

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16121

研究課題名（和文）ストレス環境に依存したオートファジーの基質選択機構の解明

研究課題名（英文）The cargo selection mechanism of autophagy under stress conditions.

研究代表者

武田 英吾 (Takeda, Eigo)

東京工業大学・科学技術創成研究院・研究員

研究者番号：20836366

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）：本研究ではラパマイシン処理と窒素源、炭素源、硫黄源飢餓時の細胞からオートファジックボディを単離し、質量分析を用いてオートファジー積荷の解析を行なった。その結果、各条件で著しく積荷の組成が変わることはなかったが、いずれの条件でも高度にオートファジックボディに濃縮される新奇タンパク質Hab1を見出し、Hab1の解析を実施した。結果、Hab1は既知の選択的オートファジーと異なる様式でリボソームを隔離膜にアンカーするオートファジーレセプター様タンパク質であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのオートファジーレセプターは分解対象であるオルガネラなどの積荷に結合し、Atg11を介して隔離膜形成を促進し、Atg8に結合することで積荷に沿った隔離膜の伸長を補助する。一方でHab1は隔離膜上の脂質化されたAtg8に特異的に結合することで選択的なカーゴを持たない隔離膜に積荷を載せる。本研究によるHab1の優先的送達様式の解明は選択的オートファジーの積荷の載せ方の違いに関する具体例を提示した。今後は積荷様式の違いに着目した各選択的オートファジーの分類や理解が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, autophagic bodies were isolated from cells during rapamycin treatment and nitrogen, carbon, and sulfur source starvation, and their autophagic cargoes were analyzed by mass spectrometry. As a result, we found a novel protein, Hab1, which is highly enriched in autophagic bodies under all conditions, although their cargo profiles did not change remarkably under each condition, and we performed an analysis of Hab1. We found that Hab1 is an autophagy receptor-like protein that recruits ribosomes to the isolation membrane in a manner that differs from canonical selective autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 選択的オートファジー 液胞 ストレス応答 プロテオミクス

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは飢餓時などの条件で誘導され、細胞質を隔離膜で包み込み、タンパク質などの細胞質成分を含む小胞を形成し、その小胞を分解区画に送り込む。分解区画に送られた小胞はオートファジックボディと呼ばれ、通常は液胞リパーゼや液胞プロテアーゼにより即座に解体され、その内容物が分解される。飢餓によって誘導されるオートファジーにおいては多くの細胞質成分が非選択的に分解されていることが電子顕微鏡解析から推定されていた。一方である種のオートファジーの積荷は選択的オートファジーの足場タンパク質 Atg11 に依存的な選択的機構で液胞へと輸送されることがわかっていた。また、ある種のタンパク質は特定のストレス条件において分解されにくくなることが報告されていた。しかしながらオートファジーによって分解される積荷がどのようなタンパク質がどのくらい含まれているのか、網羅的かつ詳細な解析はなされていなかった。

2. 研究の目的

オートファジーによって液胞に運ばれている積荷を網羅的に解析することで、オートファジーによってどのような特徴を持つタンパク質が分解されやすいのかを調べる。また、オートファジーによって運ばれる積荷の選別がストレス条件の違いに依存するかを調べる。これらの解析を通してどのような特徴を持つタンパク質が優先的に分解されるのかを調べ、その意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

オートファジーによって運ばれた積荷を網羅的に解析するために、オートファジックボディが単離可能な出芽酵母の実験系を用いた。ラパマイシン処理時、窒素源、硫黄源、炭素源飢餓時の液胞内リパーゼ Atg15 の欠損細胞からオートファジックボディを単離し、それらのプロテオームをその全細胞抽出液と質量分析を用いて比較解析することで、オートファジーの積荷解析を行なった(図1)。

4. 研究成果

各条件の積荷解析の結果、当初の予想に反してストレス条件に依存した積荷の大きな変化は見られなかった。このことはこれらの条件ではオートファジーの積荷選択に大きな違いは無く、およそ同様の様式でオートファジーによる輸送が行われていることを示唆している。一方で、解析した全ての条件のオートファジックボディに極度に濃縮される機能未知タンパク質 Ybr285w を見出し、このタンパク質を Hab1(Highly enriched in Autophagic Body 1)と名付けた(図2)。このタンパク質は他のどのタンパク質よりもオートファジックボディに濃縮される性質を持っているため、積荷の選択を調べる研究に適していることから、本研究ではこのタンパク質がなぜ、どのようにしてオートファジックボディに濃縮されるのかを解析することにした。

まずこのタンパク質に GFP を付加してその細胞内局在を観察したところ、オートファジーの誘導時に発現が誘導され、細胞質においてオートファジー因子依存的に集合したのち、液胞に優先的に運ばれる様子が観察された(図3)。また、各種 Atg 遺伝子の変異体においてその液胞への輸送を調べたところ、多くの選択的オートファジーに必須である Atg11 に依存せず、Atg24 に依存して Hab1 は液胞に送られることがわかった。

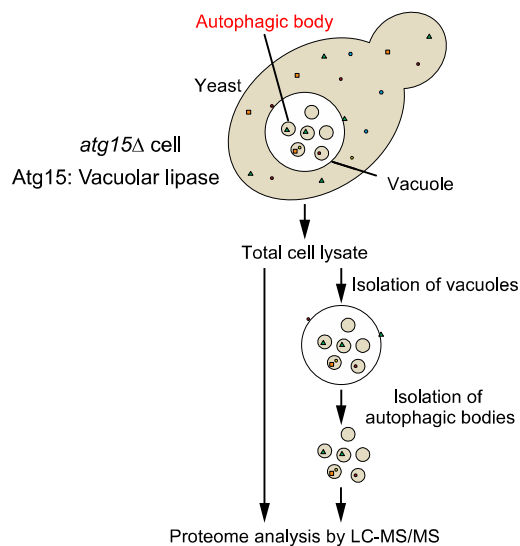


図1: オートファジーの積荷解析

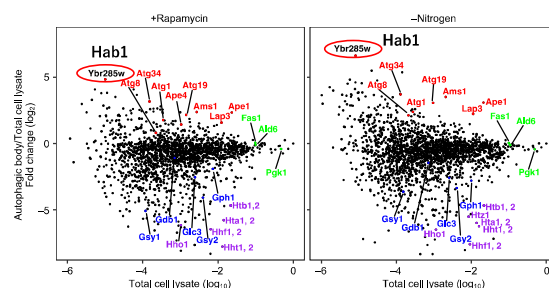


図2: オートファジーの積荷解析結果

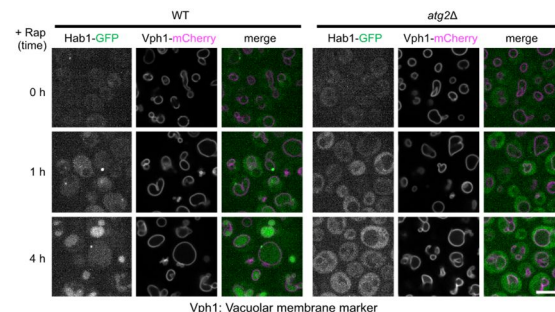


図3: オートファジー誘導時のHab1-GFPの観察

Hab1 はわずか 144 アミノ酸からなる非常に小さなタンパク質であるが、どの部分が優先的に液胞に送られるために必要な領域かを調べた。その結果、N 末端領域の 42 アミノ酸が優先的に液胞に送られるために必要な領域であることがわかった。また、この領域を他のタンパク質に付加したところ、そのタンパク質が優先的に液胞に送られるようになった(図 4)。このことから、この領域は優先的に液胞に送られるために十分であることが明らかとなった。次に N 末端の 42 アミノ酸のみが液胞に送られるために Atg24 が必要なのかを調べたところ、Atg24 に依存せずに液胞に送られた。Atg24 はリボソームなどの細胞内の大きな構造を隔離膜で包み込む際に必要であることが報告されたため、削った C 末端領域に何か大きな構造が結合していることが考えられた。このことから Hab1 の C 末端部分の相互作用解析を免疫沈降と質量分析を用いて実施したところ、リボソームがこの領域に結合していることが示唆された。そこでスクロース密度勾配遠心を用いてリボソームを分画したところ、Hab1 がリボソーム画分に沈降したことから、Hab1 はリボソームと結合することが確認された。

以上の結果から、Hab1 は N 末端で優先的に分解される性質を持ち、C 末端でリボソームに結合する性質を持っているため、Hab1 はオートファジーを介してリボソームを液胞に運ぶ機能を持つことが考えられた。そこで野生型、Hab1 欠損、Hab1 過剰発現細胞、からオートファジックボディを単離し、質量分析を用いて比較したところ、Hab1 欠損細胞ではオートファジックボディ中のリボソームタンパク質が減少し、過剰発現細胞で増加した(図 5)。これらの結果からこのタンパク質はリボソームを液胞に運ぶ機能があるオートファジーレセプター様の機能を持つタンパク質であることが明らかとなった。

次にこのタンパク質がどのように Atg11 非依存的に液胞に優先的に運ばれるのかを調べた。N 末端領域のアミノ酸配列に着目したところ、35-38 領域に AIM(Atg8-family interacting motif)と呼ばれる Atg8 と結合する可能性がある配列を持っていたため、Hab1 と Atg8 の結合を調べた。その結果、驚いたことに Hab1 は脂質化された Atg8 に特異的に結合する性質を持っていた(図 6)。他のオートファジーレセプターに関しても脂質化された Atg8 への結合を調べたところ、この性質は他のレセプタータンパク質に一般的な性質ではないことがわかったことから、この性質は Hab1 が液胞に優先的に輸送されるために重要な性質であることが考えられた。次に、変異体解析によって N 末端に存在する両親媒性ヘリックスも Hab1 の優先的輸送に必須であることがわかったため、このヘリックスを変異させた Hab1 と Atg8 の結合を確認したところ、これらの変異 Hab1 では脂質化された Atg8 に特異的に結合する性質を失っていた。これらの結果から、Hab1 の N 末端に存在する両親媒性ヘリックスと AIM が Hab1 の優先的液胞輸送に必要であることが明らかになった。おそらくこのヘリックスが脂質化された Atg8 の周辺の膜に結合し、AIM が Atg8 に結合することで脂質化された Atg8 にのみに強く結合する性質を持つのではないかと考えている。

脂質化された Atg8 は特定の選択的積荷を持たない隔離膜上にも存在することが知られている。Hab1 とその積荷であるリボソームは積荷を持たない隔離膜に結合することでオートファジーを介して優先的に液胞に送られることが考えられる。既知のオートファジーレセプターは Atg11 に結合し、積荷の周囲に隔離膜を形成する。一方で Hab1 はすでに形成された隔離膜に積荷を運び込む。このことから既存の選択的オートファジーと積荷の積み込み方が異なる様式の選択的オートファジーが多くのオートファジー誘導条件下で機能していることが明らかとなった。

既存の Atg11 依存的な選択的オートファジーは 500 nm に達するオートファゴソームの大きさと同等の大きさのオルガネラなどの積荷を運ぶ。この様なサイズの積荷は拡散により隔離膜に到達するには無理があると考えられる。一方で Hab1 が運ぶリボソームのサイズはおおよそ 30 nm とオートファゴソームと比較して十分に小さく、数も多いため、拡散を介して隔離膜に到達できることが考えられる。この様な積荷の大きさや数の違いが選択的積荷の積み込み様式の違いを決めているのかもしれない。

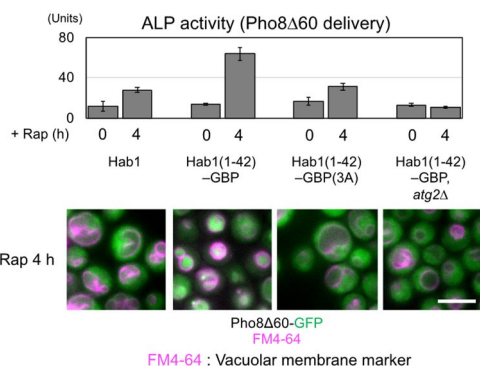


図4: Hab1(1-42)が付加されたタンパク質の液胞輸送活性の評価

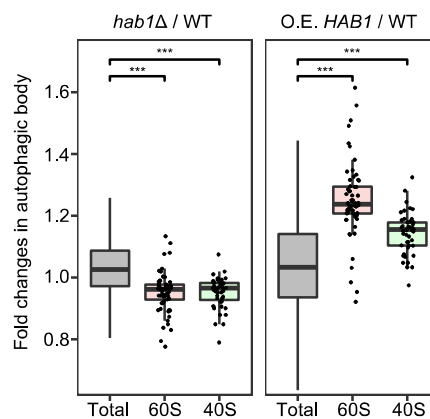


図5: オートファジックボディ中のリボソームタンパク量の解析

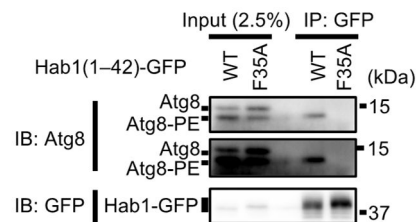


図6: Hab1N末端領域のAtg8との相互作用解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Eigo, Isoda Takahiro, Hosokawa Sachiko, Oikawa Yu, Hotta-Ren Shukun, May Alexander I, Ohsumi Yoshinori	4. 巻 -
2. 論文標題 Receptor-mediated cargo hitchhiking on bulk autophagy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s44318-024-00091-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Isoda Takahiro, Takeda Eigo, Hosokawa Sachiko, Hotta-Ren Shukun, Ohsumi Yoshinori	4. 巻 27
2. 論文標題 Atg45 is an autophagy receptor for glycogen, a non-preferred cargo of bulk autophagy in yeast	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109810～109810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2024.109810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Eigo Takeda, Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Analysis of Hab1, a protein preferentially degraded by autophagy
3. 学会等名 International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田英吾, 大隅良典
2. 発表標題 オートファジーにより高度に優先的に分解されるタンパク質の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田英吾, 大隅良典
2. 発表標題 オートファジーにより高度に優先的に分解されるタンパク質の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森朔良, 武田英吾, 光澤浩, 大隅良典
2. 発表標題 酵母アセチルトランスフェラーゼAtf2のER-phagyによる優先的分解機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田英吾, 磯田隆宏, 大隅良典
2. 発表標題 オートファジーにより優先的に分解される機能未知タンパク質の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田英吾, 森朔良, 磯田隆宏, 大隅良典
2. 発表標題 酵母アセチルトランスフェラーゼAtf2の分解機構の解析
3. 学会等名 オートファジー研究会若手の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田英吾
2. 発表標題 オートファジーにより優先的に分解される新規タンパク質の解析
3. 学会等名 第13回オートファジー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田英吾, 大隅良典
2. 発表標題 バルクオートファジーに便乗する選択的オートファジー
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eigo Takeda
2. 発表標題 Receptor-mediated cargo hitchhiking on bulk autophagy
3. 学会等名 The 5th Sino-Japan Symposium on Autophagy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------