

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570189

研究課題名（和文） オートファゴソーム膜伸展機構の解明

研究課題名（英文） Studies on mechanisms of autophagosome formation

研究代表者

鈴木 邦律（SUZUKI KUNINORI）

東京工業大学・統合研究院・特任助教

研究者番号：20373194

研究成果の概要（和文）：

オートファジーの中心を担うオートファゴソームという細胞内小器官が発見されてから今日まで、オートファゴソームを単離してタンパク質組成や脂質組成を分析しようとする様々な試みがなされてきた。しかしながら今まではっきりとした報告はなかった。報告者は、本研究課題を通じてオートファゴソーム濃縮画分を得る方法を確立し、ショットガンプロテオミクスにより、オートファゴソーム内部に取り込まれるタンパク質を網羅的に同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Analysis of protein/lipid components of autophagosomes has been long-standing problem for autophagy study. We have developed a method to obtain an autophagosome-enriched fraction by combination with biochemical and morphological techniques. Furthermore, we have succeeded to identify dozens of proteins included in the fraction by shotgun proteomic analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：オートファジー・オートファゴソーム・ATG遺伝子・タンパク質分解・出芽酵母・プロテオーム・オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核細胞に普遍的に見られる現象であり、細胞内の大規模かつ非選択的な分解機構として知られている。その中心を担っているのがオートファゴソーム（以下 AP）と呼ばれる脂質二重層の二重膜で区画化されたオルガネラである。AP は栄養飢餓により顕著に形成されるが、形成後は速やかに分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合して内容物と共に分解される。出芽酵母において、AP 形成のステップに必須な 18 種類の ATG (autophagy-related) 遺伝子が得られ、機能解析が進められてきた。その過程で Atg タンパク質がいくつかの機能群を構成して機能していることが明らかとなってきた。しかしながら、それらの機能群がオートファジーに関わる膜動態とどのように関連しているのかはほとんど分かっていなかった。

まず、Atg8 が AP に局在するタンパク質として同定された。申請者はオートファジーの温度感受性変異株を作製して、GFP を融合した Atg8 を蛍光顕微鏡下に経時的に観察した。その結果、AP が液胞近傍の一点から次々と作り出される様子を可視化することに成功した (Suzuki, *et al.*, *EMBO J.*, 2001)。この Atg8 の集積した領域は pre-autophagosomal structure (以下 PAS) と名付けられた。現在 PAS の概念はオートファジー研究者の間で広く受け入れられている。また、申請者が導入し、改良を施した経時観察用蛍光顕微鏡システムは哺乳動物細胞における AP 形成過程の可視化にも大きく貢献した (Mizushima, *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2001)。

2. 研究の目的

Atg8 は PAS に集積した後、AP の前駆膜構造である隔離膜に移行して隔離膜を伸展させる役割を果たす。AP 形成過程の解析が困難なのは、PAS と隔離膜と AP とを区別する手法が確立していなかった点にある。申請者は PAS から隔離膜を経て AP が完成するまでの一部始終を可視化すべく研究を進めてきた。その結果、蛍光顕微鏡法を用いて PAS と隔離膜と AP とを区別することに成功した。この手法を応用して AP 形成過程における隔離膜の動態を追跡すると共に、生化学的に隔離膜を単離し、隔離膜上に局在する生体分子を形態学的かつ生化学的に同定することを目的とした。

3. 研究の方法

AP は伸展した隔離膜が閉じることで完成するので、隔離膜の伸展機構を解析することは AP 形成を理解する上で最も重要な項目の一つである。これまで隔離膜上に局在する Atg タンパク質を同定する方法が免疫電

子顕微鏡法以外になかったことから、Atg タンパク質の局在解析は遅々として進まなかった。報告者は、AP の選択的積荷タンパク質であるアミノペプチダーゼ 1 (Ape1) を過剰発現することにより、細胞内に隔離膜が蓄積することを見いだした (図 1)。この手法を利用して隔離膜進展の分子機構を解明することを目指す。

隔離膜の由来に関しては、小胞体などの既存のオルガネラ膜が機能変換して隔離膜になるという説や、小胞が次々と融合

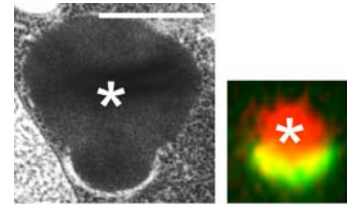


図1 隔離膜の可視化。過剰発現された Ape1 (*) を取り囲むようにお椀状の隔離膜が見られる。(左) 電子顕微鏡像。(右) 蛍光顕微鏡像。GFP-Atg8により隔離膜が可視化されている。スケールバーは500 nm。

して隔離膜を伸展させるという説など諸説が入り乱れているが、決定的な証拠はない。このような混乱を招いている最大の要因は、隔離膜のマーカ分子が乏しいことにある。まず隔離膜に局在するタンパク質を同定し、できるだけ多くのマーカ分子を得ることが喫緊の課題である。

また、AP を単離する手法を確立し、AP に含まれるタンパク質や脂質の組成を解析することを通じてマーカ分子の同定を狙う。

4. 研究成果

隔離膜のマーカとなる Atg タンパク質を同定するために Ape1 を過剰発現した細胞を使用して蛍光顕微鏡による Atg タンパク質の局在解析を行った。その結果、Atg8 が隔離膜に局在することが確かめられた。そこで、Atg8 を基準に他の Atg タンパク質の局在を詳細に解析したところ、Atg タンパク質は隔離膜形成時にそれぞれ特徴的な局在を示すことが分かった (図 2)。この成果を基に、現在論文の執筆を進めている。

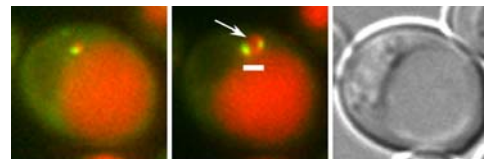


図2 隔離膜の伸展。RFP-Atg8を経時観察することにより、隔離膜が点状からお椀状へと伸展していく様子が観察される。またGFPで標識したAtgタンパク質(緑)がお椀の縁に複数の点として分布している様子が観察される。(左) 観察開始時の細胞。(中央) 4分後の細胞。(矢印) 隔離膜。(右) 微分干渉像。スケールバーは1 μm。

AP の解析に関しては大きな伸展があった。これまでは細胞破碎液中の AP の安定性を検証する方法が限られていたことから、明確な結果は得られてこなかった。報告者は、本研究課題を通じて、細胞破碎液中では、AP は浸透圧の低下に敏感に反応し、崩壊すること、

細胞破碎液中で AP を形態的に検出するには、積荷タンパク質である Ape1 の過剰発現が必須であること、GFP-Ape1 を蛍光顕微鏡観察することによって AP の存在をモニターできること、これらのモニタリング法を利用し、密度勾配遠心法を用いて AP を濃縮した画分が得られること、(図 3) ショットガンプロテオミクスにより、AP 内部に取り込まれるタンパク質を網羅的に同定できることを示してきた。

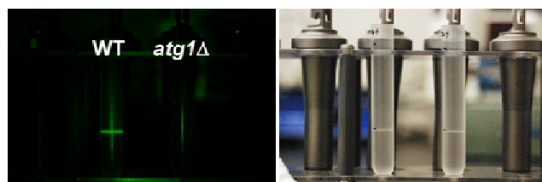


図3 オートファゴソーム画分の単離。緩衝液中で細胞を破碎し、密度勾配遠心法によりオートファゴソーム画分を得た。GFP-Ape1をマーカーとし、GFPの蛍光によりオートファゴソーム画分を可視化した(左)。通常の明視野像(右)。

現在プロテオミクスのデータを分析することにより、AP 内部に選択的に積み込まれるタンパク質の候補を数十個同定している。近年報告のあったリボソームを構成するタンパク質や、かつて我々のグループが同定した Ald6 などが候補に含まれていることから、この解析は妥当であるといえよう。リボソームや Ald6 が AP に選択的に取り込まれる機構は未知だったので、リボソームと Ald6 の分解を指標に細胞質タンパク質が AP 内部に選択的に取り込まれる分子機構を解析し、それに関わっているタンパク質を同定した。現在ここまでのデータをまとめて論文を執筆している。

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 12 件)

- ① Suzuki, K., Ohsumi, Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). FEBS Lett. 584: 1280-1286 (2010). 査読有り
- ② Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10: 458-467 (2009). 査読有り
- ③ Kabeya, Y., Noda, N.N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F., Ohsumi, Y. Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 389: 612-615 (2009). 査読有り
- ④ Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., Ohsumi, Y. Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. Genes Cells 14: 525-538 (2009). 査読有り
- ⑤ Watanabe, Y., Noda, N.N., Honbou, K., Suzuki, K., Sakai, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. Crystallization of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-mannosidase, a cargo protein of the Cvt pathway. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 65: 571-573 (2009). 査読有り
- ⑥ Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., Ohsumi, Y. Cisl/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 356(2), 405-10 (2007) 査読有り
- ⑦ Adachi, W., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Ohsumi, Y., Inagaki, F. Crystallization of *Saccharomyces cerevisiae* aminopeptidase 1, the major cargo protein of the Cvt pathway. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 63(3), 200-3 (2007) 査読有り
- ⑧ Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., Ohsumi, Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. Genes Cells 12, 209-18 (2007) 査読有り
- ⑨ Suzuki, K., Ohsumi, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 581(11), 2156-61 (2007) 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

- ① 鈴木邦律 オートファジーによる選択的タンパク質分解の分子機構と生理的意義, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸
- ② 鈴木邦律 出芽酵母の選択的オートファジーの分子機構, 第 31 回日本分子生物学会年, 2008 年 12 月 11 日, 神戸

- ③ 鈴木邦律・大隅良典 選択的オートファジーに関わる第二の受容タンパク質, 第60回日本細胞生物学会大会, 2008年7月1日, 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.ohsumilab.ari.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 邦律 (SUZUKI KUNINORI)

東京工業大学・統合研究院・特任助教

研究者番号: 20373194

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし