

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07707

研究課題名(和文) 酵母オートファゴソーム形成に必要な小胞輸送関連因子の同定とその役割

研究課題名(英文) Identification of vesicular-transport-related factors required for autophagosome formation and their roles

研究代表者

新谷 尚弘 (Shintani, Takahiro)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：70374973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母を材料とし、オートファジーに必要な小胞輸送関連因子の解析を行い、オートファジーと既存の小胞輸送経路の関連性をより明確にすることを目的とした。小胞融合因子であるYkt6の新しい変異株を作製し、これを用いることによって、オートファゴソームと液胞との融合にYkt6が必要であることを遺伝学的に示した。酵母遺伝子破壊株ライブラリーから小胞輸送に関わる遺伝子破壊株を抽出し、オートファジー活性を測定した。エンドソームから後期ゴルジ体への小胞輸送に関わる因子の遺伝子破壊株でリン酸飢餓オートファジーが特異的に欠損しており、当該輸送経路がリン酸飢餓誘導性オートファジーに関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは出芽酵母の栄養増殖には必須ではないため、その不能変異株は「飢餓条件における生存」を指標に分離された。その結果同定された多くのAtgタンパク質はオートファゴソームの形成に直接的に関与していることが明らかになっている。本研究では、オートファジーを支える周辺膜輸送系を明らかにすることができた。この成果はオートファジー過程の全貌を理解することに繋がると考える。また、将来的にオートファジーに関わる疾患の制御や創薬のための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the relationship between autophagy and the known vesicular traffic by analyzing the vesicular-trafficking factors required for autophagy in yeast. A new mutant of Ykt6, one of the vesicular-fusion factors, was made and used to show genetically that Ykt6 is necessary for the fusion of autophagosomes and the vacuole. The mutants defective in the vesicular trafficking were extracted from the yeast deletion library and used to determine the autophagic activity. We found that phosphate starvation-induced autophagy was significantly decreased in the mutants defective in the endosome to the late Golgi, suggesting that this pathway is involved in phosphate starvation-induced autophagy.

研究分野：応用微生物学

キーワード：オートファジー 出芽酵母 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、栄養飢餓に応答して細胞質成分を非選択的にオートファゴソーム(以下、APと省略)と呼ばれる二重膜構造体が囲い込み、リソソーム・液胞へ送り分解・再利用するカタボリックな機構であり、栄養飢餓に対する生存戦略の一つである。近年、細胞内に蓄積した凝集体や外部より侵入した細菌、傷害を受けたオルガネラなどの選択的な除去にもオートファジーが必要であることが示されている。これらの選択的なオートファジーは、栄養飢餓による誘導の有無にかかわらず基底レベルで起こり、細胞内の異常を常に監視し、細胞を正常な状態に保つ役割を果たしている。出芽酵母では、ある種の液胞加水分解酵素(アミノペプチダーゼ、 α -マンノシダーゼ)の輸送に選択的オートファジーが利用され、cytoplasm to vacuole (Cvt)経路と呼ばれている。1990年代より、出芽酵母を皮切りに、Atgタンパク質群が同定された。

出芽酵母のオートファジーの過程は、シグナルの感知あるいは基質の認識、オートファジー前駆構造(PAS)と呼ばれる前駆膜構造体の出現、PASから生成した隔離膜の伸長、伸長した隔離膜の先端同士との融合による二重膜構造のAPの形成、APの液胞膜との融合による内膜の放出、内膜と内容物の分解というダイナミックな膜動態を伴う。出芽酵母ではAP形成初期にゴルジ体由来のAtg9タンパク質含有小胞(Atg9小胞)がPASに集積すること(文献1)、窒素飢餓下では隔離膜の先端と小胞体 exit site と呼ばれる輸送小胞が出芽する部位が接していることが示されている(文献2)。また、申請者がタンパク質分泌経路に関わる遺伝子の温度感受性変異株(15種類)を用いて窒素飢餓誘導性オートファジーの測定したところ、解析したすべての株でオートファジーが著しく低下していた(H23-25年度科研費 基盤C)。これらのことから、飢餓条件下では、Atg9小胞による膜成分の供給に加えて、タンパク質分泌経路からのオートファジー経路への大規模な膜成分の供給があることが示唆されている。しかし、これらの因子がAP形成のマシナリーとして機能しているかは依然として不明である。むしろ、膜成分の供給源としてのタンパク質分泌経路の恒常性維持が、AP形成に重要であると考えられることでもある。

オートファジーは、栄養シグナル伝達経路の一つである target of rapamycin 複合体1(TORC1)経路の制御化でAtg13が脱リン酸化されることにより開始される。即ち、Atg13とAtg17からなる網目構造体の形成、Atg13とAtg1の結合によるAtg1キナーゼ活性の活性化が引き起こされる。Atg1-Atg13-Atg17超分子構造体を足場として、Atg9小胞のリクルート、Atg1によるAtg9のリン酸化を含む初期反応が起こる(文献3)。一方、選択的オートファジーの一種であるCvt経路は、栄養豊富な条件下で起こる。主要な輸送基質であるアミノペプチダーゼI(Ape1)が自己会合により超分子構造体を形成し、これが足場となり、APの形成反応が起こる。レセプターであるAtg19がApe1を認識し、さらにアダプターであるAtg11がApe1-Atg19複合体を認識する。Atg11はAP形成を担うAtg1複合体やAtg9小胞などとの相互作用を介して、それらをAtg1-Atg19複合体にリクルートする(文献4)。さらに近年、Ypt1とAtg11の相互作用がCvt経路に必要であることが報告された(文献5)。Ypt1は小胞膜融合に関わるRab GTPaseであり、Atg11は単なる選択的オートファジー経路におけるアダプタータンパク質ではなく、膜融合装置をもリクルートする重要な因子であることが示唆された。上述のCvt経路に加え、私たちはリン酸飢餓時におこる非選択的なオートファジーにもAtg11が必須であることを示した。他の研究者によってもSNAREがオートファジーに必要であることが報告されているが、未だにそれらのオートファジーにおける機能は明らかでない(文献6)。

2. 研究の目的

小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、液胞は小胞の出芽と融合により連絡された細胞内膜系を形成している。それらは固定された不変のオルガネラではなく、小胞の出芽と融合のバランスによって形態や機能が維持されている。APもこの細胞内膜系の一部として形成される一時的なオルガネラであることが示唆されている。そのため、AP形成にも小胞の膜融合が関与することが予想される。しかし、AP形成を直接担う小胞輸送関連因子はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、遺伝学、生化学、細胞生物学、分子生物学の手法が簡便に扱える出芽酵母を用いて、オートファジーに必要な小胞輸送因子を同定し、それらのオートファジーにおける機能やAtgタンパク質との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)SNAREタンパク質Ykt6の機能解析

SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)と呼ばれるヘリックスを含む膜タンパク質群であり、小胞上にあるv-SNAREと標的膜上のt-SNAREの計4種のSNAREがヘリックスのバンドルを形成することにより膜融合が起こる。一般的にSNAREはそのC末端に膜貫通領域を持っており、固有の供与膜に局在し標的膜へと輸送される。一方、Ykt6は膜貫通領域を持っておらず、C末端の脂質修飾によって供与膜に局在化する。さらにYkt6は小胞体-ゴルジ体間、ゴルジ体間、ゴルジ体-液胞間、エンドソーム-液胞間、液胞同士の膜融合などの多様なオルガネラ間の輸送に関与していることが報告されており、オートファ

ジーにも関与することが期待された。そこで、Kweon らによって報告された複数の *ykt6* 変異株 (*ykt6-11*、*ykt6-12*、*ykt6-13*) を用いてオートファジーの解析を行った(文献7)。

(2)オートファジー特異的欠損を示す *ykt6* 変異株の作製

ykt6-13 変異株では、AP と液胞との融合に欠損があった。しかし、ゴルジ体-液胞間、エンドソーム-液胞間、液胞同士の膜融合にも欠損があり、二次的効果で AP と液胞との融合に欠損を示している可能性があった。そこで、*ykt6-13* アレルに含まれる 5 つのアミノ酸置換を組み合わせることによって、AP-液胞融合に特異的欠損を示す温度感受性変異株 (*ykt6-104*) を作製した。

(3)Ykt6 をレポーターとしたオートファゴソームへの膜輸送の解析

野生型 Ykt6 の C 末端に SNARE タンパク質 Gos1 の膜貫通領域を融合し (Ykt6-TMD)、強制的に細胞内膜に局在させた。この Ykt6-TMD を(2)で作製した *ykt6-104* 株で発現させ、Ykt6-TMD の AP への局在化を解析した。Ykt6-TMD が AP に輸送されれば、*ykt6-104* 株の AP-液胞融合の欠損が相補される。

(4)リン酸飢餓誘導性オートファジーにおける膜融合関連因子の必要性

Atg11 は窒素飢餓誘導性オートファジー (nitrogen starvation-induced autophagy; NSiA) には必要ないが、リン酸飢餓誘導性オートファジー (phosphate starvation-induced autophagy; PSiA) には必須であった。このことから、PSiA には NSiA とは異なる機構が働いている可能性があった。そこで、細胞内膜輸送経路に関わる因子の欠損株において PSiA の解析を行い、必要な因子の探索を行った。

(5)Cvt カーゴ複合体に結合する膜タンパク質の解析

選択的オートファジーにおいては、その輸送基質の周辺にオートファゴソーム膜が形成される。そこで、輸送基質にリクルートされるタンパク質の同定を試みた。すなわち、主要な輸送基質であるアミノペプチダーゼ I (Ape1) にペプチド・タグ (PA-タグ) を融合し、免疫沈降を行った。特異的に結合するタンパク質を LC-MS で解析した。

4. 研究成果

(1)SNARE タンパク質 Ykt6 の機能解析

YKT6 の温度感受性変異株 *ykt6-11* 株、*ykt6-12* 株、*ykt6-13* 株においてオートファジー活性を測定したところ、*ykt6-11* 株、*ykt6-12* 株では制限温度 (37°C) で、*ykt6-13* 株では許容温度 (23°C)、制限温度でオートファジーの欠損が見られた。オートファジーのレポータータンパク質である GFP-Atg8 を指標として、AP 形成の有無を解析したところ、*ykt6-11* 株、*ykt6-12* 株では AP 形成が阻害されており、*ykt6-13* 株では AP と液胞の融合が阻害されていることが明らかとなった。この株では、液胞が断片化されており (つまり、液胞の同型融合不全)、液胞への SNARE の輸送不全が間接的に AP-液胞融合の欠損を引き起こしたことが推測された。

(2)オートファジー特異的欠損を示す *ykt6* 変異株の作製

ykt6-13 アレルに含まれる 5 つのアミノ酸置換を様々な組み合わせで導入し、オートファジー活性を測定したところ、186 番目、188 番目のアミノ酸に置換が生じている変異株 (*ykt6-104* と命名) において制限温度 (37°C) でオートファジー活性が失われており (許容温度では正常)、その原因は AP-液胞融合の欠損であることを明らかにした。この株の液胞形態、液胞 SNARE の局在は、制限温度でも野生株と同等であった。また、Ykt6 が AP に局在することを蛍光顕微鏡観察によって明らかにした。これらのことから、*ykt6-104* 変異による機能欠損が AP-液胞融合の不全の直接的な原因であると結論した。

SNARE 複合体の ヘリックス (SNARE ドメイン) のバンドルには、ヘリックス同士の相互作用に寄与するアミノ酸が層状に存在する。その中心は 0-layer と呼ばれ、1 つのアルギニン (R) と 3 つのグルタミン (Q) により形成される。AP-液胞融合には Ykt6 (R-SNARE) と Vam7 (Qa-SNARE)、Vti1 (Qb-SNARE)、Vam7 (Qc-SNARE) が関わっていると考えられた。液胞膜には Nyv1 と呼ばれる R-SNARE が存在する。*ykt6-104 nyv1Δ* 二重変異株を作製したところ、液胞は断片化した。このことから、Ykt6 と Nyv1 は液胞の同型融合において機能重複していることが明らかとなった。

(3)Ykt6 をレポーターとしたオートファゴソームへの膜輸送の解析

Ykt6 の C 末端には膜貫通領域は無く、代わりに脂質修飾を受ける領域が存在する。C 末端への脂質の付加と脱離によって、Ykt6 は細胞質と膜を行き来する。蛍光顕微鏡観察の結果、Ykt6 の C 末端に Gos1 の膜貫通領域を融合した Ykt6-TMD は小胞体に局在することが明らかとなった。しかし、Ykt6-TMD は *ykt6Δ* 株の生育不全を相補することはできなかった。そこで、Ykt6-TMD を *ykt6-104* 株で発現させ、オートファジー活性の測定を行ったところ、わずかにオートファジーの回復が観察された。*ykt6-104* 株は制限温度で AP-液胞融合が不全であるため、Ykt6-TMD がオートファゴソームに供給され、オートファジー活性が回復したと考えられた。つまり、小胞体を始めとする細胞内膜系から AP への膜の供給が行われたことが示唆された。

(4)リン酸飢餓誘導性オートファジーにおける膜融合関連因子の必要性

酵母遺伝子破壊株ライブラリーから小胞輸送に関わる遺伝子破壊株を抽出し、PSiA および NSiA 活性を測定した。エンドソームから後期ゴルジ体への小胞輸送に関わる Tlg2 (SNARE)、GARP (Golgi-associated retrograde protein) 複合体、COG (conserved oligomeric Golgi) 複合体の欠損株で PSiA 特異的に欠損を示した。PSiA では NSiA と比べてオートファジー誘導活性が著しく低い。エンドソームから後期ゴルジ体への小胞輸送が低活性のオートファジーを支える仕組みに貢献していることが示唆された。

(5)Cvt カargo複合体に結合する膜タンパク質の解析

Ape1 を過剰発現させると AP では包みきれない巨大なカargo複合体が形成される。窒素飢餓時には巨大カargo複合体を取り囲むように形成途中の AP 膜が形成される。そこで Ape1 にペプチド・タグを融合させ、カargo複合体とその結合膜の単離を試みた。SDS-PAGE で展開したところ Ape1 の他に何種かバンドが検出されたので、LC-MS 解析によってタンパク質の同定を行った。しかし、それらのバンドは Ape1 であった。Ape1 同士が酸化・架橋された分子種を形成していたことが考えられた。

引用文献

1. Yamamoto *et al.* (2012) *J. Cell Biol.*, **198**, 219-233
2. Graef *et al.* (2013) *Mol. Biol. Cell*, **24**, 2918-2931
3. Yamamoto *et al.* (2016) *Dev. Cell*, **38**, 86-99
4. Shintani *et al.* (2002) *Dev. Cell*, **3**, 825-837
5. Lipatova *et al.* (2012) *PNAS*, **109**, 6981-6986
6. Nair *et al.* (2010) *Cell*, **146**, 290-302
7. Kweon *et al.* (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1868-1881

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokota Hiroto, Gomi Katsuya, Shintani Takahiro	4. 巻 483
2. 論文標題 Induction of autophagy by phosphate starvation in an Atg11-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 522 ~ 527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2016.12.112	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 久保優里花、浦野真吾、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 出芽酵母におけるYkt6とNyv1の液胞輸送経路における機能重複
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦野真吾、久保優里花、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 Ykt6とNyv1の液胞輸送経路における機能重複
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Urano, Nozomi Kikuchi, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani
2. 発表標題 Functional analysis of Ykt6 in autophagic process
3. 学会等名 2018 Yeast Genetic Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦野真吾、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 オートファゴソームと液胞の融合におけるYkt6の関与
3. 学会等名 第50回酵母遺伝学研究会フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浦野真吾、菊地のぞみ、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 出芽酵母オートファジーにおけるYkt6のオートファゴソームと液胞の融合への関与
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------