

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25111003

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Elucidation of molecular functions of autophagy-related proteins using yeast and cell-free systems

研究代表者

中戸川 仁(Nakatogawa, Hitoshi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：90414010

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 101,200,000円

研究成果の概要(和文): オートファジーは細胞内の主要な分解機構であり、様々な生理的役割を担い、種々の疾患との関連も明らかになりつつある。しかしながら、その分子メカニズムには不明な点が多く残されており、関連疾患の治療法開発のためにも、その解明が急務となっている。本研究では、分子機構の研究に優れるモデル生物である出芽酵母および、関連分子の機能の解明に有効な無細胞系(精製タンパク質や人工膜を用いる解析手法)を用いて、オートファジーにおける中心的イベントであるオートファゴソームの形成機構および、特定の細胞成分を分解する選択的オートファジーの分解標的と制御機構に関して、多くの重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文): Autophagy is a major degradation system within cells, which plays a wide range of physiological roles and is linked to a number of human diseases. However, fundamental issues still remain to be addressed in the molecular mechanisms of autophagy, which is required to develop therapeutic methods for related diseases. In this study, we used yeast as an excellent model organism for the study of molecular mechanisms of basic biological phenomena and cell-free systems composed of purified proteins and artificial membranes which allow us to analyze the functions of related molecules. Finally, we obtained many important results about molecular mechanisms underlying the biogenesis of the autophagosome, a central event in autophagy, and degradation targets and regulatory mechanisms of selective types of autophagy, which specifically degrade certain components of cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オートファジー 細胞小器官 細胞内輸送 細胞内分解 飢餓応答 酵母

1. 研究開始当初の背景

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説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。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

出芽酵母の様々なオートファジー関連因子について、種々の変異体を構築し、タンパク質間相互作用、タンパク質修飾、タンパク質の細胞内局在、オートファゴソームの形成に生じる変化を調査した。また、いくつかのオートファジー関連因子を精製し、試験管内でその分子機能を解析した。さらに、既知のオートファジー関連因子と相互作用する因子を免疫沈降産物の質量分析により同定し、解析した。

4. 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、液胞内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、Atg36 をレセプターとする、ペルオキシソームの選択的オートファジーである。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 1) 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。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 がレテ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。

(3) 核膜孔複体の選択的オートファジーの発見

質量分析により、Atg8 と結合する因子として核膜孔複体を同定し、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複数の Atg9 小胞が融合して、隔離膜の前駆体を形成することを初めて明らかにした。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Ax12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（最近、他の研究チームから報告された）を利用して、Ax12がCOPII小胞を經由して隔離膜およびオートファゴソームの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少なくとも1つであることが示された。

(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。

(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Atg21を介する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への局在は失われ、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つの異なるメカニズムを介してオートファゴソーム形成の場に局在化することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計22件）

（原著論文）

（以下、全て査読有り）

1. 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)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
 6. Mochida, K, Ohsumi Y, Nakatogawa H. Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of α -mannosidase under nitrogen starvation conditions. *FEBS Lett.* 588, 3862-3869 (2014)
 7. 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)
 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)
- （英文総説）
9. Nakatogawa H. Eating the ER and the nucleus for survival under starvation conditions. *Mol. Cell Oncol.* 3, e1073416 (2016)（査読有り）

10. Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222 (2016) (査読無し)
11. Nakatogawa H, Mochida K Reticulophagy and nucleophagy: new findings and unsolved issues. *Autophagy* 11, 2377-2378 (2015) (査読無し)
12. Mochida K, Nakatogawa H. Appetite for ER/nucleus destruction. *Cell Cycle* 14, 3209-3210 (2015) (査読無し)
13. Nakatogawa H, Hrr25: An emerging major player in selective autophagy regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 11, 432-433 (2015) (査読無し)

(和文総説)

14. 中戸川 仁 オートファジーによるオルガネラの選択的分解:酵母における ER ファジーおよびヌクレオファジーの発見 *膜* 42, 181-185 (2017) (査読無し)
15. 持田 啓佑, 中戸川 仁 酵母における選択的オートファジー *実験医学増刊* 35, 82-89. (2017) (査読無し)
16. 持田 啓佑, 中戸川 仁 ER ファジーとヌクレオファジー オートファジーによる小胞体と核の分解 *化学と生物* 55, 86-87 (2017) (査読無し)
17. 中戸川 仁 (2016) オートファジー関連遺伝子の発見 *Medical Science Digest* 42, 558-560. (査読無し)
18. 小谷哲也, 中戸川 仁 (2016) オートファジーの分子メカニズム *臨床免疫・アレルギー科* 66, 301-308. (査読無し)
19. 中戸川 仁, 持田 啓佑 (2015) オートファジーによる小胞体と核の分解 *実験医学* 33, 2986-2989. (査読無し)
20. 持田 啓佑, 中戸川 仁 (2015) オートファジーによる小胞体と核の選択的な分解機構 *細胞工学* 34, 1076-1077. (査読無し)
21. 持田 啓佑, 中戸川 仁 (2015) 選択的なオートファジーによる小胞体および核の分解 *ライフサイエンス 新着論文レビュー* (査読無し)
22. 中戸川 仁 (2014) オートファジーにおける二つのユビキチン様結合システムの役割と作動機構 *生化学* 86, 441-451. (査読有り)

[学会発表](計 40 件)

以下、主要なものを抜粋(全て招待講演)

1. Hitoshi Nakatogawa, Molecular mechanisms underlying autophagic degradation of the ER, International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases, 2018 年 3 月 22 日 ~ 2018 年 3 月 23 日, 埼玉県和光市

2. 中戸川 仁, 酵母におけるオートファジーによるオルガネラ分解のメカニズム, ConBio2017 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会, 2017 年 12 月 6 日 ~ 12 月 9 日, 兵庫県神戸市
3. 中戸川 仁, オートファジーによるオルガネラ破壊のメカニズム, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月 8 日 ~ 2017 年 9 月 9 日, 千葉県野田市
4. 中戸川 仁, オートファジーによる核と小胞体の分解における膜ダイナミクス, 第 59 回日本脂質生化学会, 2016 年 6 月 16 日, 京都府京都市
5. Hitoshi Nakatogawa, Two different relationships between the ER and autophagy, International Symposium on Protein Quality Control, 2017 年 6 月 4 日, 奈良県奈良市
6. Hitoshi Nakatogawa, Mechanisms of membrane nucleation and expansion during autophagosome formation, The 8th International Symposium on Autophagy, 2017 年 5 月 27 日, 奈良県奈良市
7. 中戸川 仁, オートファジーにおける膜形成と分解標的認識のメカニズム:膜供給源であり分解対象でもある小胞体, 日本膜学会第 39 年会生体膜シンポジウム, 2017 年 5 月 27 日, 東京都新宿区
8. Hitoshi Nakatogawa, Revealing the mechanisms of nucleophagy and ER-phagy using the yeast model system, the KSBMB International Conference 2017, 2017 年 5 月 17 日 ~ 2017 年 5 月 19 日, Busan Korea.
9. 中戸川 仁, オートファジーによる核と小胞体の分解の分子基盤, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日 ~ 2016 年 9 月 27 日, 宮城県仙台市
10. Hitoshi Nakatogawa, Molecular mechanisms of autophagic degradation of the nucleus and the endoplasmic reticulum in yeast, 14th International Congress on Yeast, 2016 年 9 月 11 日 ~ 2016 年 9 月 15 日, 兵庫県淡路市
11. 中戸川 仁, オートファジーによる核と小胞体の選択的分解の分子機構, 第 68 回日本細胞生物学会, 2016 年 6 月 15 日 ~ 2016 年 6 月 17 日, 京都府京都市
12. Hitoshi Nakatogawa, Yeast cells eat the ER and nucleus to survive starvation conditions, the 2016 Minisymposium on Autophagy, 2016 年 4 月 15 日, 台北 台湾

13. Hitoshi Nakatogawa, Molecular Mechanisms of ER-Phagy and Nucleophagy in Yeast, Gordon Research Conferences, 2016年3月20日～2016年3月25日, California Ventura, USA
14. Hitoshi Nakatogawa, Hrr25 kinase regulates three selective autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, The 16th Northeastern Asian Symposium on Autophagy: from Basic to Medicine, 2014年12月18日～2014年12月21日, Busan Korea
15. Hitoshi Nakatogawa Hrr25 phosphorylates three receptor proteins to stimulate selective autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, CSH Asia Protein Modification & Homeostasis, 2014年06月16日～2014年06月20日, Suzhuo China

〔図書〕(計1件)

1. 大隅良典 監修、吉森 保、水島 昇、中戸川 仁 編集、南山堂、オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで、2017年 241 ページ 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nakatogawa-lab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中戸川 仁 (NAKATOGAWA, Hitoshi)
東京工業大学・生命理工学院・准教授
研究者番号：90414010

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし