

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21570197

研究課題名（和文） 大規模スクリーニングによるオートファジーと小胞体ファジーの総合的理解

研究課題名（英文） Genome side screening of autophagy to elucidate its regulation

研究代表者

野田 健司（NODA TAKESHI）

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：00290908

研究成果の概要（和文）：

オートファジーは細胞内の大規模な分解系であるが、その制御機構については未知な部分が多い。本研究ではオートファジー活性を定量的に解析することを可能にする ALP 法をゲノムワイドの酵母変異株コレクションに導入することに成功した。窒素源飢餓時にオートファジーの活性を大規模の測定した結果、いくつかの興味深い因子が同定され、それらの分子生物学的機能を解明し、オートファジー制御機構の理解の進展に貢献した。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy is intracellular bulk degradation system, but its regulatory mechanism is largely unknown. In this study, we succeeded in introducing ALP system, which enables quantitation of autophagy activity, into the genome wide yeast mutant collection. We measured autophagic activity under nitrogen starvation in large scale and found that several intriguing factors are directly associated with autophagy regulation. Thus we advanced understanding the mechanism of autophagy regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：タンパク質分解

キーワード：オートファジー 酵母 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

生命の存在は蛋白質の合成と分解のバランスのうえに成立する。過去には合成の研究に比して理解が遅れてきた蛋白質分解の研究であるが、しかしここに来てその研究は急激な展開がみられている。その代表的な例がユビキチンプロテアソーム系による分解であり、そこには各種の分解基質に対する実に多

様な制御機構が存在することがつぎつぎと明らかにされている。それと並び細胞内分解で中心的な役割を担っているのがオートファジー系である。オートファジーは細胞質中にオートファゴソームという膜構造を新規に生成することで分解基質を囲い込み、リソソームへ輸送し分解する現象であり、その基本は細胞質を非選択的に分解する現象である。環境の栄養状態をはじめ、さまざまな内

外の刺激に応答してオートファジーの活性は変化する。特に過剰なオートファジーは細胞死を招きうるため、オートファジーもまた、どの程度分解すべきかという量的な調節において、厳密な制御下にあることは間違いないであろう。例えば神経細胞では、飢餓で誘導される高いオートファジー活性の他に、誘導非依存の低レベルのオートファジーが存在し、その破綻が神経変性疾患を惹起するが、しかしどのような機構でその活性が制御されているかという点に関して、本質的な理解はまだ得られていないというのが実情である。オートファジーの調節機構の理解は、その関連疾病の克服へ向けて必須の課題だといえる

2. 研究の目的

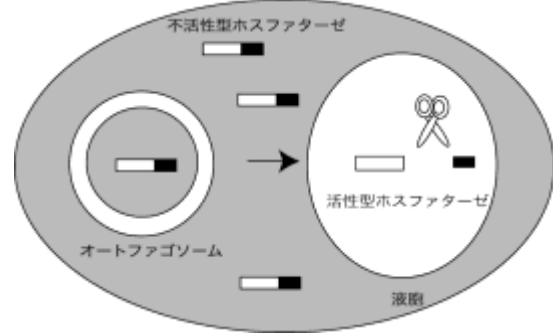
本研究では Atg とは異なり、その欠損がオートファジー活性を部分的に阻害するまたは昂進するような**補助制御因子**まで含めた同定を目指す。これはオートファジーがそれ自身完全に独立した事象ではなく、多様な細胞機能と様々なレベルで互いに関連していることを予期し、そのネットワークを明らかにすることを目指すものである。酵母全非必須遺伝子破壊株コレクションを対象にスクリーニングし、オートファジー活性に影響を与える因子を網羅的に同定しクラスター解析をすることで、オートファジーに影響を与える細胞事象・経路を解明する。

本研究の核となる手法は申請者が開発したオートファジーのアッセイ法である **ALP アッセイ**である。この方法はオートファジーの活性を定量的に計測のできるほぼ唯一の方法であり、これまで酵母オートファジーの研究の進展に寄与してきた。本来液胞に局在するアルカリ性ホスファターゼの前駆体を細胞質基質中に人為的に発現させると、オートファジーに伴い液胞へ送られることによりプロセッシングされ活性化するため、この酵素活性総量がオートファジーによる輸送量を反映することになる。

3. 研究の方法

(1)ハイスループット ALP アッセイ法の確立

これまで応募者が開発した ALP アッセイ法は、個別の細胞株を液体培養し、その細胞破砕液中の酵素活性を計ることでオートファジーの活性を計るものであったが、本計画では 96 穴マイクロプレートを用いた ALP アッセイ法を確立することにより、スクリーニン

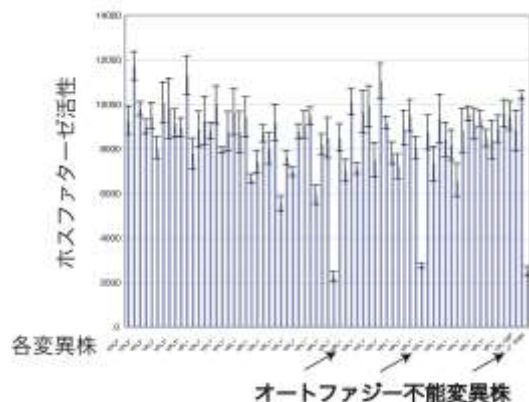


グのハイスループット化を目指す。既に予備実験により、細胞破砕条件の検討、アッセイ条件の検討を行い良好な結果を得ており、さらにこの条件の最適化を行う。

(2)マクロオートファジースクリーニング用酵母遺伝子破壊株コレクションの作製

ALP アッセイを行うためには、改変 ALP 遺伝子をテストする株のゲノムへ挿入する必要がある。本研究ではトロント大学の Charlie Boone 等により開発された Synthetic Genetic Array 法(SGA 法)を応用し、遺伝子マーカー選択培地を含む寒天プレート上に順次レプリカプレートをするという方法を用い、システムティックに酵母全遺伝子破壊株コレクションへと改変 ALP 遺伝子を挿入することを計画する。既にスモールスケールのパイロット実験において、良好な株作製成績を得ている。上図のようにこの方法で作成した既知のオートファジー不能変異株が有意にホスファターゼ活性の低下を示すことを確認した。

4. 研究成果



この ALP アッセイに必要なマーカーを約 5000 種の変異株からなる酵母非必須遺伝子破壊株コレクションに導入し、それぞれ個別の変異株のオートファジー能を測定し、それをその値の順にリスト化した。その結果、既知のオートファジーに必須の ATG 遺伝子群

はほぼ全てが全約 5000 株中、上位 50 位までにランクされた。このことはオートファジーの制御に正に関わる因子の候補を多数得たことを意味する。中でも **NPR2** と **NPR3** という遺伝子の欠損株は、オートファジーの誘導に強い欠損を示すことを見いだした。その後の解析の結果、**NPR2** と **NPR3** はオートファジー制御に中心的な役割を果たす **Tor** キナーゼの活性を制御すること、さらにその実際の分子機構を示唆する実験結果を得ることができた。(論文投稿準備中)

その他、必須遺伝子の発現低下株約 1000 種に同様のスクリーニングを施し、その中から **TRAPPIII** と呼ばれるタンパク質複合体が著明なオートファジー能の低下をもたらしていることに注目した。解析の結果 **TRAPPIII** が膜輸送で働く機能を持つ因子であることを発見し、それがオートファジーに必須な膜遺伝子 **Atg9** の動態を制御していくことを発見した。このことは通常の膜輸送経路が積極的にオートファジーに働くことの分子の実態を初めて明らかにしたものである。(論文投稿中)

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 11 件)

1. Taguwa, S., Kambara, H., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., Koike, K., Moriishi, K., Matsuura, Y.* (2011). Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol*, <http://jvi.asm.org/content/early/2011/10/12/JVI.06099-11.long>. 査読有り
2. Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J. L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T.*, Yoshimori, T.* (2011). The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Mol Biol Cell*, *22*, 2290-2300. 査読有り
3. Noda, T.*, Matsunaga, K. & Yoshimori, T.* (2011). Atg14L recruits PtdIns 3-kinase to the ER for autophagosome formation. *Autophagy*, *7*, 438-439. 査読有り
4. Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T.* & Rubinsztein, D. C.* (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol*, *7*, 9-17. 査読有り
5. Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N. T., Yoshimori, T., Noda, T.* (2010). Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic*, *11*, 468-478. 査読有り
6. Tabata, K., Matsunaga, K., Sakane, A., Sasaki, T., Noda, T., Yoshimori, T.* (2010). Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol Biol Cell*, *21*, 4162-4172. 査読有り
7. Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., Noda, T.*, Yoshimori, T.* (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol*, *190*, 511-521. 査読有り
8. Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., Amano, A.* (2010). Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vtilb mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol Biol Cell*, *21*, 1001-1010. 査読有り
9. Noda, T. & Yoshimori, T.* (2010). Between canonical and antibacterial autophagy: Rab7 is required for GAS-containing autophagosome-like vacuole formation. *Autophagy*, *6*, 419-420. 査読有り
10. Noda, T.*, Matsunaga, K., Taguchi-Atarashi, N. & Yoshimori, T.* (2010). Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics. *Semin Cell Dev Biol*, *21*, 671-676. 査読有り

11. Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. & Yamamoto, A.* (2010). Electron tomography reveals the endoplasmic reticulum as a membrane source for autophagosome formation. *Autophagy*, 6, 301-303. 査読有り
- [学会発表] (計 10 件)
1. 野田健司 「酵母研究が切り開く細胞内自己分解のありかた」 大阪大学寄附講座酵母リソース工学開設式記念講演会 2011年11月25日吹田
 2. Noda, T., Taguchi-Atarashi, N., Yoshimori, T., "Critical role of PtdIns3P turn over in autophagy regulation" International Symposium New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, 2011年11月15日博多
 3. 野田健司 「オートファジーによるサルモネラ増殖抑制機構」第2回加藤記念研究助成成果報告交流会 2011年11月7日町田
 4. Noda, T., "How is TRAPP3 involved in the yeast autophagy?" The 2nd Japan-Sino Autophagy Conference, 2011年10月15日葉山
 5. Noda, T., "How is the Membrane Biogenesis Regulated in Autophagy?" 日本生化学会日本分子生物学会合同年会シンポジウム Recent Trends in Membrane Traffic 2010年12月9日、神戸
 6. Noda, T., "Elucidation of autophagy regulation mechanism through comprehensive yeast mutant screening" The 1st Shino-Japan autophagy conference, 2010年10月6日, Xi'an, China
 7. Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis N. T., Izumi, T., Noda, T., Yoshimori, T. "Autophagy requires endoplasmic reticulum-targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L" EMBO Conference, Towards a comprehensive understanding of endoplasmic reticulum functions, 2010年10月4日, Girona, Spain
 8. 野田健司 「オートファジーの膜動態制御機構」大阪大学蛋白質研究所セミナー

疾患と膜動態の蛋白質科学 2010年9月18日吹田

9. Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Akira S., Imamoto, F., Noda, T., Yoshimori, T., "Recruitment of LC3 is separable from the membrane generation system in autophagy against *Salmonella*." The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Poster pick up), 2010年9月9日 淡路島
10. 野田健司 「PI3Pによるオートファジーの制御機構」第10回日本蛋白質科学会年会ワークショップ オートファジーの構造と機能 2010年6月16日札幌

[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

野田 健司 (NODA TAKESHI)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：00290908