

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22419

研究課題名(和文) タンパク質がオートファジーから逃れる機構：オートファジーエスケープの研究

研究課題名(英文) Proteins escape from autophagic degradation

研究代表者

神吉 智丈 (KANKI, TOMOTAKE)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50398088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内のタンパク質やオルガネラをリソソーム(酵母や植物では液胞)に運び込んで分解する機構である。タンパク質成分は、無作為に分解されていると考えられているが、選択的に分解を免れている細胞成分があるかもしれないと考えられる。本研究では、こうしたオートファジー分解を受けにくい細胞成分があるかどうかについて検証した。

出芽酵母や分裂酵母を用いて、様々なタンパク質にGFPを付加し、その分解を観察した。その結果、オルガネラに局在するタンパク質は、たとえオルガネラ表面で細胞質側に局在しても、多くの細胞質タンパク質よりは分解が遅くな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

オートファジーは細胞質成分を無作為に分解する現象であると考えられていたが、最近の研究から、一部のタンパク質複合体やオルガネラが、選択的に分解されていることが明らかになった。オートファジーは様々なストレスにตอบสนองして誘導される現象であり、そのストレスに耐性をもたらず因子を分解することは非合理的である。このため、こうした因子は、オートファジーによる分解を免れている可能性がある。本研究では、こうした因子の同定を試みたが、タンパク質ごとに分解程度に差があることは見いだせたものの、分解が強く抑制されている因子は同定できなかった。本研究が布石となり、今後解明が進んでいくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a process that degrades proteins and organelles by transporting them into lysosomes (or vacuoles in yeast and plants). Although proteins are thought to be degraded randomly, it is conceivable that some of them are selectively escape from the degradation. In this study, we tested whether there are cellular components that are escape from autophagic degradation. Using budding yeast and fission yeast, we tagged GFP on the C-terminus of various proteins and observed their degradation. Although most of cytosolic proteins were equally degraded, we found that proteins localized to the organelle were degraded more slowly than most of cytosolic proteins, even if they were localized on the cytoplasmic side at the organelle surface.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞質のタンパク質やオルガネラをオートファゴソームと呼ばれる膜構造体に包み込んだのち、内容物をリソソームあるいは液胞内に運んで分解する経路である。形態学的にオートファゴソームは無作為に細胞質成分を取り込んでいるように見えるため、オートファジーは非選択的に細胞質成分を分解すると考えられている。一方で、ミトコンドリアや小胞体、Cvt 複合体などが専用のレセプターを介してオートファジーにより選択的に分解されることが知られている。

従って、細胞内の多くのタンパク質はオートファジーにより非選択的に分解されていると考えられているが、様々なオートファジー誘導条件において、細胞質成分がすべて等しくオートファジーによって分解されることは非合理的である。例えば、様々なストレスで誘導されるオートファジーでは、各ストレスに応答する因子は分解から逃げていたり、糖飢餓によって誘導されるオートファジーでは、脂肪酸や非発酵性炭素源が ATP 産生源となるためその代謝酵素やそれらの転写因子などが分解から逃げていたりすると合理的である。このように特定のタンパク質がオートファジーによる分解を逃れる機構があると推測され、その様な機構が存在すると仮定してオートファジーエスケープと呼ぶこととする (図 1)。

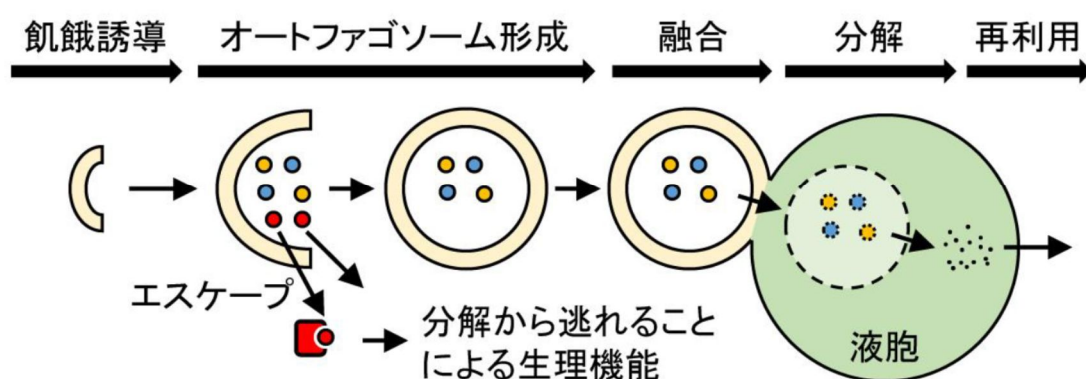


図 1：オートファジーエスケープの概念図。多くのタンパク質はオートファジーに無作為に分解されていると考えられているが、特定のタンパク質は積極的に分解を免れている可能性がある。

2. 研究の目的

オートファジーエスケープという概念を実証し、その分子機構を解明すれば、オートファジー研究に新たな視点と展開をもたらすことができる。本研究では、スクリーニング研究に適したモデル生物である酵母を用いて、この概念の実証と分子機構の解明を行い、さらに哺乳類での研究に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

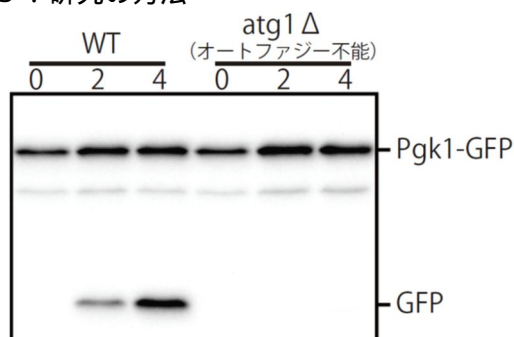


図 2：オートファジーにより Pgk-GFP が液胞に運ばれると GFP 単体が出現する。この GFP 単体を指標にそのタンパク質の分解程度を見積もる。

出芽酵母の遺伝子にコードされているタンパク質に対して、C 末端に GFP タグを付加して発現させる。オートファジーにより GFP 付加タンパク質が液胞に運ばれると、タンパク質は速やかに分解されるが GFP 部分が比較的安定なため、ウエスタン解析で GFP 単体が検

出される(図2にPgk1-GFPの例を示す)。このGFP単体を指標に、様々なタンパク質のC末にGFPタグを付加し、オートファジー誘導後に分解されない(即ちGFP単体が出現しない)タンパク質を選抜する。

上記の方法で、オートファジーによる分解を免れるタンパク質が同定されると、次は、そのメカニズムを解明する。オートファジーエスケープを担う遺伝子が欠損すれば、分解から逃れるはずのタンパク質も分解されてしまう。酵母のノックアウトライブラリーに、上記で同定したタンパク質にGFPタグを付加したものを発現させ、欠損するとオートファジーによる分解が起きてしまう遺伝子を同定する。オートファジーエスケープに関連する因子は、分解を逃れるタンパク質に結合して作用する可能性が高い。分解を逃れるタンパク質をオートファジー誘導時に免疫沈降し、共沈降したタンパク質をLC-MS/MSを用いて同定する。これらの研究により、オートファジーエスケープに関わる因子を同定し、その分子機構を解明する。

4. 研究成果

オートファジー誘導時にオートファジー関連タンパク質(Atgタンパク質)が分解されてしまうとオートファジー誘導が止まってしまうため、Atgタンパク質に対してオートファジーエスケープが働いている可能性があると考え、Atg1からAtg31までの主要なタンパク質について、C末にGFPを付加して検証した。一部のAtgタンパク質は、その発現量の少なさから検証を行えなかったが、Atg1が効率的に分解されているのに対して、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31は、Atg1と比べて分解効率が低下していた。これらの因子は、オートファジー誘導時にAtg1と複合体を作るものであるが、Atg1のみが効率的に分解されており、タンパク質ごとに分解効率に差をもたらす要因があることが示唆された。

次に、種々のタンパク質のC末にGFPを付加し、それらの分解を検証した。細胞質に局在するタンパク質は、分解程度に多少の差はあるものの、極端に分解が抑制されている物は見いだせなかった。一方で、ミトコンドリアや小胞体に局在するタンパク質は、窒素源飢餓で誘導したオートファジーでは、最終的には分解が始まるが、細胞質のタンパク質に比べて、分解開始が極端に遅くなった(細胞質のタンパク質は、概ね1時間以内の窒素源飢餓で分解が始まるが、ミトコンドリアや小胞体では、窒素源飢餓後3時間程度で分解が始まった。)。これは、ミトコンドリアや小胞体の外膜タンパク質でも同様であり、タンパク質がオルガネラ膜で守られていることが分解遅延の原因ではないと考えられた。

ミトコンドリアや小胞体は、選択的オートファジーによって分解されており、選択性に関わるレセプターによってその分解は厳密に制御されている。レセプター破壊株では、オルガネラのオートファジーがほぼ完全に抑制されていることから、オルガネラの分解遅延は、レセプターが機能するのに必要は時間である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Innokentev Aleksei, Kanki Tomotake	4. 巻 17
2. 論文標題 Mitophagy regulation mediated by the Far complex in yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1042 ~ 1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1885184	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 -
1. 著者名 Fukuda Tomoyuki, Kanki Tomotake	4. 巻 17
2. 論文標題 Atg43, a novel autophagy-related protein, serves as a mitophagy receptor to bridge mitochondria with phagophores in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 826 ~ 827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1874662	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 -
1. 著者名 Shiiba Isshin, Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Ito Naoki, Tokuyama Takeshi, Yamashita Shun Ichi, Kanki Tomotake, Komatsu Toru, Urano Yasuteru, Fujikawa Yuuta, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 22
2. 論文標題 MITOL promotes cell survival by degrading Parkin during mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e49097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201949097	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Fukuda Tomoyuki, Sofyantoro Fajar, Tai Yen Teng, Chia Kim Hou, Matsuda Takato, Murase Takaaki, Morozumi Yuichi, Tatebe Hisashi, Kanki Tomotake, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.60969	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Innokentev Aleksei, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Saigusa Tetsu, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e63694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.63694	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fukuda Tomoyuki, Ebi Yuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61245	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Igarashi Ryoko, Yamashita Shun-ichi, Yamashita Tomohiro, Inoue Keiichi, Fukuda Tomoyuki, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Gencitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-020-58315-w	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yoo Seung Min, Yamashita Shun-ichi, Kim Hyunjoo, Na DoHyeong, Lee Haneul, Kim Seo Jin, Cho Dong Hyung, Kanki Tomotake, Jung Yong Keun	4. 巻 34
2. 論文標題 FKBP8 LIRL dependent mitochondrial fragmentation facilitates mitophagy under stress conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2944 ~ 2957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901735R	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Innokentev Aleksei, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2019.01479	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 ミトコンドリアオートファジーの誘導機構
3. 学会等名 J-mit 特別 オンラインシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 ミトコンドリアオートファジーの分子機構
3. 学会等名 第23回植物オルガネラワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能制御学分野
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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
---------	---------