非依存的と言える。本研究では、Parkin 非依存的マイトファジーの分子機構と生理的意義の解明を目指した。

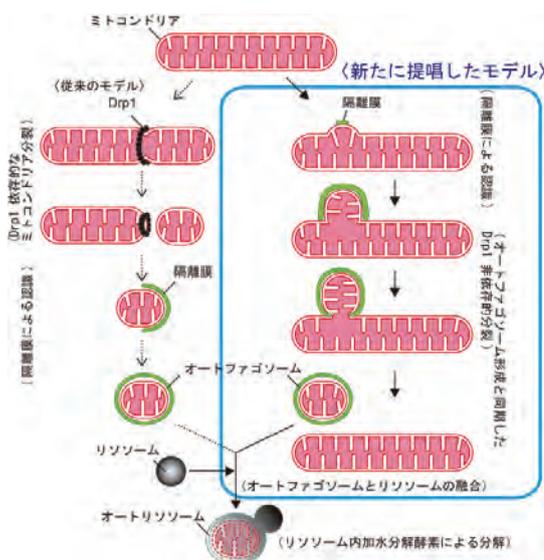
## 研究成果

### (1) 隔離膜形成とミトコンドリア分裂が同調して起こることを発見：

細胞内には様々な大きさのミトコンドリアがあり、ミトコンドリアは分裂により小さく、融合により大きくなる。従来、マイトファジーが誘導されると、ミトコンドリアがオートファゴソームに収まる大きさに分裂する必要があると考えられていた。私たちは、ミトコンドリア分裂が起こらない Drp1 欠損細胞でも低酸素や鉄欠乏状態で誘導される Parkin 非依存的マイトファジーが効率よく起こることを見いだした。出芽酵母でも同様の結果が得られた。次に、オートファジーによってミトコンドリアが分解される過程を知るため、隔離膜を EGFP-LC3 で、ミトコンドリアを mito-mCherry で標識し、経時的にマイトファジーを観察したところ、隔離膜形成に先立ってミトコンドリア分裂が起こるのではなく、大きなミトコンドリアの一部が隔離膜形成と同調して隔離膜内に収まるように分裂していることが明らかになった（図参照）。

### (2) Ppg1-Far 複合体が出芽酵母のマイトファジーを抑制していることを発見：

出芽酵母では、Casein Kinase 2 (CK2) によるミトコンドリア外膜タンパク質 Atg32 のリン酸化がマイトファジーに必須である。CK2 は恒常的に活性を持つが、Atg32 のリン酸化はマイトファジー誘導時特異的に起こるため、非誘導条件下で Atg32 のリン酸化を抑制する機構の存在が示唆された。私たちは、PP2A 様ホスファターゼ Ppg1 と Far 複合体が Atg32 のリン酸化を抑制することでマイトファジーを負に制御していることを発見した。



## 主な発表論文

1. Furukawa K, \*[Kanki T](#). Genome-wide PP2A-like protein phosphatase Ppg1: an emerging negative regulator of mitophagy in yeast. *Autophagy*. 14:2171-2172 (2018).
2. Furukawa K, Fukuda T, Yamashita SI, Saigusa T, Kurihara Y, Yoshida Y, Kirisako H, Nakatogawa H, \*[Kanki T](#). The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy. *Cell Rep*. 23:3579-3590 (2018).
3. Yamashita SI, \*[Kanki T](#). Detection of Iron Depletion- and Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*. 1782:315-324 (2018).
4. Fukuda T, \*[Kanki T](#). Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast. *Mol Cells*. 41:35-44 (2018).
5. Yamashita SI, \*[Kanki T](#). How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation. *Autophagy*. 13:980-981 (2017).
6. Yamashita SI, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, Yoshimori T, Sakai Y, Mihara K, \*[Kanki T](#). Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol*. 215:649-665 (2016).
7. Akabane S, Matsuzaki K, Yamashita S, Arai K, Okatsu K, [Kanki T](#), Matsuda N, Oka T. Constitutive Activation of PINK1 Protein Leads to Proteasome-mediated and Non-apoptotic Cell Death Independently of Mitochondrial Autophagy. *J Biol Chem*. 291:16162-16174 (2016).



# イネの生殖・免疫・代謝制御 におけるオートファジーの 役割の統合的理解

代表者 朽津 和幸  
東京理科大学・理工学部・教授

連携研究者 来須 孝光  
東京工科大学・応用生物学部・助教  
(現：公立諏訪東京理科大学・工学部・准教授)

花俣 繁  
東京理科大学・イメージングフロンティア  
センター・PD  
(現：新潟大学・農学部・特任助教)



## 研究目的

植物は各細胞の自律的な応答性に基づく分散型の高度な情報処理システムを進化させており、発生・形態形成とストレス応答の双方の側面でオートファジーやプログラム細胞死(PCD)を巧みに活用している。オートファジー経路は真核生物に高度に保存されているが、モデル植物シロイヌナズナのオートファジー欠損変異体の生活環に異常が見出されていないことから、植物の発生・形態形成におけるオートファジーの役割は未解明の点が多い。またシロイヌナズナのオートファジー欠損変異体の葉で、サリチル酸が過剰に蓄積することによる多様な影響が報告されているが、植物界における一般性や、植物免疫におけるオートファジーの機能は不明な点が多い。本研究では、イネのオートファジー欠損変異体の表現型を解析し、植物におけるオートファジーの新たな機能の解明を目指した。

## 研究成果

### (1) 花粉成熟過程におけるオートファジーの役割：

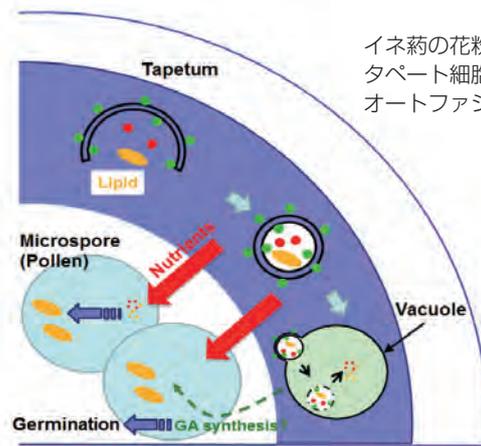
植物の花粉成熟過程において、葯の最内層のタペート細胞にPCDが誘導され、花粉に表面構造や栄養が供給される。イネのオートファジー欠損変異体では、タペート細胞のPCDが遅延し、花粉成熟不良・雄性不稔となることから、PCD制御におけるオートファジーの重要性を見出した。組織特異的プロモーターを用いてオートファジー可視化マーカータンパク質を発現させて定量的蛍光イメージング系を構築し、解析したところ、PCDが開始される小孢子一核期のタペート細胞でオートファジーが急激に誘導されることを発見した。またタペート細胞におけるオートファジーやPCDの制御には、転写制御因子や、活性酸素種(ROS)生成酵素NADPH oxidaseを介したROS蓄積が重要な役割を果たすことを見出した。

### (2) 種子登熟過程におけるオートファジーの役割：

低頻度で稔実したオートファジー欠損変異体種子は、白濁し、くず米様の形態を示すことを発見し、オートファジーが、イネの受精後の種子登熟過程においても重要な役割を果たすことを見出した。種子の澱粉粒・胚乳等の、走査・透過電子顕微鏡観察、糖など代謝産物の比較解析、澱粉の構造解析、プロテオーム解析等から、オートファジー欠損変異体では胚乳内での澱粉代謝に異常が見られる可能性が示唆された。

### (3) 感染防御応答におけるオートファジーの役割：

イネのオートファジー欠損変異株では、非親和性もち病菌に対する抵抗性が低下していることを発見し、イネの病原菌に対する免疫応答におけるオートファジーの重要性を示した。



イネ葯の花粉成熟過程でタペート細胞に誘導されるオートファジーの機能

## 主な発表論文

1. Kurusu T, Koyano T, Kitahata N, Kojima M, Hanamata S, Sakakibara H, \*Kuchitsu K. Autophagy-mediated regulation of phytohormone metabolism during rice anther development. *Plant Signaling & Behavior* 12(9): e1365211 (2017).
2. Kurusu T, \*Kuchitsu K. Autophagy, programmed cell death and reactive oxygen species in sexual reproduction in plants. *J Plant Res.* 130: 491-499 (2017).
3. Yamato KT, \*Kuchitsu K. "Fusion" in fertilization: interdisciplinary collaboration among plant and animal scientists. *J Plant Res.* 130: 419-421 (2017).
4. Hyodo K, Hashimoto K, Kuchitsu K, Suzuki N, Okuno T. Harnessing host ROS-generating machinery for the robust genome replication of a plant RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114: E1282-E1290 (2017).
5. Kurusu T, Hanamata S, \*Kuchitsu K. Quantitative live cell imaging of autophagic flux and roles of autophagy in reproductive development in plants. *Bioimages* 24: 1-11 (2016).
6. 来須孝光, 花俣繁, 瀬良ゆり, \*朽津和幸. イネの生殖過程におけるオートファジーの重要性. *BSJ-Review* 9:29 (2018).

## 主な学会発表

1. Kuchitsu K. "Critical roles of autophagy and reactive oxygen species in reproductive development and programmed cell death". International Congress on Plant Molecular Biology 2018.
2. Kuchitsu K. "Reactive oxygen species, autophagy and programmed cell death in plant reproduction." International Symposium "New Trends of Plant Reproduction Emerging from Cell Biological Approaches" 2018.



# 白血病幹細胞の維持におけるオートファジーの機能的役割の解明

代表者 黒川 峰夫

東京大学・大学院医学系研究科・教授



## 研究目的

白血病幹細胞は通常の化学療法に抵抗性で、白血病再発の主要な原因と考えられており、同疾患治癒の為にはその根絶が必要である。オートファジーは恒常性の維持やストレス応答を介して多種類の細胞の生存に寄与していることが知られている。我々はこれまでに白血病幹細胞において Atg5 あるいは Atg7 を欠失させオートファジー活性を落とすことで幹細胞活性を弱めることができることを明らかにしたが、そのメカニズムは明らかでなかった。そこで本研究では、白血病マウスモデルを用いてオートファジーが白血病幹細胞の維持に果たす生物学的・分子学的役割を明らかにし、オートファジーが白血病の治療標的となりうるか検証することを目的とした。

## 研究成果

白血病モデルマウスにおいて、既存の白血病治療薬であるシタラビン投与により白血病幹細胞割合が減少するとともに同細胞におけるオートファジー活性が亢進した。ここで Atg7 をノックアウトしオートファジー活性を落とすことで相対的な白血病幹細胞減少効果が得られることを見出した。

また、白血病マウスにおいて末梢血中の白血病細胞が骨髓中の同細胞に比してオートファジー活性が高く、かつ生存がよりオートファジー活性に依存することがわかり、骨髓微小環境中におけるオートファジーを代替する機構の存在が示唆された。白血病幹細胞における遺伝子発現解析を行ったところ、*Becn1*, *Map1lc3b*, *Dram1*, *Vps34* といったオートファジー関連遺伝子の発現が白血病幹細胞で亢進しており、またオートファジーの抑制経路である Akt/mTOR シグナルを負に制御する *Pten* の発現量が上昇していた。タンパク質レベルでも白血病幹細胞における PTEN の増加、リン酸化 Akt の低下およびリン酸化 mTOR の低下が認められたことから、

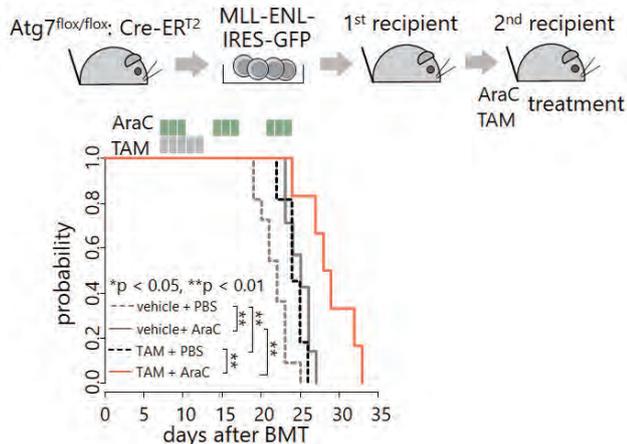
白血病幹細胞におけるオートファジーの活性化には Akt/mTOR 経路の抑制が関与していると考えられた。mTOR 阻害薬であるラパマイシンを MLL 融合遺伝子を有する白血病マウスに *in vivo* で投与しオートファジー活性化を誘導したところ、白血病幹細胞分画の割合が増加したことから、高いオートファジー活性が白血病幹細胞の維持に重要であることが示唆された。以上の結果から *Pten*/Akt/mTOR 経路を介したオートファジー機構の制御が白血病幹細胞に対する治療標的になり得ると考えられた。

## 主な発表論文

1. Uni M, Masamoto Y, Sato T, Kamikubo Y, Arai S, Hara E, \*[Kurokawa M](#). Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by depression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification. *Leukemia* 33:191-204 (2019)
2. Miyauchi M, Koya J, Arai S, Yamazaki S, Honda A, Kataoka K, Yoshimi A, Taoka K, Kumano K, \*[Kurokawa M](#). ADAM8 is an antigen of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia cells identified by patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 10:1115-1130 (2018)
3. Masamoto Y, Arai S, Sato T, Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T, \*[Kurokawa M](#). Adiponectin enhances quiescence exit of murine hematopoietic stem cells and hematopoietic recovery through mTORC1 potentiation. *Stem Cells* 35:1835-1848 (2018)
4. Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, \*[Kurokawa M](#). A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am. J. Hematol.* 92:1324-1442 (2017)
5. Sumitomo Y, Koya J, Nakazaki K, Kataoka K, Tsuruta-Kishino T, Morita K, Sato T, \*[Kurokawa M](#). Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. *Blood* 128:1614-1624 (2016)

## 主な学会発表

1. Mizuno H, Koya J, Sumitomo Y, Yasunaga M, Nakazaki K, [Kurokawa M](#). Suppression of mTOR pathway-induced autophagy maintains leukemia stem cell in murine AML model. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2018.
2. Tsukamoto A, Masamoto Y, Doi K, Arai S, Morishita S, [Kurokawa M](#). Acquired gene mutation of MAP4K2 identified from myelodysplastic syndrome patients confers azacitidine resistance. 59th ASH Annual Meeting and Exposition. 2017.





# オートファジー破綻が もたらす病態の Nrf2 を 標的とした治療戦略

代表者 田口 恵子

東北大学・大学院医学系研究科・講師



## 研究目的

肝臓においてオートファジーの機能が破綻すると、本来分解されるべき p62 タンパク質やユビキチン化タンパク質が異常蓄積する。オートファジーの機能が破綻した肝臓では Nrf2 が活性化して肝腫瘍を形成する。この肝腫瘍の形成には、オートファジーの破綻により蓄積した p62 が関与すること、さらには、p62 の蓄積により活性化した Nrf2 がこの肝腫瘍形成に貢献していることが示された。Nrf2 の活性は主に Keap1 によって制御されているが、二次的な Nrf2 の制御系として、リン酸化された Nrf2 が  $\beta$  TrCP によってユビキチン化を受けることが最近報告されている。そこで、オートファジーの機能が破綻した肝臓特異的 Atg7 欠失 (Atg7-Alb) マウスの肝臓における Akt リン酸化シグナルを調べる。また、Keap1 と結合する Nrf2 には、2 つの結合モチーフ (DLG と ETGE) がある。p62 の STGE モチーフは Nrf2 の DLG と同程度の結合強度を有して競合阻害するが、特に、STGE のセリン残基がリン酸化 (pSTGE) されるとその阻害が強くなる。この分子基盤を Keap1 との結合を強化した Nrf2 変異体 dual ETGE を用いて解明する。これらによりオートファジーと Keap1-Nrf2 システムの相互作用をより深く理解することを目的とした。

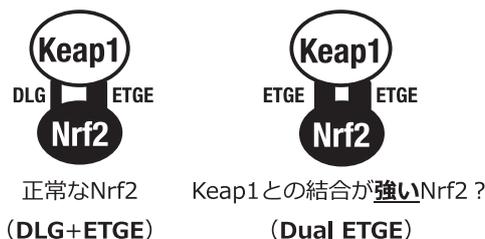
## 研究成果

### (1) オートファジー機能破綻と Nrf2 の活性化 :

Atg7-Alb マウス肝臓では異常な p62 タンパク質の蓄積と Nrf2 の活性化が認められる。肝臓特異的 Atg7::Keap1 二重欠失 (Atg7:Keap1-Alb) マウスの Nrf2 活性化は、Atg7-Alb マウスより増強するため、Keap1 に依存しない Nrf2 の活性化経路の存在が疑われた。そこで、リン酸化 Nrf2 の分解に関わる  $\beta$  TrCP 経路が遮断されているのではないかと考え、 $\beta$  TrCP の上流カスケードに位置する Akt のリン酸化を調べたところ、Atg7-Alb マウスでは Akt のリン酸化が認められた。Akt のリン酸化 (活性化) は下流の GSK3 をリン酸化する。リン酸化された GSK3 は不活性型のため、Nrf2 をリン酸化できない。リン酸化された Nrf2 は E3 ユビキチンリガーゼのアダプター分子である  $\beta$  TrCP によって分解される。よって、Akt がリン酸化されると、非リン酸化 Nrf2 は分解を免れて、恒常的な Nrf2 の活性化を誘導すると考えられる。Atg7-Alb マウスにおける Nrf2 の活性化には、Akt リン酸化を介した  $\beta$  TrCP-Nrf2 分解系の関与が考えられた。既知のオートファジーの経路では、Akt のリン酸化による mTOR 経路を介してオートファジーを促進する。そのため、オートファジーの機能が破綻している Atg7-Alb マウスにおける Akt のリン酸化は相反するため、今後の詳細な解析が必要である。

### (2) Keap1 と強力に結合する Nrf2 変異体の解析 :

CRISPR-Cas システムにより、Keap1 との結合部位を改変した Nrf2 dualETGE ノックインマウスを作製した。Nrf2 dualETGE マウスはプロテアソーム阻害剤によって、野生型マウスと同様に Nrf2 を活性化した。Atg7-Alb マウスは肝臓が肥大して肝傷害を呈する。Atg7-Alb::Nrf2 dualETGE マウスは、Keap1-Nrf2 結合が強固となるため、オートファジーの機能破綻により蓄積する p62 によって Nrf2 は活性化されないと予想した。Atg7-Alb::Nrf2 dualETGE マウスにおいて蓄積する p62 は、mRNA およびタンパク質レベルにおいて Atg7-Alb マウスと同程度であった。しかし、Atg7-Alb::Nrf2 dualETGE マウスは Atg7-Alb マウスと同程度の肝重量比を示し、血液中の肝傷害マーカーも上昇した。さらに、Nrf2 の核蓄積 (活性化) や Nrf2 の代表的な標的遺伝子である Nqo1 の発現は mRNA およびタンパク質レベルいずれにおいても Atg7-Alb::Nrf2 dualETGE マウスは Atg7-Alb マウスと同程度であった。つまり、予想に反して Atg7-Alb::Nrf2 dualETGE マウスでは、Atg7-Alb と同程度の Nrf2 活性化が起きており、dualETGE による Keap1-Nrf2 結合が強固になることを示すデータは得られなかった。この dualETGE の解析は今後、別の試験系を用いて解析予定である。



## 主な発表論文

1. [Taguchi K.](#), \*Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer. *Front. Oncol.* 7:85 (2017).
2. Saito T, Ichimura Y, [Taguchi K.](#), Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, \*Komatsu M. p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat. Commun.* 7:12030 (2016).

## 主な学会発表

1. [田口恵子](#). “オートファジーと Keap1-Nrf2 システム” 第 44 回日本毒性学会学術年会. 2017.
2. [田口恵子](#), 鈴木隆史, 山本雅之. “オートファジー破綻がもたらす病態の Nrf2 を標的とした治療戦略” 第 10 回オートファジー研究会・第 4 回新学術「オートファジー」班会議. 2016.



# 肝細胞と脂肪細胞における Rubicon を介した 脂肪代謝の制御

代表者 竹原 徹郎

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



## 研究目的

肝細胞に脂肪滴が蓄積する脂肪肝は、極めて有病率の高い生活習慣病の一つである。約 10% の症例で非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を発症し、肝硬変・肝癌へと進展する。脂肪肝ではオートファジーは抑制されており、オートファジーはリポファジーにより脂肪分解に関与する可能性が報告されている。そこで本申請課題では、脂肪蓄積細胞である肝細胞と脂肪細胞におけるオートファジー制御機構と、その脂肪肝・肥満症の病態進展機構への関与を明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

### (1) 肝細胞におけるオートファジーの影響：

マウス初代培養肝細胞やヒト肝癌細胞株 (HepG2) にパルミチン酸 (PA) を投与すると、LC3-II 及び P62 蛋白の蓄積、Bafilomycin を用いたオートファジー flux の減少を認め、PA はオートファジー後期段階を抑制した。PA 投与で mTOR シグナル経路は抑制された一方で、オートファゴソームとライソゾームの融合を負に制御する Rubicon は蛋白発現増強を認めた。PA 投与で Rubicon の遺伝子発現は変わらなかったが、蛋白分解遅延を認めた。Rubicon を siRNA にて抑制すると、PA 投与時のオートファジーの抑制は解除され、PA 投与で誘導される小胞体 (ER) ストレス応答の上昇及び肝細胞のアポトーシス、さらには脂肪滴の蓄積はいずれも軽減した。

野生型マウスに高脂肪食を投与した肝臓では、1 ヶ月から Rubicon の発現増加を伴うオートファジー抑制とともに脂肪滴の蓄積を認めた。3 ヶ月以降 ER ストレス応答と肝細胞アポトーシスの亢進、血清 ALT 値の上昇を認めた。一方、高脂肪食を投与した肝細胞特異的 Rubicon 欠損マウス (Alb-Cre Rubicon fl/fl) の肝臓では、4 ヶ月の時点で同腹の野生型マウスに比して、肝臓におけるオートファジー抑制及び ER ストレス応答は軽減し、肝細胞アポトーシスも抑制された。肝脂肪滴蓄積も減少し、肝重量も低下したが、性腺周囲脂肪重量は増加した。

肝切除検体を用いて、ヒト肝臓における Rubicon 蛋白量を検討したところ、脂肪性肝疾患症例では非脂肪性肝疾患症例に比し増加していた。

以上より、高脂肪食は、リン酸化を介した Rubicon 分解遅延により Rubicon 発現を増強させる可能性が示唆された。この Rubicon の発現増強はオートファジーの抑制を介して、ER ストレス応答活性化と肝細胞アポトーシスを誘導するとともに、肝細胞脂肪滴蓄積を促進することが示唆された (図 1)。

### (2) 脂肪細胞におけるオートファジーの影響：

野生型マウスに高脂肪食を 2 ヶ月摂取させたところ、性腺周囲脂肪と皮下脂肪の両方で p62 の有意な低下と、オートファジー抑制蛋白 Rubicon の発現低下を認め、Rubicon 低下を伴うオートファジー亢進が示唆された。脂肪細胞特異的オートファジー不全マウス (Adiponectin-Cre Atg7 fl/fl) は野生型マウスに比して、通常飼育下では性腺周囲脂肪・皮下脂肪の重量差を認めなかったが、高脂肪食負荷 4 ヶ月では性腺周囲脂肪が萎縮し、皮下脂肪が肥大した。一方肝臓においては、肝重量の増加は軽減し、肝細胞内脂肪滴蓄積量は減少した。血清 ALT 値も軽減し、肝病態の改善が示唆された。

以上より、脂肪組織のオートファジーを抑制することにより、肝病態が改善する可能性が示唆された (図 1)。

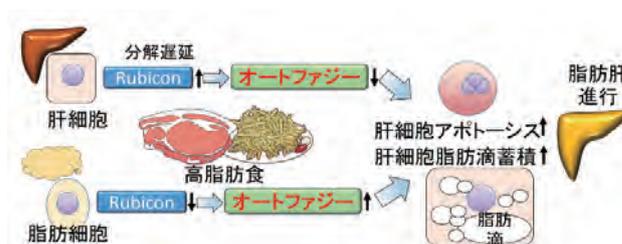


図 1

高脂肪食は肝細胞では Rubicon 増加を介してオートファジーの抑制をする一方、脂肪細胞では Rubicon を減少させてオートファジーを促進させる。いずれの変化も肝細胞アポトーシスの増加と肝細胞脂肪滴蓄積を促進させて、脂肪肝の病態を進行させる。

## 主な発表論文

- Hikita H, Sakane S, Takehara T. Mechanisms of the autophagosomal-lysosome fusion step and its relation to nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Research*. 2:120-124 (2018).
- Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 64 Dec;64(6):1994-2014 (2016).

## 主な学会発表

- Sakane S, Hikita H, Tanaka S, Nozaki Y, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Kawabata T, Hamasaki M, Takehara T. Intake of high fat diet causes suppression of hepatocyte autophagy and enhancement of adipocyte autophagy and controls fat deposition of liver and adipose tissue. The 8th International Symposium on Autophagy 2017.
- Sakane S, Hikita H, Tanaka S, Shirai K, Mizutani N, Myojin Y, Shiode Y, Nozaki Y, Saito Y, Nakabori T, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Autophagic changes of both adipose tissues and the liver induced by high fat diet feeding contribute to hepatic lipid accumulation. The American Association for the Study of Liver Diseases. The Liver Meeting 2017.

# 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるオートファジー遺伝子 Atg8 の機能解明

代表者 津久井 久美子  
国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

連携研究者 橋本 哲男  
筑波大学・生命環境科学研究所・教授



## 研究目的

本研究では真核生物におけるオートファジーの普遍性と多様性を知ることが目的で、初期に分化した原生生物である赤痢アメーバ原虫の Atg8 の機能解析を行った。

オートファジーは生物に広く保存されており、真核生物の共通祖先細胞ですでに確立された分子機構と考えられる。しかし多様な系統に Atg8 が保存されない生物も見いだされ、オートファジーの分子機構や機能が多様化していると考えられた。赤痢アメーバ原虫は Atg8 を保存するが、富栄養状態で脂質修飾されている、貪食胞に局在しその成熟化に関与する、といったことから飢餓ストレス応答以外の機能が予想された。

## 研究成果

### (1) Atg8 遺伝子発現抑制株の貪食胞プロテオーム解析：

赤痢アメーバ Atg8 が貪食胞成熟に関与することから、貪食時に Atg8 によって制御される分子を同定すべく、野生型と atg8 遺伝子発現抑制株の貪食胞のプロテオーム解析を行った。127 タンパク質で遺伝子発現抑制株の貪食胞への動員が低下した (n=2)。うち、4 タンパク質 (adenylate cyclase associated protein, Ca pump, Syntaxin, Rab7D) についてタグ融合発現株を樹立し、貪食時の局在を検討した。4 つのうち 2 つ (Ca pump, Syntaxin) について貪食胞への局在が観察された。赤痢アメーバの新規貪食胞局在タンパク質を同定した。これらの分子の Atg8 による制御機構を解析する必要がある。

### (2) Atg5-12/16 複合体の同定：

GFP 発現株をコントロールとし、GFP-Atg5 候補遺伝子発現株より、抗 GFP 抗体での免疫沈降により結合分子を同定した。この結果、Atg5, 12, 16 ホモログに加え Entamoeba にユニークな分子が一つこの複合体に存在し、Atg8 脂質修飾に関与することが示された。また、以前の研究で機能的に Atg12 とされた Atg12 候補分子がこの複合体に存在し、Atg5 と結合することが示された。赤痢アメーバ Atg16 は WD ドメインを有したが、認識可能な Atg16 ドメインは存在しなかった。

さらに、GFP-Atg5, GFP-Atg12, GFP-Atg8 のライブイメージングより、貪食胞の Atg8 はその場で脂質修飾を受けるのではなく、小胞輸送により運ばれることが示唆された。

### (3) Atg 遺伝子の系統解析：

赤痢アメーバ Atg8 はどの生物に由来するのか、また他の Atg 遺伝子も由来が見いだせるのか、Atg3, 5, 7, 8, 12, 16 について系統解析を行った。真核生物の各スーパーグループより 35 の生物種から上記遺伝子のホモログを検索し、48 遺伝子について系統解析を行った。この結果、Entamoeba の Atg8 は他の Amoebozoa 生物とは独立し、非常に進化速度が早いことが示された (図)。しかし赤痢アメーバの他の Atg 遺伝子ではこのような特徴は見られなかった。赤痢アメーバの Atg8 がどの程度他種生物に共通の機能を残しつつ進化したのか、今後の検討が必要である。

### 主な発表論文

- 津久井久美子、野崎智義 寄生性原虫におけるオートファジーの多様性 実験医学 35 (15), 2609-2618, (2017)

### 主な学会発表

- Kumiko Nakada-Tsukui, "Functional analysis of PI3P effector candidate SNX in Entamoeba histolytica" ASCB|EMBO 2017 meeting, Philadelphia USA, 2017.
- Kumiko Nakada-Tsukui, "Identification of an AIG1 gene as a novel virulence-associated gene by comparative genomics of Entamoeba histolytica clinical isolates." EMBO Conference, Anaerobic protists: Integrating parasitology with mucosal microbiota and immunology, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, 2017.
- Kumiko Nakada-Tsukui, "Functional analysis of an autophagy-related protein Atg8 in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica", The 8th International Symposium on Autophagy, Nara, Japan, 2017.

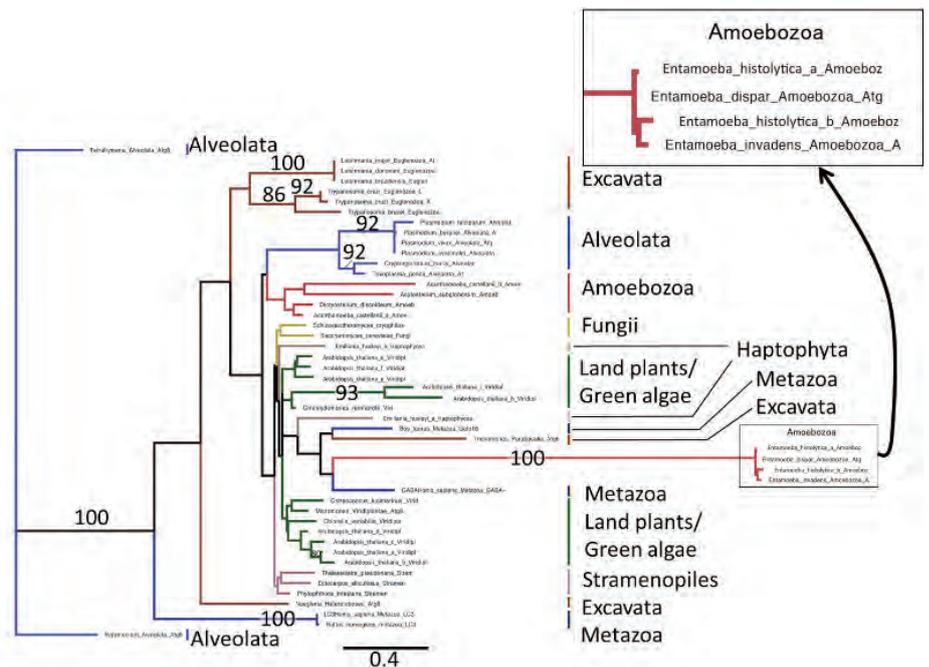


図 Atg8 の系統解析



# Mitophagy における直鎖状ユビキチン鎖の寄与

代表者 徳永 文稔

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授



## 研究目的

Optineurin(OPTN)は、損傷ミトコンドリア選択的オートファジーである mitophagy を制御するレセプターとして重要な役割を果たす。OPTN は LIR(LC3-interacting region) を含有するだけでなく、NF- $\kappa$ B シグナル経路の中心的酵素である I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) の制御サブユニットである NEMO(NF- $\kappa$ B-essential modulator) に高い相同性を有する。我々は、直鎖状ユビキチン鎖を特異的に生成する複合型ユビキチンリガーゼ (LUBAC) を同定し、LUBAC が炎症・免疫シグナルに中枢的な NF- $\kappa$ B 経路の制御に必須であることを見出した。さらに、NEMO や OPTN は直鎖状ユビキチン鎖特異的結合ドメイン (UBAN ドメイン) を含有しており、これが細胞機能に重要な役割を果たす。そこで本研究では、OPTN の直鎖状ユビキチン鎖結合性と細胞機能相関、および神経変性疾患発症への寄与を解明することを目指した。

## 研究成果

OPTN は、NF- $\kappa$ B 活性化経路において中心的な酵素である IKK の制御サブユニット (NEMO) に高い相同性を示すタンパク質で (図 1A)、NF- $\kappa$ B やインターフェロン産生経路、オートファジーの制御、細胞内膜輸送に関わることが報告されている。さらに、OPTN 遺伝子変異は、原発開放隅角緑内障 (POAG) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患を引き起こす。しかし、OPTN が二つの異なる疾患を発症する機構は、不明であった。まず我々は、ALS を引き起こす OPTN 変異体は NF- $\kappa$ B 抑制能を喪失していることを突き止めた。これらは、UBAN ドメインの欠損やアミノ酸置換に起因しており、UBAN ドメインの機能破綻が ALS 発症に関連することが示唆された。そこで、UBAN ドメインと直鎖状ユビキチン鎖との結合を明らかにするため、共結晶構造解析を行い、OPTN の UBAN ドメインは二量体を形成し、その両側に直鎖状ユビキチンが結合することを見出した (図 1B)。この結果は、OPTN の直鎖状ユビキチン鎖結合能の喪失が ALS 発症を引き起こす可能性を示唆する。実際に、OPTN 遺伝子変異を伴う ALS 患者由来の運動ニューロンでは直鎖状ユビキチンや活性型 NF- $\kappa$ B 因子が細胞質凝集体に染色され、細胞死の指標である活性型カスパーゼ 3 の染色も亢進した。

ALS は、運動ニューロンが選択的に侵される神経難病で、筋力低下のため呼吸不全・死に至り、現在のところ根本的な治療法はない。これまでに約 20 の原因遺伝子が見出され、その解析からタンパク質の封入体形成、ユビキチン-プロテアソームやオートファジーなどタンパク質分解系の機能破綻、NF- $\kappa$ B シグナルの活性化を介した神経炎症の遷延が関与すると考えられている (図 1C)。本研究から OPTN が神

経炎症の制御因子であることが明らかになり、mitophagy とリンクすることで ALS 発症に関わる可能性がある (図 1D)。今後 ALS 治療薬創薬の標的分子となるなど、臨床的な展開も期待できる。

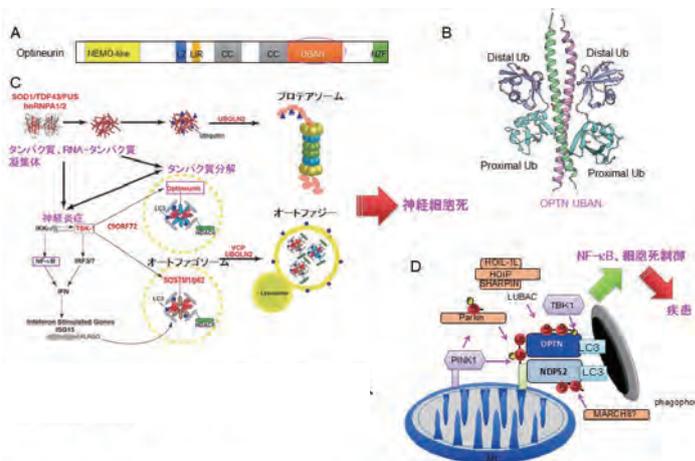


図 1

OPTN の直鎖状ユビキチン結合性の喪失と ALS、mitophagy の関連

## 主な発表論文

1. Kato K, Nishimasu H, Oikawa D, Hirano S, Hirano H, Ishitani R, Tokunaga F, Kasuya G, and Nureki O. Structural insights into cGAMP degradation by Ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1. *Nat. Commun.* 9, 4424 (2018).
2. Goto E, and Tokunaga F. Decreased linear ubiquitination of NEMO and FADD on apoptosis with caspase-mediated cleavage of HOIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 152-159, (2017).
3. Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, and Inoue J. HTLV-1 Tax induces formation of the active macromolecular IKK complex by generating Lys63- and Met1-linked hybrid polyubiquitin chains. *PLoS Pathog.* 13, e100162 (2017).
4. Omura H, Oikawa D, Nakane T, Kato M, Ishii R, Ishitani R, Tokunaga F, and Nureki O. Structural and functional analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Sci. Rep.* 6, 34756 (2016).
5. Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, and Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Commun.* 7, 12547 (2016).

## 主な学会発表

1. Tokunaga F. Characterization of a novel LUBAC inhibitor, HOIPIN-1, Keystone Symposia-Ubiquitin Signaling, 2018.
2. 徳永文稔, Optineurin の直鎖状ユビキチン鎖結合性と筋萎縮性側索硬化症, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年.

# 幹細胞発生・分化におけるオートファジーチェックポイント機構

代表者 平尾 敦

金沢大学・がん進展制御研究所・教授



## 研究目的

本研究では、オートファジーが、どのように組織幹細胞の発生に寄与するのかを明らかにすること、また、関連した研究として、腫瘍幹細胞におけるオートファジーの意義を明らかにすることを目標とした。

## 研究成果

### (1) 造血幹細胞の発生・維持におけるオートファジーの役割:

Atg5 欠損マウスの造血組織を解析したところ、8-12 週齢では、顕著な幹細胞集団への影響は認められないこと、一方、胎児期より血液細胞において Atg5 を欠損させることにより、その後の成体では、顕著な幹細胞の機能低下と数の減少を伴う造血不全が生じることを確認した。さらに、出生 1 週間以降に明確な移植能の低下が認められるものの、それ以前では顕著な低下は認められないこと、一方で、生後 3 週齢以降では極めて重篤な幹細胞機能障害が認められたことから、発生・発達段階でオートファジーの機能不全が、その後の成体型幹細胞の成立（発生）に大きく影響すると考えられた。

オートファジーと深く関与する mTOR 複合体 1 (mTORC1) の生体内での造血幹細胞の自己複製能の役割を明らかにするため、Rheb 変異造血幹細胞機能を評価した。その結果、Rheb 欠損による明確な造血幹細胞異常は認められないことが判明した。さらに、マウスに低線量の X 線を照射しても、その結果には影響をしていなかった。したがって、定常状態および傷害ストレス下においても Rheb 依存的な幹細胞の異常は認められなかった。一方、Raptor 欠損に関しては顕著な造血幹細胞の現象が認められることから、mTORC1 自体は造血幹細胞の自己複製に必須であるが、PI3K-AKT 以外の上流の重要性が示唆された。また、オートファジーの活性化による造血幹細胞保護作用の可能性が示された。

### (2) 脳腫瘍幹細胞維持におけるオートファジーの役割:

脳腫瘍患者由来細胞株に対し、CRISPR / CAS9 を用いて ATG5 遺伝子を破壊し、欠損クローンを得た。ATG5 欠損細胞では、オートファジー活性の消失が確認されたが、細胞の増殖、分化および細胞死に顕著な影響は認められなかった。さらに、免疫不全マウスへの脳内あるいは皮下移植によって、生体内での増殖を比較したが、ATG5 欠損細胞は、野生型細胞と顕著な差は認めなかった。一方で、Ca 濃度上昇や AMPK 活性化を誘導する薬剤に対して、オートファジーは、ミトコンドリア傷害から防御する機能を発揮することが判明した (図)。

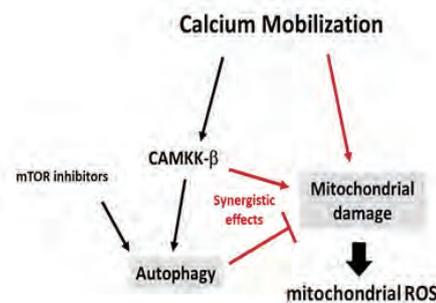


図 Ca 濃度上昇作用による脳腫瘍細胞の未分化性喪失

## 主な発表論文

1. Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, [Hirao A](#). Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. *Cancer Sci*. 2018 109(8):2497-2508.
2. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, [Hirao A](#). Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. *Cell Stem Cell*. 2018 22(5):713-725.
3. Peng H, Kasada A, Ueno M, Hoshii T, Tadokoro Y, Nomura N, Ito C, Takase Y, Vu HT, Kobayashi M, Xiao B, Worley PF, [Hirao A](#). Distinct roles of Rheb and Raptor in activating mTOR complex 1 for the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 495(1):1129-1135
4. Ali MAE, Fuse K, Tadokoro Y, Hoshii T, Ueno M, Kobayashi M, Nomura N, Vu HT, Peng H, Hegazy AM, Masuko M, Sone H, Arai F, Tajima A, [Hirao A](#). Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression. *Sci Rep*. 2017 7(1):11442
5. Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MA, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, Soga T, Takahashi C, [Hirao A](#). Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. *J Biol Chem*. 2016 291(41):21496-21509.

## 主な学会発表

1. [Hirao A](#). Regulation of stem cell properties by metabolic signals in hematopoietic neoplasm. JSPS-National University of Singapore (NUS) 2nd Symposium. 2018.
2. [Hirao A](#). Molecular mechanism linking hematopoietic stem cell aging and leukemogenesis. Fifth JCA-AACR Special Joint Conference on the Latest Advances in Hematological Cancer Research 2016.



# 液胞/リソソームにおける 核酸分解過程の 生理生化学的解析

代表者 **堀江(川俣) 朋子**  
東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

連携研究者 **森下 英晃**  
東京大学・大学院医学系研究科・助教



## 研究目的

オートファジーは細胞内の分解システムであり、タンパク質、核酸、多糖、脂質などが大規模に分解される。オートファジーによる核酸分解の実体は最近まで未踏の領域であった。オートファジーによる RNA 分解には、進化的に保存された液胞/リソソームに局在する RNase である T2 型 RNase が関与する。この酵素に変異が生じると、酵母では未消化の RNA が液胞/リソソーム内に高度に蓄積すること、ヒトの脳においてリソソーム病に類似した症状を示すことがわかっている。

そこで、オートファジーによる RNA 分解機構について、生化学と生理学的の両面から解析を進めてきた。まず酵母の T2 型エンドヌクレアーゼ、Rny1 に着目し、単離液胞や精製 Rny1 を用いた *in vitro* RNA 分解系を確立させ、Rny1 の基質特異性、酵素の活性化・阻害機構等の生化学的特性を調べた。同時に、RNase 活性を補助する因子の存在の有無を調べた。次に酵母での解析結果を基盤とし Rny1 のホモログである RNaseT2 を欠失したゼブラフィッシュ個体を作製し、表現型解析を進めてきた。さらに、オートファジーによる DNA 分解についても DNA 分解の責任酵素の同定と活性評価系の確立を試みた。

## 研究成果

### (1) 酵母 T2 型 RNase, Rny1 の生化学的解析：

オートファジーで分解される RNA の大部分は、rRNA や tRNA であると考えられる。これらの機能性 RNA は高度な二次構造をとっている。液胞内で RNA が完全分解され、モノヌクレオチドになるためには Rny1 単独の機能で十分なのか、Rny1 以外の他のエキソヌクレアーゼやヘリケースが関与するののかについてはこれまで明らかではなかった。そこで、酵母から単離した液胞で RNase 活性を生化学的に評価する *in vitro* 系を確立した。その結果、オートファジーの誘導条件下（窒素源飢餓条件下など）において、液胞内の RNase 活性が上昇することを見出した。

次に、免疫沈降により酵母から直接 Rny1 を精製し、それを用いて RNase 活性を評価する系も確立した。Rny1 の活性には、1 価のカチオンが必要であるが Mg は RNase 活性に必須ではないこと、亜鉛イオンや銅イオンが阻害的に働くことを見出した。また、予想に反して中性 pH 付近で最も活性が高いこと、また Rny1 内のジスルフィド結合が機能に重要であることも明らかにした。

T2 型 RNase は、塩基特異性が低いエンドヌクレアーゼ群である。精製した Rny1 単独で RNA がモノヌクレオチドまで完全分解されるのか調べるため、*in vitro* RNase アッセイ後の産物について、LC/MS 解析と HPLC 解析を行った(図

1)。その結果、Rny1 単独でもモノヌクレオチドは生ずるが、依然として未消化 RNA 断片が蓄積していることが確認された。効率よい RNA 分解には、Rny1 以外の他の液胞内因子が必要な可能性が示唆された。

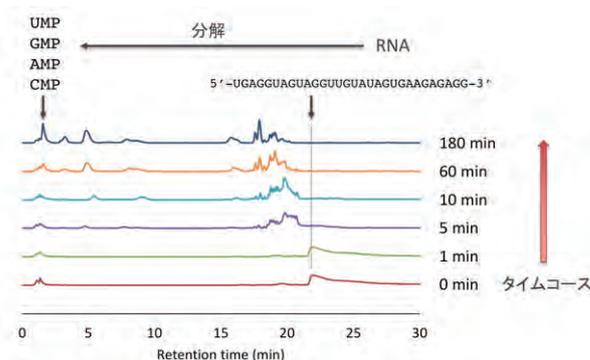


図 1

### (2) 酵母の液胞内 DNase の解析：

酵母では液胞内に DNase の存在はこれまで確認されていないが、ミトコンドリア DNA などの分解のために DNase が存在する可能性がある。上記の RNase 解析と同様の手法で、単離した液胞に DNase 活性が認められた。責任酵素の DNase 候補を一つ同定した。

### (3) ゼブラフィッシュ RnaseT2 ノックアウト個体の解析：

脊椎動物における RNA 分解機構を解明するため RNaseT2 ゼブラフィッシュを作製したところ、リソソームへの RNA 蓄積を認めたことから、RNaseT2 がリソソームにおける RNA 分解に必須であることが示された。さらにその蓄積はオートファジー (FIP200) を欠損させることでほぼ消失したことから、脊椎動物においてもオートファジーが細胞質 RNA のリソソームへの輸送に重要であることが示唆された。

## 主な学会発表

- 堀江(川俣) 朋子 オートファジーの誘導と代謝変化 日本農芸化学会 2017 年度第 3 回関東支部例会 (招待講演) 2017 年 12 月
- 堀江(川俣) 朋子 オートファジーと代謝 第 11 回メタボロームシンポジウム (招待講演) 2017 年 11 月



# 疾患 iPS 細胞による オートファジー関連神経変 性疾患の病態解明と治療法 開発

代表者 **村松 一洋**  
自治医科大学・小児科・准教授

連携研究者 **松本 直通**  
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授



## 研究目的

WDR45 異常を原因とする SENDA / BPAN はオートファジー関連神経変性疾患である。脳内への鉄沈着、パーキンソン様症状、重度知的障害を主症状とする疾患であり、その病態はオートファジー機能不全と密接に関与していることが明らかとされた。本研究では SENDA / BPAN 患者から樹立した多能性幹細胞 (疾患 iPS 細胞) によりオートファジー機能不全が鉄代謝を介した神経細胞傷害をもたらす機構を解明して、実際の医療へ応用を実現することを目指す。前年度までに患者 iPS 細胞の樹立を 2 系統で進めた。また WDR45 機能抑制細胞株 (ドパミン細胞) では鉄関連分子の動態に変動を認めることを明らかにしてきた。剖検検体による病変部位特異性についての解析にも着手開始した。これらの結果をもとに、オートファジーと神経変性疾患のより深い理解および発症および進行抑制につながる画期的な治療方法の開発へと展開させていく予定である。本領域での成果によって医療へ恩恵をもたらすことができれば、社会的な使命を果たすことにもつながる。成果はそれ自体が本疾患の画期的な治療の基盤となるもので、診療に関わる医療者とも情報の共有に努める。

## 研究成果

### (1) 疾患 iPS 細胞の神経細胞への分化誘導：

WDR45 異常症 (SEندا) 患者から樹立した iPS 細胞からの神経細胞などへの安定的かつ効率的な分化誘導方法の確立を試みていたが、分化後の均一な細胞が得られていないなど、解析に適切な状態に至ってはいないため、線維芽細胞を代用して、同様の解析を進めることにした。

### (2) 細胞の傷害性：

細胞の傷害性を評価する方法として LDH 測定 (Cell 2006) が利用されているため、患者由来細胞株と健常者由来で細胞上清中の LDH を測定した。患者由来の LDH は健常者の 150% の増加を示した。オートファジー機能の回復により細胞の傷害性が軽減されるのか今後、検討する。

### (3) オートファジー機能への影響：

患者由来細胞株と健常者由来のオートファジー活性を定常状態で測定したところ明らかな差は検出できなかった。starvation 刺激下や鉄過剰状態下での活性の変動を検証している。

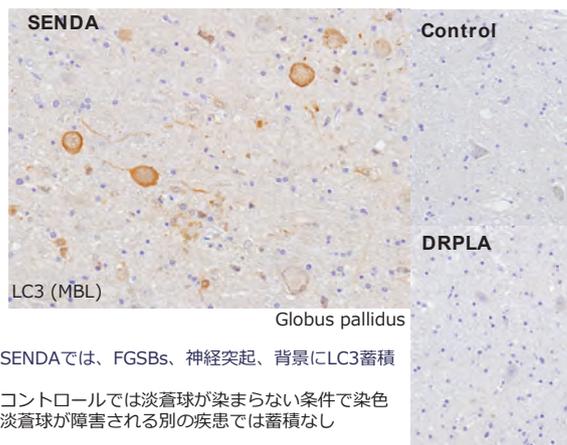
### (4) 脳組織の病理学的解析：

患者剖検検体から脳領域 (黒質、淡蒼球、前頭皮質、視床、小脳) 別に抽出した RNA やタンパクを利用してオートファジー関連分子の発現解析を実施した。WIPI-4 およびそのアイソフォームである WIPI-1,2,3 の RNA 発現を qRT-PCR にて測定し、どの領域においても WIPI-2 について WIPI-4

の発現は優位であることが判明した。実際に病変が強いと考えられる黒質や淡蒼球において、その優位性の変化は確認されなかった。

しかしながら、オートファジー基質である p62 は黒質や淡蒼球では優位に増加しており、オートファジー活性に影響が生じていることが示唆された。タンパクレベルにおける解析では WIPI-4 抗体での検出ができず、発現の確認ができていない。剖検のためタンパク変性の影響や、抗体の性質による影響が考えられる。今後、有効な抗体が必要である。

脳組織検体での免疫染色も実施し、オートファジー活性への影響の存在が確認された。これらの検討はこれまでのオートファジー研究あるいは病態解析においては進んでいない点であり、今後の研究のための重要な知見の基盤となっている (投稿準備中)。



SEنداでは、FGSBs、神経突起、背景にLC3蓄積  
コントロールでは淡蒼球が染まらない条件で染色  
淡蒼球が障害される別の疾患では蓄積なし

## 主な発表論文

1. Suzuki T, Miyake N, Tsurusaki Y, Okamoto N, Alkindy A, Inaba A, Sato M, Ito S, Muramatsu K, Kimura S, Ieda D, Saitoh S, Hiyane M, Suzumura H, Yagyu K, Shiraiishi H, Nakajima M, Fueki N, Habata Y, Ueda Y, Komatsu Y, Yan K, Shimoda K, Shitara Y, Mizuno S, Ichinomiya K, Sameshima K, Tsuyusaki Y, Kurosawa K, Sakai Y, Haginoya K, Kobayashi Y, Yoshizawa C, Hisano M, Nakashima M, Saitsu H, Takeda S, Maşumoto N. Molecular genetic analysis of 30 families with Joubert syndrome. *Clin Genet*. 90(6):526-535. (2016)
2. Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, Kato M, Aida N, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Osaka H, Saitsu H, Maşumoto N. WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. *J Hum Genet*. 61(7):653-61. (2016)

## 主な学会発表

1. 村松一洋 第 47 回小児神経学会東海地方会 特別講演「オートファジー機能と病態」(2017) 名古屋
2. 村松一洋 第 23 回小児神経学会東北地方会 特別講演「オートファジーと神経変性疾患」(2017) 盛岡
3. 村松一洋 第 120 回日本小児科学会総合シンポジウム「オートファジーとの出会い～難治神経疾患の治療を目指して～」(2017) 東京



# 選択的オートファジーにおける新規アダプター分子の検索

代表者 森田 英嗣

弘前大学・農学生命科学部・准教授



## 研究目的

細胞内に侵入した細菌などの病原体は、選択的オートファジーによって除去される。この選択的オートファジーのターゲット識別機構は、p62 などアダプター分子群がユビキチン修飾されたターゲットに結合し、LC3 などのオートファジー因子との結合を介してオートファゴソームをリクルートすることで成立する。このアダプター分子は p62 以外に NDP52、OPTN など複数見つかっており、それぞれのターゲット特異性、機能相補性など明らかになりつつある。本研究では、LC3 変異体結合分子の定量プロテオミクス解析によって同定された新規アダプター候補因子群の解析を通じて、細胞内に感染した病原体に対する選択的オートファジーのターゲット識別機構の全容解明を目的とした。

我々はこれまでに LC3-LIR(LC3 Interacting Region) 結合の X 線結晶構造解析から、LIR に高親和性を示す LC3A 変異体 K49A 及び、低親和性を示す K51A を見出してきた。また、これら変異体の LIR への結合親和性の違いを利用し、比較定量プロテオミクス解析によって新たな LIR 因子群 (LIRP1-16) を同定してきた。本研究では、新規 LIR 因子群のアダプター分子としての役割を解明し、A 群連鎖球菌 (GAS) などの感染系をモデルに、病原体に対する選択的オートファジーにおける標的認識機構の全体像を明らかにすることを目的とし解析を進めた。

## 研究成果

### (1) LIRP 上の LIR の同定と、LIR-LC3 結合の生化学的解析:

LLOME を培養細胞に添加すると膜損傷が誘導される。この実験系を用いて損傷膜に特異的にリクルートされる因子として LIRP8 を同定した。LIRP8 の LIR を検索したところ、4 箇所存在する LIR 配列のうち N 末端側の LIR が LC3 との直接結合に重要であることが示された。また一連の LIR 欠損変異体を用いた解析や、ATG5 や FIP200 欠損細胞を用いた解析より、LIRP8 の損傷膜局在には LIR-LC3 相互作用は必要ないことが示された。

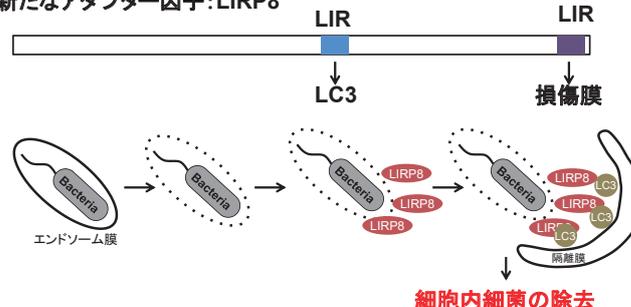
### (2) LIRP の各種病原体封入体へのリクルートと、基質認識を司るドメインの同定:

LIRP8 の各種末端変異体を用いた解析より、C 末端に損傷膜への局在に必要な領域が存在することを明らかにした。また、ユビキチン非依存的にリクルートされること、さらに、タイムラプスイメージングにより、LC3 が損傷膜にリクルートされるよりも早く標的に集積することを明らかにした。

### (3) LIRP ノックアウト細胞の樹立とアダプター分子としての重要性:

LIRP8 欠損細胞を作製し、GFP-LC3-RFP-LC3 Δを用いてオートファジー活性を調べたところ、定常状態のオートファジーにおいて活性の低下が認められた。また、YFP-Galectin3 のタイムラプス解析により損傷膜の除去の異常、さらに、GAS 感染実験より、細胞内細菌除去の異常が認められた。これらの結果から、LIRP8 の選択的オートファジーにおけるアダプター因子としての重要性が示された。

### 新たなアダプター因子:LIRP8



## 主な発表論文

1. Tabata K, Nara A, Omori H, \*Morita E. Immuno-localization of ESCRT proteins in virus-infected cells by fluorescence and electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. (2019) in press
2. Tripathi LP, Chen YA, Mizuguchi K. and Morita E. Network-based analysis of host-pathogen interactions. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 3:932-937 (2019)
3. \*Morita E. Membrane closure in stress induced-autophagosome formation. *Cell Stress*. 2(6):122-124 (2018).
4. Tabata, K., Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., Konishi, E., Suzuki, R., Matsuura, Y., and \*Morita, E. Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports*. 16(9):2339-2347 (2016)

## 主な学会発表

1. 荒川将志, 瓜生慧也, 工藤理帆, 森田英嗣 「選択的オートファジーの新規レセプター分子の同定」 第 91 回日本生化学会大会. 2018.
2. Morita, E. "Identification of novel adapter protein involved in selective autophagy." The 8th International Symposium on Autophagy. 2017.



# 平滑筋オートファジー不全に基づく血管不全病態の解明

代表者 綿田 裕孝

順天堂大学・大学院医学研究科・教授



## 研究目的

現在の日本人の死因の第2位は虚血性心疾患、第3位は脳卒中と動脈硬化性疾患は未だに日本人の重要な死因であることが知られている。動脈硬化病変の形成は内皮細胞の炎症、単球の接着と遊走やマクロファージによる炎症とともに、平滑筋細胞の増殖と遊走、アポトーシスが大きく関与する。事実、進行した動脈硬化病変では内膜下に増殖・遊走した平滑筋細胞が認められ、重要な役割を担っていることが示唆されている。また、動脈硬化巣の最表面には、プラーク層が存在し、脂質、および、それを細胞質内に取り込んだ泡沫化マクロファージとその死細胞の遺産物を中心とする脂質コア、それを被覆する内膜平滑筋細胞や細胞外基質で構成される線維性被膜で形成されている。生死に直結する急性心筋梗塞などの急性冠症候群は、動脈硬化進展の最終段階ではなく、その基盤となる動脈硬化が軽度であっても、プラークの破綻が起こることがその発症の本態であり、このプラークの破綻に、平滑筋細胞のアポトーシスによるプラークの脆弱化が強く関わっていることが想定されている。さらに、動脈硬化層に存在する平滑筋細胞の慢性的なアポトーシスの亢進は、動脈硬化性病変のさらなる進展を引き起こすことが報告されるとともに、中膜に存在する平滑筋細胞のアポトーシスは、大動脈解離の病態にも関与することが示唆されている。

近年、ヒトやげっ歯類の動脈硬化層に存在する血管構成細胞にオートファゴゾームの増加が観察されることが報告されている。これに関して、血管平滑筋細胞においては、コレステロールや酸化脂質などの負荷によりオートファジーが誘導され、平滑筋細胞のアポトーシスを抑制することなどが以前から確認されていたが、一方で、平滑筋細胞におけるオートファジー抑制が酸化ストレス誘発性のアポトーシスを抑制すると報告され、必ずしも一致した見解は得られていない。そこで平滑筋におけるオートファジーが動脈硬化症発症、進展に及ぼす役割を解明することを目的とした。

## 研究成果

平滑筋細胞で ATG7 を欠損させた平滑筋細胞特異的オートファジー不全マウス (SMATG7KO マウス) を作製。次に、動脈硬化症のモデルマウスとして知られている ApoE 欠損マウスを掛け合わせることで SMATG7KOxApoEKO マウスを作製した。このマウスに西洋食 (14 週間、1.25% コレステロール) を摂取させると、コントロールマウスに比して本マウスで死亡率が著明に増加した。死亡例の中には、胸部大動脈瘤が破裂していたことが死因と考えられるマウスがいたため、KO マウスの大動脈を詳細に観察した。その結果、腹部大動脈周囲に慢性炎症が生じており、動脈硬化巣が増加していた。この動脈硬化巣では、壊死性コアの拡大や薄い線維性被膜の形成など不安定プラークの特徴を示す所見が認め

られた。さらに興味深いことに、KO マウスの病理像はヒトの動脈硬化巣と極めて類似していた。また、動脈硬化巣ではアポトーシスが増加しており、動脈硬化巣の拡大やプラークの不安定化に関与していると考えられた。一方で、血管壁では細胞死に伴う中膜平滑筋細胞数の減少、中膜弾性線維の破壊や動脈瘤様に拡張している部位など血管壁の脆弱性に関連する所見が確認された。さらに詳細な検討から、血管平滑筋細胞のオートファジー機能が低下すると細胞死が増加することや、p53 経路が活性化され、細胞老化が促進されることが明らかになった。これに続いて、炎症性マクロファージが血管壁に集積し、血管壁構造の破壊を引き起こしていることが判明した。以上の結果から、血管平滑筋細胞におけるオートファジー機能不全は、細胞死や細胞老化を介して、血管障害である動脈硬化の進展や大動脈瘤の形成を促進することがわかった (図 1)。

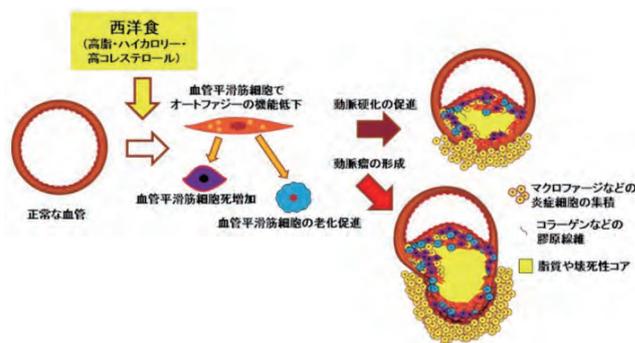


図 1

## 主な発表論文

- Masuyama A, Mita T, Azuma K, Osonoi Y, Nakajima K, Goto H, Nishida Y, Miyatsuka T, Mitsumata M, Watada H. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances atherosclerotic plaque instability. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 505(4):1141-1147.
- Osonoi Y, Mita T, Azuma K, Nakajima K, Masuyama A, Goto H, Nishida Y, Miyatsuka T, Fujitani Y, Koike M, Mitsumata M, Watada H. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis. *Autophagy*. 2018; 14(11):1991-2006.
- Kamitani M, Miyatsuka T, Miura M, Azuma K, Suzuki L, Himuro M, Katahira T, Nishida Y, Fujitani Y, Watada H. Heterogeneity of autophagic status in pancreatic  $\beta$  cells under metabolic stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 496(2):328-334.
- Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J*. 2016; 35(18):1991-2007.

平成 25 年度～平成 29 年度

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで

*Multidisciplinary research on autophagy : from molecular mechanisms to disease states*

研究成果報告書

---

平成 31(2019)年 1 月

領域代表

水島 昇

東京大学・大学院医学系研究科・教授

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Multidisciplinary research on autophagy:  
from molecular mechanisms to disease states

