

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18860

研究課題名(和文) 新規オートファジー実行に関わるゴルジ体機能分子の同定、機能解析と哺乳動物への応用

研究課題名(英文) Identification and analysis of genes regulating Atg5-independent autophagy

研究代表者

山口 啓史 (Yamaguchi, Hirofumi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：50644241

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)：オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを分解するシステムである。我々は、新たなメカニズムによるオートファジーを哺乳動物で見出した。さらに、同様の機構が出芽酵母にも保存されていることを見出した。本研究では、出芽酵母の遺伝学を用いて、出芽酵母における新規オートファジー実行に関わる分子を同定した。さらに、哺乳動物の相同遺伝子を探索し、哺乳動物における新規オートファジー実行に関わる分子を同定した。これらの分子は、飢餓で惹起される従来のオートファジーへの大きな関与は認められなかった。したがって、本研究で同定された分子は、新規オートファジーに特異的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a process that degrades subcellular constituents. We previously discovered Atg5/Atg7-independent alternative autophagy, and this pathway is phylogenetically conserved from yeast to mammals. Here, we identified genes regulating alternative autophagy in yeast by using yeast genetic screen, and analyzed the role in the autophagy. Moreover, we identified mammalian homologue of these genes, and we found that these genes are required for alternative autophagy in mammals. However, these genes are not involved in starvation-induced conventional autophagy, suggesting that these genes are specific to alternative autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 遺伝学

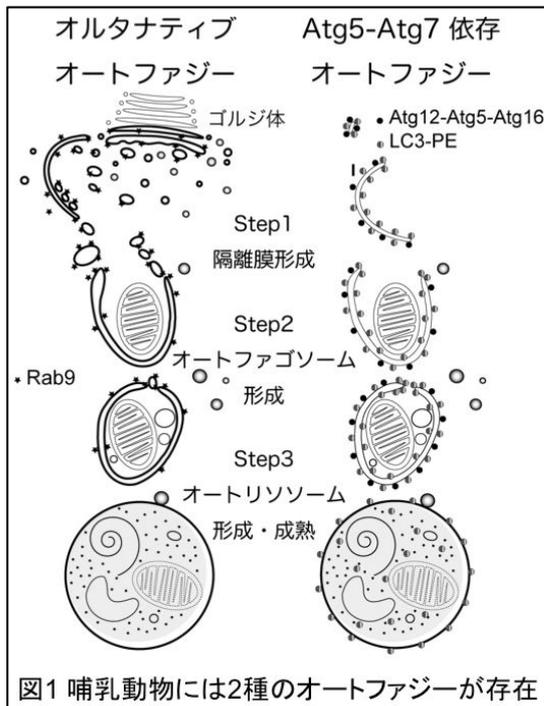
1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを分解するシステムであり、新陳代謝や細胞浄化などに貢献している。

オートファジー機構において、Atg5 や Atg7 は、必要不可欠な分子であると考えられてきた。しかしながら、我々は、Atg5 に依存しない新たなメカニズムによるマクロオートファジー(新規オートファジー)を発見し、隔離膜がトランス・ゴルジ由来の膜とエンドソームから形成されていることを明らかにした。

さらに、出芽酵母においても、Atg5 や Atg7 に依存しない新規オートファジーが存在し、哺乳動物細胞と同様に、トランス・ゴルジの膜から、オートファジーが形成されることを明らかにした。これらの事実から、新規オートファジーが哺乳動物細胞から出芽酵母まで保存されていることが考えられた。

Atg5 に依存したオートファジーの関連分子の多くが、出芽酵母の遺伝学から同定された事を勘案すると、新規オートファジーを遺伝学的に解析する事により、新規オートファジーの分子機構の全体像、生理的役割を明らかにできる可能性が高い。

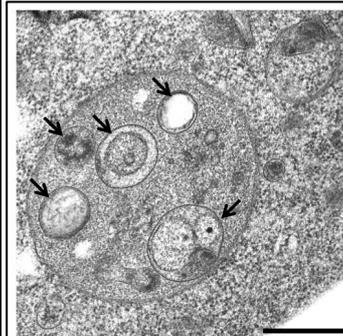
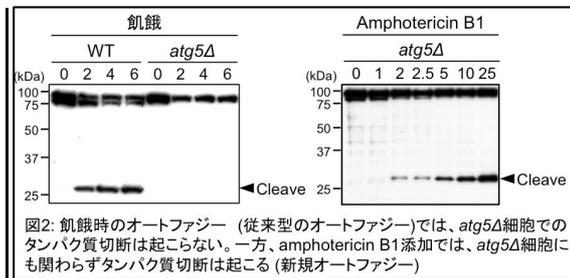


2. 研究の目的

(1) 出芽酵母の遺伝学を用いて、オートファジー実行に関わる分子を同定し、機能解析を行う。さらに、(2) 哺乳動物の相同遺伝子を探索し、哺乳動物における新規オートファジーにおける機構解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母の遺伝学を用いた、新規オートファジー実行に関わる分子の同定および機能解析



Atg5 欠損株を親株に、網羅的に遺伝子を破壊した2重欠損株を作製し、出芽酵母における新規オートファジー誘導剤 (amphotericin B1)を添加した。細胞質局在 GFP 融合タン

パク質の切断および液胞内オートファジーの形態を指標に、新規オートファジー誘導に抵抗性を示す破壊株を同定した。さらに、電子顕微鏡を用いて、微細構造観察を行った。

(2) 哺乳動物における新規オートファジーへの応用

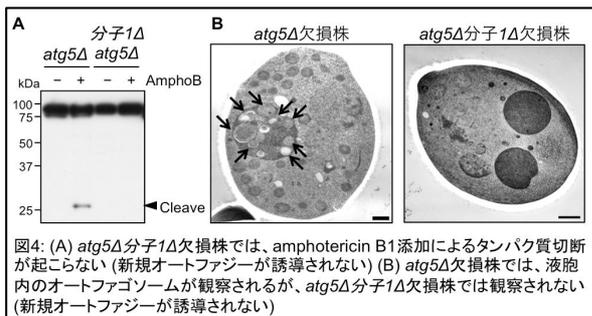
(1)で得られた、遺伝子の哺乳動物ホモログを同定し、Atg5 欠損線維芽細胞に対して、これら哺乳動物ホモログを、CRISPR-Cas9 系または siRNA を用いてノックアウトあるいはノックダウンした。これらの細胞に哺乳動物細胞における新規オートファジー誘導剤 (etoposide)を添加し、これらの細胞で新規オートファジーが惹起されているのか、抗 Lamp2 (オートリソソームマーカー)免疫染色によってオートファジーの形態を検証した。さらに、電子顕微鏡を用いて、微細構造観察を行った。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母の遺伝学を用いた、新規オートファジー実行に関わる分子の同定および機能解析

出芽酵母 Atg5 欠損株を親株に、網羅的に遺伝子を破壊した2重欠損株を作製し、GFP 融合タンパク質の切断および新規オートファジーの形態および液胞内のオートファジーの形態を指標に、スクリーニングを行った。その結果、出芽酵母における新規オートファジーに関わる分子として8つ同定した。これらを欠損した細胞株では、新規オートファジーが欠損しており、それに伴う GFP 融合タンパク質の切断や液胞内のオートファジーの形態が欠損していた。さらに、電子顕微鏡を用いて、微細構造観察を行った結果、6つの分子が隔離膜形成を制御し、2つの分子はオ

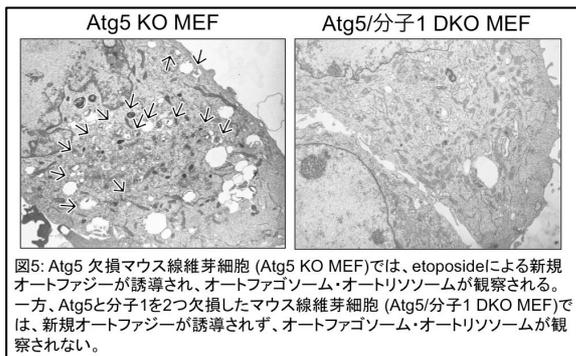
オートファゴソームとオートリソソームの融合に参与していることが示唆された。一方、野生型に対して、これら分子を欠損させ、飢餓による従来型のオートファジーの誘導を判定した。これら欠損株において、従来型のオートファジーが誘導されていたため、



これらの分子が新規オートファジー特異的に関与していることが考えられた。

## (2) 哺乳動物における新規オートファジーへの応用

(1)で得られた、遺伝子の哺乳動物ホモログを探索し、ノックアウトあるいはノックダウンさせた。これらの細胞において、新規オートファジーが惹起されているか否か、抗Lamp2免疫染色を用いて多寡を判定した。その結果、6つ哺乳動物相同遺伝子が哺乳動物細胞における新規オートファジーに関わる分子として同定された。次に、これらの細胞に対して、電子顕微鏡を用いて微細構造観察を行った。その結果、これらの分子が隔離膜形成に参与することが示唆された。一方、野生型飢餓で惹起される従来型のオートファジーへの大きな関与は認められなかった。これらの結果から、これらの分子が新規オートファジーに特異的に参与している可能性が示唆された。



## 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 1 件)

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., 査読有、35、2016、1991-2007、

10.15252/embj.201593191

〔学会発表〕(計 7 件)

山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣、Induction of Atg5-independent alternative macroautophagy by a disturbance of anterograde trafficking from the Golgi., The 8<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy, 2017/5/29~2017/6/1、奈良春日野国際フォーラム 麓 (奈良県・奈良市)

山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣、ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析., 免疫学・病態生化学領域合同シンポジウム, 2017/3/8、東京医科歯科大学 (東京都・文京区)

山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣、ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析、細胞競合・ダイニングコード合同ワークショップ, 2017/1/17~2017/1/19、ホテルコスモスクエア国際交流センター (大阪・大阪市)

山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣、Induction of Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals., 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜市)

山口啓史、ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析、第 10 回オートファジー研究会, 2016/11/13~2017/11/15、NASPA ニューオータニ (新潟・湯沢町)

山口啓史、荒川聡子、金関恵、清水重臣、Induction of Atg5-independent alternative macroautophagy by a disturbance of anterograde trafficking from the Golgi., 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015/12/1~2015/12/4、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

山口啓史、出芽酵母における新規マクロオートファジー機構の発見と遺伝学的解析、第 9 回オートファジー研究会, 2015/11/16~2015/11/17、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫・淡路市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/research-content.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 啓史 (Yamaguchi, Hirofumi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教  
研究者番号：50644241

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )