

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18530

研究課題名(和文) 選択的オートファジー制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of selective autophagy

研究代表者

渋谷 周作 (Shibutani, Shusaku)

山口大学・共同獣医学部・助教(テニュアトラック)

研究者番号：20534473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：選択的オートファジーは細胞内の不要物・危険物を選択的に除去し、細胞内恒常性を維持していると考えられている。選択的オートファジーにおいては、分解基質に各種Atgタンパク質が集積することが知られているが、その後の過程については明らかではない。本研究の結果から、LC3をミトコンドリアに強制的にリクルートさせた時にミトコンドリア分解が起こることが明らかとなり、「隔離膜とミトコンドリアが接した部位でミトコンドリアが分裂し、その結果出来たミトコンドリア小片を隔離膜が包み込む」というモデルが予測された。また、隔離膜接触部位におけるミトコンドリア分裂に関わる未知のミトコンドリア分裂因子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Selective autophagy is thought to maintain intracellular homeostasis by eliminating unwanted/dangerous materials. Although it has been shown that Atg proteins accumulate on the substrate in selective autophagy, events that happen afterwards are not clear. In this study, we discovered that the forced recruitment of LC3 to mitochondria is sufficient to induce mitochondrial degradation. We hypothesize that mitochondrial fission is induced at the contact site with the isolation membrane, which later engulfs the mitochondrial fragment generated by the fission. Moreover, this study suggests the existence of unidentified mitochondrial fission factors responsible for the mitochondrial fission during selective autophagy of mitochondria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Atg オートファジー 選択的オートファジー ミトコンドリア マイトファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物において広く保存された細胞内分解系である。近年、オートファジーが各種疾患（発がん・神経変性・心不全・糖尿病など）の抑制、病原体排除、抗原提示などの免疫、発生・分化、寿命延長、などの生理機能をもつことが判明し、注目を集めている。

栄養飢餓や細菌感染などの刺激によりオートファジーが誘導されると、オートファゴソームと呼ばれる直径0.5~1.5 μmの膜小胞が細胞内に形成される。オートファゴソーム形成過程の初期においては、隔離膜と呼ばれるおわん型の2重膜構造が細胞内に形成される。隔離膜は5~10分という短時間で伸長、閉鎖し、2重膜小胞（オートファゴソーム）へと成熟する。その後オートファゴソームがリソソームと融合することで、オートファゴソーム内の細胞質成分が分解される。このように、オートファジーは膜構造の変化を介した大規模な分解系である。オートファジーはこの大規模分解により、栄養飢餓時においては細胞内にエネルギーやアミノ酸などを供給しており、これがオートファジーの作用としては典型的なものである。

オートファジーは当初、細胞質成分をランダムに分解する非選択的な分解装置だと考えられてきたが、近年の研究により、オートファジーが細胞内の異物（細胞内寄生細菌、損傷リソソーム、不良ミトコンドリアなど）を選択的に認識し、分解することが明らかになった。このタイプのオートファジーは「選択的オートファジー」と呼ばれる。選択的オートファジーは細胞内の不要物・危険物を選択的に除去し、細胞内恒常性を維持するシステムであると考えられている。

2. 研究の目的

選択的オートファジーのメカニズムとして、Atgタンパク質群がユビキチン依存的に分解基質にリクルートされてくることが明らかになっている。しかし、Atgタンパク質のリクルートの結果として、どのようにして分解基質の近傍でオートファゴソームが形成されるのか、またどのようにして選択的に基質を取り込むのか、など、選択的オートファジーには未だ不明な部分が多い。

本研究の予備実験において、選択的オートファジーにおけるAtgタンパク質の役割を調べるため、FKBP-FRBヘテロダイマー誘導実験系を用いて様々なAtgタンパク質（ULK1, FIP200, Atg2, Atg5, LC3, Atg9, Atg14, Atg16, WIPI1）を、選択的オートファジー分解基質の1つであるミトコンドリアにリクルートさせ、その効果を確認した。その結果、LC3をミトコンドリアにリクルートさせた時に高効率でミトコンドリア量が減少することを見出した。本研究においては、

この発見をさらに詳細に検討することで、選択的オートファジーの分子メカニズムの解明につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

FKBP-LC3 および FRB-Fis1(TM) (TM:Trans-membrane 領域)を哺乳類細胞に発現するためのプラスミドを作成し、HeLa細胞にリポフェクション法で遺伝子導入した。その後、細胞にラパマイシンアナログを投与し、FKBPとFRBのヘテロダイマー化を促進した。ミトコンドリア量の測定は、ミトコンドリア内膜タンパク質であるCOX IVおよび、外膜タンパク質であるTomm20を免疫染色し、蛍光顕微鏡下で観察することにより行った。また、オートファジーの初期マーカーであるAtg5の局在を調べるため、蛍光タンパク質VenusとAtg5の融合タンパク質を観察した。同様に、オートファジー初期マーカーのULK1とWIPI2についても免疫染色を行い、観察した。

膜電位を失った不良ミトコンドリアは選択的オートファジーによって分解されることが知られており、「マイトファジー」と呼ばれる。マイトファジーは、パーキンソン病原因遺伝子のParkinがミトコンドリア膜タンパク質をユビキチン化することで引き起こされる。本研究においては、COS7細胞およびマウス胎児繊維芽細胞(MEF細胞)に赤色タンパク質mCherryとParkinの融合タンパク質(mCherry-Parkin)を発現させ、ミトコンドリア脱共役剤であるCCCPで処理することでParkin依存性マイトファジーを誘導し、観察を行った。

4. 研究成果

FRB-Fis1(TM)を発現するミトコンドリアに、FKBP-LC3を強制的にリクルートさせたところ、24時間後に顕著なミトコンドリアの減少が認められた。また、このミトコンドリア量の減少はリソソーム阻害剤のBafilomycin A1で抑制されたことから、リソソームを介した分解であることが示された。

また、オートファジーの初期マーカーであるAtg5をVenus-Atg5を用いて観察したところ、FKBP-LC3をミトコンドリアにリクルートした際に多数のVenus-Atg5ドットが観察された。同様に、内在性のULK1とWIPI2を観察したところ、Venus-Atg5ドットと共局在した。これらのことから、FKBP-LC3をミトコンドリアにリクルートさせると、Venus-Atg5/内在性ULK1/内在性WIPI2陽性の、オートファジー初期段階の構造体が細胞内に蓄積することが明らかとなった。LC3のリクルートによりオートファゴソーム形成の開始が促進されている可能性が考えられるが、別の可能性としては、LC3の強制リクルートにより、定常状態で少しずつ起こっ

ている基底レベルのオートファジーが、ミトコンドリアに対する選択的オートファジーに「変換」されたことで、オートファゴソーム形成の進行が遅くなり、その結果 Atg5/ULK1/WIPI2 ドットが蓄積した可能性も考えられる。

FKBP-LC3 の LC3 部分に K51A 変異または G120A 変異を導入したところ、どちらの場合にもミトコンドリア量の減少および Venus-Atg5 ドットの増加が認められなくなった。LC3 の K51A 変異は、LC3 と LIR(LC3 interacting region) との結合を阻害する。また、G120A 変異は LC3 のホスファチジルエタノールアミン (PE) との結合を阻害する。これらのことから、観察されたミトコンドリア量減少および Atg5 陽性ドットの蓄積は、LC3 と LIR 配列を有するタンパク質との結合および、LC3 の PE 結合を必要とすることが示された。

一方、mCherry-Parkin および GFP-LC3 を発現する COS7 細胞で Parkin 依存性ミトファジーをライブ観察したところ、ミトコンドリア上に GFP-LC3 ドットが順次現れ、少しずつミトコンドリアを小片にして運び去っていく現象が確認された。つまり、オートファゴソームはミトコンドリアの近傍で形成を開始し、形成部位においてミトコンドリアが分裂することで小片状になり、オートファゴソームがミトコンドリア小片を包み込んだ後にミトコンドリアを離れる、という一連のプロセスが観察された。このことは、過去の報告 (Yang et al. 2013 *Nat Commun*) とも一致する。さらに、LC3-PE 化が起こらない Atg3 ノックアウト MEF に mCherry-Parkin および GFP-Atg5 を導入してライブ観察したところ、GFP-Atg5 のドット構造は正常にミトコンドリア上に現れるものの、その後ミトコンドリアの分裂を伴わないままミトコンドリアから離れることが確認された。このことから、Parkin 依存性ミトファジーにおいては、オートファゴソーム形成をミトコンドリア上で開始させるためには LC3-PE 化は必要無いが、オートファゴソームにミトコンドリア小片を包み込むためには LC3-PE 化を必要とすることが明らかとなった。このことは、FKBP-LC3 強制リクルートの実験系において、PE 結合能を持たない LC3(G120A) を用いた時にミトコンドリア分解を誘導できなかったことと一致する。

以上をまとめると、本研究の結果から、以下のようなモデルが考えられた。LC3 陽性の隔離膜がミトコンドリアに接触すると、その部分でミトコンドリアの分裂を引き起こし、小片状になる。ミトコンドリア小片に接する隔離膜は、そのままミトコンドリア小片を包み込み、閉鎖することでオートファゴソームが完成する。上記の実験結果からは、LC3 は PE 結合および、LIR 配列を有するタンパク質との結合が必要であることが推測される。

既知のミトコンドリア分裂因子である Drp1 や Mff はミトファジーにはほとんど寄与しないという報告もあり (Yamashita et al. 2016 *J Cell Biol*)、ミトファジーにおけるミトコンドリア分裂には、LIR 配列を有する未知のミトコンドリア分裂因子が重要である可能性が考えられる。

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 5 件)

1. Noguchi S, Shibutani S, Fukushima K, Mori T, Igase M, and Mizuno T. Bosutinib, an SRC inhibitor, induces caspase-independent cell death associated with permeabilization of lysosomal membranes in melanoma cells. *Vet. Comp. Oncol.* 2017 (受理済, doi: 10.1111/vco.12312) 査読有
2. Klionsky DJ, Shibutani S et al. (全著者 2467 人中 1910 番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12(1): 1-222. 査読無
3. Tsuruta Y, Shibutani ST, Watanabe R, Iwata H. The requirement of environmental acidification for Ibaraki virus infection to host cells. *J Vet Med Sci.* 2016; 78(1): 153-156. 査読有
4. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 2015; 16(10): 1014-1024. 査読有
5. 渋谷周作, 吉森保. オートファジーによる細菌排除. *Surgery Frontier.* 2015; 22(1), 66-68 査読無

[学会発表] (計 4 件)

1. Shibutani S. 栄養状態をモニターし細胞増殖を制御する mTORC1 の活性化機構 山口大学研究推進体「小動物のガンに対するトランスレーショナル研究ユニット」キックオフシンポジウム 2017.

山口大学（山口県山口市）2017年3月2日

2. Tsuruta Y, Shibutani S, Watanabe R, Iwata H.
イバラキウイルスの哺乳動物細胞侵入経路の解析
第159回日本獣医学会学術集会. 日本大学（神奈川県藤沢市）2016年9月7日
3. Fujiwara N, Shibutani S, Saitoh T, Akira S, Usui T, Ohama T, Sato K.
胃癌における Protein Phosphatase 6 の役割の解明
第159回日本獣医学会学術集会. 日本大学（神奈川県藤沢市）2016年9月6日
4. Shibutani S.
Membrane traffic as defense against intracellular dangers.
International Symposium on Intracellular Pathogens, Yamaguchi 2016. 山口大学（山口県山口市）2016年2月5日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称： mTORC1 活性化抑制剤
発明者： 渋谷周作、岩田祐之
権利者： 国立大学法人山口大学
種類： 特許
番号： 特願 2016-206578
出願年月日：2016年10月21日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者
渋谷周作 (Shibutani Shusaku)
山口大学, 共同獣医学部・助教
研究者番号：20534473

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし