

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19207015

研究課題名（和文） オートファジーによる生存戦略の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of autophagy as a cellular survival strategy

研究代表者

吉森 保 (YOSHIMORI TAMOTSU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：60191649

研究成果の概要（和文）：

真核細胞は、細胞内大規模分解系オートファジーを多面的に活用し生存維持をはかっている。生存戦略としてのオートファジーの理解を進めるために、オートファジーの分子解剖を行った結果、Atg16L 複合体によってオートファジーを担う膜構造に LC3 が繋ぎとめられることや、その LC3 が膜構造の完成に働くことを見出した。また膜構造の形成が、小胞体を作る特殊な揺りかご構造の内部で行われることも突き止めた。

研究成果の概要（英文）：

Eukaryotic cells maintain their life by using autophagy, an intracellular bulk degradation system in the diverse aspects. To understand autophagy as a cellular survival strategy, we achieved molecular dissection of autophagy. In results, we found that Atg16L complex anchors LC3 to the autophagic membrane structure and that LC3 is required for completion of the structure. Furthermore, formation of the structure occurs inside of the special "cradle" derived from the endoplasmic reticulum membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2009年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2010年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファゴソーム、隔離膜、生存維持、Atg16L, LC3, 膜の起源

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物に普遍的に存在する細胞内大規模分解システムであるオートファジーでは、扁平な袋状の膜構造（隔離膜）が細胞質に出現し、細胞質成分やオルガネラの一部を囲い込み、閉じてオートファゴソームと呼ばれる2重膜構造を形成する。そこにリソソームが融合、消化酵素が流入し内容物の分解が起こる。常に低頻度で起こり細胞成分の代謝回転に貢献する一方、飢餓時には激しく誘導され

生存に必要な栄養源確保を行う。オートファジーの存在は1960年代初頭から知られていたが、その実態は永らく不明であった。しかし酵母遺伝学の先駆的研究がブレイクスルーとなり、近年爆発的に理解が進みつつある。その結果、病原体排除、抗原提示、発生・分化、発がん・変性疾患・心不全・糖尿病等の疾患抑制におけるオートファジーの重要性がここ数年の間に次々と示され、オートファジーが予想外の多彩な機能を持つこ

とが明らかとなってきた。これらの機能の多くは、生命維持に関わっている。オートファジーという細胞機能の多面的活用による生存戦略が存在するといえよう。オートファジーが様々な役割を持つことが判明する一方で、その分子機構はいまだ謎が多い。オートファジーに関する論文数は急増しているものの、その多くは現象の記述であり、メカニズムの本格的解析は少数にとどまっている。オートファジーの理解には、分子機構の解明が不可欠であり、またそれなくしてオートファジーの生理的・病理的意義の全容も明らかにはできない。

## 2. 研究の目的

本研究では、生存戦略としてのオートファジーの全容を理解するため、哺乳動物細胞を用いてその分子解剖を行い、オートファジーを駆動・制御するメカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

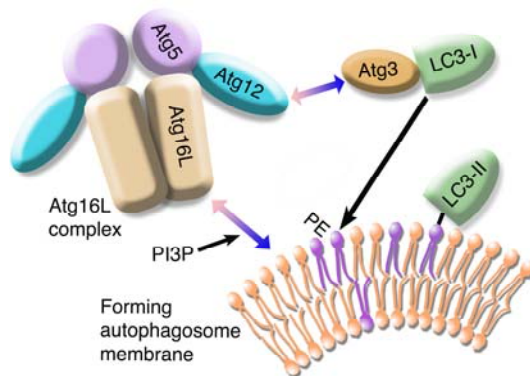
酵母においてオートファゴソーム形成に必須のタンパク質群 **Atg** が同定されているので、その哺乳動物ホモログの解析を通して分子解剖を実施した。複雑な膜動態を伴うオートファゴソーム形成を解析するために、分子生物学、生化学、細胞工学、光顕電顕によるイメージング等を駆使し多面的なアプローチを行った。

## 4. 研究成果

### (1) Atg16L 複合体の機能解明

Atg8 の哺乳類ホモログ LC3 は proLC3 として生合成されると直ちに C 末端 2 残基が切断され LC3-I となった後、リン脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE) とユビキチン化様反応により共有結合し LC3-II となる。LC3-I は細胞質に、LC3-II は隔離膜及びオートファゴソーム膜に局在する。一方隔離膜に結合する Atg16L を強制的に細胞膜に分布させると、LC3 も細胞膜に局在化した。すなわち、LC3 自身は局在化のシグナルを持たず、Atg16L によって隔離膜にリクルートされることが判明した。さらに Atg16L と複合体を形成している Atg12 が、LC3 のユビキチン化様反応の E2 酵素にあたる Atg3 と結合することにより LC3 の反応中間体を隔離膜に導き最終的な脂質化がそこで起こることを見いだした。すなわち Atg16L 複合体は、LC3 のユビキチン化様脂質化反応の E3 リガーゼとして機能していることを世界で初めて示した。この成果により、LC3 が複雑な翻訳後修飾によりオートファゴソームに局在化する過程の全容が明らかとなった。Atg16L 複合体は、一般的な E3 リガーゼが基質としてタンパク質を認識するのに対し、膜構造を認識する点が極めてユニークである。本成果を報告した論文 (Mol Biol Cell. 19, 2092-2100, 2008) は、FACULTY OF 1000 BIOLOGY において Must

read paper に認定された。



さらに、Atg16L 複合体の解析を進め、以下の点を明らかにした。①複合体に入らない余剰な Atg16L は、速やかにプロテアソーム系により分解される。②ゲル濾過では Atg16L 複合体は、みかけの分子量として 800kDa という大きな値を示すが、実際には 240kDa で Atg5, Atg12, Atg16L の 2 量体である。③ Atg16L の C 末端に存在する WD リピートドメインを欠損する変異体を、Atg16L-KO 細胞に発現させるとオートファジーが正常まで回復することから、このドメインはオートファジーそのものには必要ではない。WD リピートドメインは、酵母の Atg16L には存在しないことから、多細胞生物特有のなんらかの制御機能を担っているのかも知れない。(J Biol Chem. 284, 32602-32609, 2009)

### (2) LC3-II の機能解明

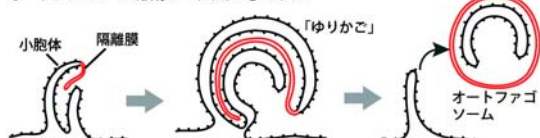
LC3-II はオートファゴソーム膜マーカーとして世界中で用いられているものの、オートファジーにおける役割は判明していなかった。我々は、proLC3 のプロセッシングを特異的に行うタンパク質分解酵素 Atg4B の不活性化変異体が、当該酵素反応の産物である LC3-I に強固に結合し LC3-II の形成を阻害するという奇妙な性質を持つことを見出した。その結果、Atg4B 変異体発現細胞ではオートファジーが抑制される。しかし、オートファゴソームの前駆体である隔離膜は形成されていた。ただし、隔離膜の末端が融合して閉鎖しオートファゴソームとなる段階が阻害され、未閉鎖のものが蓄積していた。従って脂質化 LC3 は、隔離膜の閉鎖 (末端の融合) に働いていることが明らかになった。Atg4B 変異体は、オートファジー阻害ツールとして有用で、多くの研究者が用いている。(Mol Biol Cell. 19, 4651-4659, 2008)

### (3) 隔離膜形成の場の発見

2 で述べた Atg4B 変異体発現細胞では、通常なら 5 分ほどでオートファゴソームになってしまう隔離膜の中間体が蓄積する。それを長浜バイオ大の山本章嗣教授らとの共同研究により電子顕微鏡で詳細に観察したところ、常に小胞体に両側から挟まれていることが判明した。これは正常細胞の隔離膜でも

同様に、その3次元構造を電子線トモグラフィで検討した結果、隔離膜が小胞体の局所に形成される特殊な「ゆりかご」状構造内で成長することと隔離膜と小胞体が臍の緒のようなチューブ状の膜で繋がっていることが示された。この結果は、長年論争的となってきたオートファゴソームの起源を知る大きな手がかりとなるものであり、分野内外で反響を呼び専門誌の総説で取り上げられると共に新聞報道された。(Nat Cell Biol. 11, 1433-7, 2009)

オートファゴソーム形成の「ゆりかご」モデル



(4) オートファジーによる損傷リソソームの除去の発見

薬剤やシリカ等でリソソームの膜を傷つけると、速やかにAtgタンパク質がリクルートされ、最終的に損傷リソソームはオートファジーによって分解されることを世界に先駆け発見した。損傷リソソームは、加水分解酵素の放出などにより細胞にとって極めて有害なので生体防御のためオートファジーによる隔離と分解が行われるのであろう。(未発表)

#### 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 35 件)

1. Tabata K, Matsunaga K, Sakane A, Sasaki T, Noda T, Yoshimori T\*. Rubicon and PLEKHM1 Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain. *Mol Biol Cell*. 21, 4162-4172 (2010) 査読有
2. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T\*, Yoshimori T\*. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol*. 190, 511-521 (2010) 査読有
3. Taguchi-Atarashi N, Hamasaki M, Matsunaga K, Omori H, Ktistakis NT, Yoshimori T\*, Noda T\*. Modulation of Local PtdIns3P Levels by the PI Phosphatase MTMR3 Regulates Constitutive Autophagy. *Traffic*. 11, 468-478 (2010) 査読有
4. Yamaguchi H, Nakagawa I, Yamamoto A, Amano A, Noda T, Yoshimori T\*. An initial step

of GAS-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7. *PLoS Pathog*. (2009) 5 : e1000670.

doi:10.1371/journal.ppat.1000670 査読有

5. Saitoh T§, Fujita N§, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T\*, Akira S\*. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 20842-20846 (2009) (§ These authors contributed equally to this work.) 査読有
6. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T\*, Yamamoto A\*. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 11, 1433-1437 (2009) 査読有
7. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T\*. Differential involvement of ATG16L1 in Crohn's disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the ATG16L1 complex in fibroblasts. *J Biol Chem*. 284, 32602-32609 (2009) 査読有
8. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda, K, Ichimura I, Isobe T, Akira S, Noda T, Yoshimori T\*. Two Beclin-1 binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biol*. 11, 385-396 (2009) 査読有
9. Saitoh T§, Fujita N§, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T\*, Akira S\*. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 456, 264-268 (2008) (§ These authors contributed equally to this work.) 査読有
10. Fujita N, Hayashi M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T\*. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol Biol Cell*. 19,

4651-4659 (2008) 査読有

11. Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, Takada H, Goldman WE, Fukase K, Silverman N, Yoshimori T, Kurata S\*. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. Nat Immunol. 9, 908-916 (2008) 査読有

12. Fujita N, Itoh T, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T\*. The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. Mol Biol Cell. 19, 2092-2100 (2008) 査読有

13. Kimura S, Noda T, Yoshimori T\*. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy. 3, 452-460 (2007) 査読有

[学会発表] (計 39 件)

1. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic Insights into Membrane Dynamics in Autophagy, The 68th Harden Conference “Autophagy: from molecules to disease” in Cirencester, UK (2010. 9. 8)

2. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic insight into membrane dynamics of mammalian autophagy, Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And Disease” in Lucca, Italy (2010. 4. 27)

3. Tamotsu Yoshimori, Binding Rubicon to Cross the Rubicon, EMBO Conference Series on Autophagy: Cell Biology, Physiology & Pathology in Ascona, Switzerland (2009. 10. 19)

4. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic Insight into Membrane Dynamics in Mammalian Autophagy, Gordon Research Conference “Molecular Membrane Biology” in Andover, NH, USA (2009. 7. 8)

5. Tamotsu Yoshimori, Where they come from?: Mechanistic insight into autophagosome formation in mammals, Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And Disease” in Ventura, CA, USA (2008. 1. 6)

6. Tamotsu Yoshimori, New insight into Molecular Mechanisms of the Canonical and Specialized Autophagy Keystone Symposia on “Autophagy in Health and Disease” in Monterey, California, U.S.A. (2007. 4. 15)

[図書] (計 4 件)

1. Yoshimori T, Amano A. Group A streptococcus: a loser in the battle with autophagy. Curr Top Microbiol Immunol. 335, 217-226 (2009) Springer

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/jp/achievement/010/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉森 保 (YOSHIMORI TAMOTSU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号： 60191649