

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06152

研究課題名（和文）オートファゴソーム形成過程における小胞体との分子機構の解明

研究課題名（英文）Mechanistic insight of autophagosome formation in relation with ER

研究代表者

濱崎 万穂（Hamasaki, Maho）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：30455216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、最新のイメージング法、プロテオミクス、生化学を駆使してAP膜形成の初期過程の形成機構の解明を目指してきた。小胞体膜輸送経路のプロテオミクスで取れてきた候補因子の解析が進み、普段細胞質に存在する最上流オートファジー関連因子がどのようにオートファゴソーム形成場に運ばれるのかを解明、論文投稿しminor revision中である。次に、オートファゴソーム膜形成初期の形成場の詳細解析を行っており、VPS34KO細胞にて、CLEM法を用いた結果、初期形成構造体に関して新規知見が得られた。小胞体・ミトコンドリア接触部位のプロテオミクスによる候補因子に関し結果が強くでている3つに候補を絞れた。

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内大規模分解システムとして発見され、今では様々な疾患と関わることがわかってきた。オートファジーの分子機構の研究は、今後明らかになっている疾患治療に繋げるためには不可欠である。基礎研究の成果は長期間かかるが必ず将来に生かされる情報である。本研究で明らかにしたオートファジー誘導時の初期機構を明らかにできたことは、オートファジーの亢進や抑制の制御機構にも繋がらう内容で、将来的に疾患の治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have elucidated the mechanism of the early steps of autophagosome formation mechanism using state-of-the-art imaging methods, proteomics, and biochemistry. Proteomics of the endoplasmic the secretory pathway has led to the analysis of candidate factors, and we have elucidated how the upstream autophagy-related proteins, which normally reside in the cytoplasm, are translocated to the autophagosome formation site. Next, we analyzed in detail the formation site of the early step of autophagosome membrane formation, and have obtained new findings on the early forming structures in VPS34KO cells using the CLEM method. Also, we narrowed down the candidate factors to three that had strong results in the proteomics of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites.

研究分野：細胞生物

キーワード：オートファジー 分解 小胞体 小胞体ミトコンドリア接触部位

1. 研究開始当初の背景

細胞内大規模分解系であるオートファジーは、発生、癌、神経変性疾患や感染症の抑制など様々な疾患に関与することが明らかになってきた。オートファジー誘導時に形成される膜オルガネラ、オートファゴソーム、が形成されるが、新規に合成される膜の起源は長年来論争の的となっている。必要時に突如できるオートファゴソームの膜形成機構は細胞生物学的にも非常に興味深く、小胞体やミトコンドリア等のオルガネラの関与が明らかとなってきたことで、多面的なアプローチで解析が進められる状況となった。

2. 研究の目的

オートファジーは、飢餓時のエネルギー源確保による生存維持や細胞内浄化による発がん、神経変性疾患、炎症性疾患、感染症、生活習慣病等の疾患発症の抑制など多岐に亘る重要な役割を担い、近年大きく注目を集めている細胞内大規模分解系である。オートファジーが誘導されると、細胞質で膜オルガネラであるオートファゴソーム (AP) が新規に形成される。APは、細胞内のオルガネラであるにも関わらず他のオルガネラと異なり既存で存在しない。我々は、細胞生物学の大きな謎であったAP膜の形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位であると同定した (*Nature* 2013)。AP膜形成は複雑でダイナミックな過程であるが、最も重要な形成初期の実態がこれで明らかになることが期待される。なぜ、小胞体・ミトコンドリア接触部位で形成されるのか、小胞体との関係は我々だけではなく世界中でも報告があるためどのように形成に関わるのか、詳細を明らかにしたい。本研究では、最新のイメージング法、プロテオミクス、生化学を駆使してAP膜形成の初期過程の形成機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(A) **小胞体からの輸送経路とオートファジー形成の関係の解明** 近年EMBLのPeppe rkokグループがゲノムワイドRNA i スクリーニングにより小胞輸送に関わる因子の探索を行い1200近くの因子を同定した (*NCB*, 2013)。共同研究により、同定された因子らのAP膜形成への影響を観察し、候補因子であるZDHC13の解析を同定、解析をすすめる。細胞生物学的、生化学的アプローチに加えイメージングにてZDHC13のオートファジーにおける役割と作用機序の解明を行う。

(B) **AP膜形成初期過程の解明～PI3キナーゼ複合体からのアプローチ～** オートファジー誘導時に、オートファジー関連因子の最上流で働くULK複合体がAP膜形成場へ局在した後、PI3キナーゼ複合体も小胞体・ミトコンドリア接触場に局在する。Atg14はPI3キナーゼ複合体に含まれ、小胞体パターンを示すことを報告している。PI3キナーゼの局在は、小胞体には含まれない脂質PI3Pが産生され蓄積していきAP膜の形成が行われると考えられている。小胞体にはない組成の脂質がつくられることで小胞体膜に曲率等なんらかの影響を与えると推測される。実際にAP膜の形成場ではPI3Pが産生されそこでAP膜が形成されるのが観察できる。そこで、既に報告されているPI3キナーゼ (Vps34) の構造情報を基にキナーゼ活性ドメインに変異をいれることでPI3産生量を変化させ、AP膜の形成への影響や小胞体膜がどのような変化を示すか最新CLEM法 (光学顕微鏡で同定した場を電子顕微鏡で観察する方法) を用いて観察し、オートファゴソーム膜初期形成過程の経時的変化を観察しどのように形成されるのか明らかにしたい。

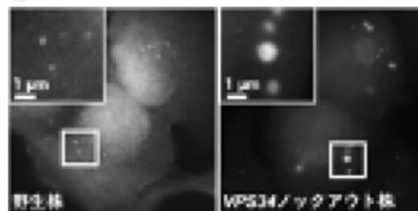
(C) **小胞体・ミトコンドリア接触部位のプロテオミクスによるAP膜に関与する新たな関連因子の同定及び機能解析** 小胞体・ミトコンドリア接触部位は密度勾配遠心法で単離することが可能で、清華大学のLi Yu教授らの協力のもと分画のmass解析を行った。比較した条件は、栄養富条件 vs 飢餓、野生株 vs AP形成変異細胞である。1次スクリーニングで数個に候補を絞り、AP膜形成のどの段階に影響を及ぼすのか、序列の決まっているAtgらの局在で調べ明らかにする。それらの結果を踏まえ、AP膜形成がなぜ小胞体・ミトコンドリア接触部位で行われるのか

の問いに答えたい。Atg因子らだけではAP膜形成過程が明らかにならないので、他の関与因子の同定が形成機構を解く鍵になる可能性が高い。

4. 研究成果

(A)小胞体からの輸送経路とオートファジー形成の関係の解明 ZDHHC13をノックダウンすると、オートファジー能に抑制がみられた。LC3-IIは形成されるため、コンジュゲーション系に関わるものではない。ZDHHC13は酵素活性をもち、たんぱく質の脂質修飾を行う。普段細胞質に局在する最上流因子であるULK複合体がどのようにオートファゴソーム膜形成場に運ばれるのか謎だったが、そこへのZDHHC13の関与が示唆された。ZDHHC13ノックダウンを行うと、飢餓時のULK複合体の局在に影響を及ぼした。さらに、ZDHHC13はULK複合体と飢餓時に一部の共局在がみられ、脂質修飾もみられ、ULK1の構造データより脂質修飾に必要なシステインに変異をいれるとオートファジー能が落ちることが観察できた。これまで明らかになっていなかった、オートファジー誘導時にULK1がどのようにオートファゴソーム形成場に局在できるのかを明らかにできた。Minor revision後投稿し判断を待っている状態である。

(B)AP膜形成初期過程の解明~PI3キナーゼ複合体からのアプローチ~ Vps34のノックアウト細胞を作成し、その細胞を飢餓状態にしたところ、オートファゴソームよりはるかに大きなLC3IIのシグナルを確認した。その状態にVPS34を一過的に入れ戻すとその構造体はなくなり、通常のオートファゴソームの形成が見られた。このシグナルのつよい箇所をCLEMで観察した結果、多数のvesiclesの集合体とその外に膜構造が確認されたものがあり、オートファゴソームの初期構造体に迫るものではないかと考えている。今後の解析でオートファゴソーム膜形成過程の詳細を明らかにする足がかりを見つけた。



(C)小胞体・ミトコンドリア接触部位のプロテオミクスによるAP膜に関する新たな関連因子の同定及び機能解析 小胞体・ミトコンドリア接触部位を単離しプロテオミクス解析から得られた結果をもとに、オートファジー能をみる tfLC3 アッセイを用い1次スクリーニングを行い、10近くまで候補を絞った。その中にはオートファジーを抑制するものと亢進するものもみつけた。多くのオートファジーが関与する疾患はオートファジー能亢進が症状緩和に繋がるため、創薬の新たなターゲットになりうる可能性がある。候補因子の中には小胞体に関連する因子もあり、小胞体・ミトコンドリア接触部位がオートファゴソーム膜形成に重要なのか明らかにするツールとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tabata K, Saeki M, Yoshimori T, Hamasaki M	4. 巻 4(2)
2. 論文標題 Monitoring and assessment of lysosomal membrane damage in cultured cells using the high-content imager	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Star Protocol	6. 最初と最後の頁 102236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102236	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 Irene Pazos, Marta, Laura Betancur, Jorge Cordero, Nereida Jim, Marc Abella, Altair C Hern, Ana G Duran, Emi Adachi-Fern, Carla Belmonte-Mateos, Susana Sabido-Bozo, Akiko Nezu, Baldomero Oliva, Julien Colombelli, Todd R Graham, Tamotsu Yoshimori, Manuel Munis, Maho Hamasaki, Oriol Gallego	4. 巻 24(5)
2. 論文標題 The P4-ATPase Drs2 interacts with and stabilizes the multisubunit tethering complex TRAPP111 in yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO report	6. 最初と最後の頁 e56134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202256134	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 Keisuke Tabata, Marika Saeki, Tamotsu Yoshimori, Maho Hamasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 How cells recognize and remove the perforated lysosome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2022.2138686	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 Jose Norberto S Vargas, Maho Hamasaki, Tsuyoshi Kawabata, Richard J Youle, Tamotsu Yoshimori	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Review Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 167-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41580-022-00542-2	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 Hirofumi Teranishi, Keisuke Tabata, Marika Saeki, Tetsuo Uemoto, Tomohisa Hatta, Takanobu Otomo, Kentaro Yamamoto, Toru Natsume, Tamotsu Yoshimori, Maho Hamasaki	4. 巻 40(11)
2. 論文標題 Identification of CUL4A-DDB1-WDFY1 as an E3 ubiquitin ligase complex involved in initiation of lysophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111349	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 Toshiharu Fujita, Sayaka Kubo, Tatsuya Shioda, Ayaka Tokumura, Satoshi Minami, Megumi Tsuchiya, Yoshitaka Isaka, Hidesato Ogawa, Maho Hamasaki, Li Yu, Tamotsu Yoshimori, Shuhei Nakamura	4. 巻 134(6)
2. 論文標題 THOC4 regulates energy homeostasis by stabilizing TFEB mRNA during prolonged starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Sci	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) 10.1242/jcs.248203	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 Tadashi Yamamuro, Shuhei Nakamura, Takafumi Matsumura, Kiyonori Kobayashi, Hideto Mori, Yusuke Enokidani, Gota Yoshida, Hitomi Imoto, Tsuyoshi Kawabata, Maho Hamasaki, Akiko Kuma, Sohei Kuribayashi, Kentaro Takezawa, Yuki Okada, Manabu Ozawa, Shinichiro Fukuhara, Takashi Shinohara, Masahito Ikawa, Tamotsu Yoshimori	4. 巻 17(8)
2. 論文標題 Rubicon prevents autophagic degradation of GATA4 to promote Sertoli cell function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genet	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) 10.1371/journal.pgen.1009688	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 Gota Yoshida, Tsuyoshi Kawabata, Hyota Takamatsu, Shotaro Saita, Shuhei Nakamura, Keizo Nishikawa, Mari Fujiwara, Yusuke Enokidani, Tadashi Yamamuro, Keisuke Tabata, Maho Hamasaki, Masaru Ishii, ORCID Icon, Atsushi Kumanogoh & Tamotsu Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.2017587	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 Tadashi Yamamuro, Shuhei Nakamura, Kyosuke Yanagawa, Ayaka Tokumura, Tsuyoshi Kawabata, Atsunori Fukuhara, Hirofumi Teranishi, Maho Hamasaki, Iichiro Shimomura & Tamotsu Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of RUBCN/rubicon in adipocytes mediates the upregulation of autophagy to promote the fasting response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2022.2047341	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

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 濱崎万穂
2. 発表標題 オートファジーはLAMP2を介し損傷リソソームの除去を行う
3. 学会等名 日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maho Hamasaki
2. 発表標題 Palmitoylation of ULK1 by ZDHHC13 is required for the initiation of autophagy
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maho Hamasaki
2. 発表標題 Palmitoylation of ULK1 by ZDHHC13 is required for the initiation of 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 Maho Hamasaki
2. 発表標題 Identification of E3 ligase functions in recognizing damaged lysosomes cleared by autophagy
3. 学会等名 Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maho Hamasaki
2. 発表標題 Clearance of damaged organelle by autophagy
3. 学会等名 IUPAB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maho Hamasaki
2. 発表標題 小胞体-ミトコンドリア接触部位におけるオートファゴソーム形成
3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------