

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29年6月12日現在

機関番号：12608
研究種目：特別推進研究
研究期間：2011～2015
課題番号：23000015
研究課題名（和文） オートファジーの分子機構の解明と細胞生理学への統合
研究課題名（英文）
Autophagy: Molecular mechanism and its integration into cell physiology
研究代表者
大隅 良典 (OHSUMI, Yoshinori)
東京工業大学・科学技術創成研究院・荣誉教授
研究者番号：30114416
交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：426,900,000円

研究成果の概要（和文）：

オートファジーの分子機構に関し、18個の必須 Atg タンパク質の細胞内局在、PAS 形成の詳細が明らかになった。耐熱性酵母も駆使して Atg タンパク質とその複合体の構造解析が進んだ。第2の生理学的解析に関しては、オートファジーの分解基質の選択性の制御に関わるレセプターを同定し、そのリン酸化による制御、およびキナーゼを明らかにした。多量の RNA がオートファジーにより分解されることを示し、その詳細な機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Using molecular biology techniques, we clarified the intracellular localization of the 18 core Atg proteins, as well as the mechanistic basis of PAS formation. We also employed the heat-tolerant yeast *K. marxianus* in rapidly progressing structural studies of the Atg proteins. As part of our physiological analysis of autophagy, we identified novel receptor proteins that facilitate selective forms of autophagy, and identified the phosphorylation events and upstream kinases that regulate this process. In addition, we demonstrated the bulk turnover of RNA by autophagy and uncovered its underlying mechanism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：

(1) オートファジー (2) ATG (3) タンパク質分解 (4) 酵母 (5) 細胞制御

1. 研究開始当初の背景

これまで長年我々の研究が世界をリードして来た。我々は初めて酵母におけるオートファジーを発見して以来、116報の論文と15の総説を表して来たが、それらの引用は年々増加の一途を辿っている。オートファゴソーム形成は膜の新規合成と言う未知の過程であり、多数の因子が時間的・空間的に組織化されて作動する系であるため、多面的な解析が必要で、以下のようにようやく本質に迫ることができる時期を迎えた。Atg タンパク質の細胞内における動態の解析が進み、膜形成過程を可視化することが可能となった。各 Atg タン

パク質の機能解析と精製が進み、*in vitro* 再構成系が有用な情報を与えている。これまで高等動物系を含めて困難であった膜形成中間体を同定し、それらの精製条件が確立しつつあり、生化学的な解析が可能となった。Atg タンパク質とそれらの複合体の立体構造が解かれ、機能の理解のために構造情報を基盤におくことが可能となった。Atg の基本因子は酵母からヒトまでよく保存されていることから、単に酵母のオートファジーの理解に留まらず、高等動物のオートファジー研究に多大な貢献をする。

2. 研究の目的

細胞の活動は、絶え間ないタンパク質の合成と分解によって支えられており、細胞は極めて巧妙なりサイクルシステムを構成している。オートファジーは分解コンパートメントで起こる細胞内の自己構成成分の分解の主要な経路である。酵母ATG 遺伝子の同定を契機として、高等生物におけるオートファジーの生理的な役割に関する研究は大変な勢いで進展し、様々な高次機能にかかわっていることが続々と報告されている。本研究は過去22年に亘って進めて来た研究の集大成として、オートファジーに関わる膜動態、オートファゴソーム膜の由来などの謎を解明する。さらにオートファジーの生理的な意義を系統的な解析によって明らかにすることを旨として以下の2つの課題を遂行する。

- I. オートファゴソーム形成に関わる膜動態の分子機構の全容の解明を図る。
- II. オートファジーを真核細胞のもつ基本的な機能として代謝系と関連づけ、増殖・分化の過程に統合する。

3. 研究の方法

課題 I

1. 全 Atg タンパク質の細胞内存在様式の可視化し、細胞内での複合体形成、PAS 形成機構を明らかにする
2. 各 Atg タンパク質を精製し相互作用に必要な機能ドメインの解析、立体構造を決定する。
3. 隔離膜を可視化し、Atg タンパク質の空間配置を決定する。Atg1-Atg13 と Atg17-Atg29-Atg31 を結合した5者複合体の機能、及びその構造解析を行う。

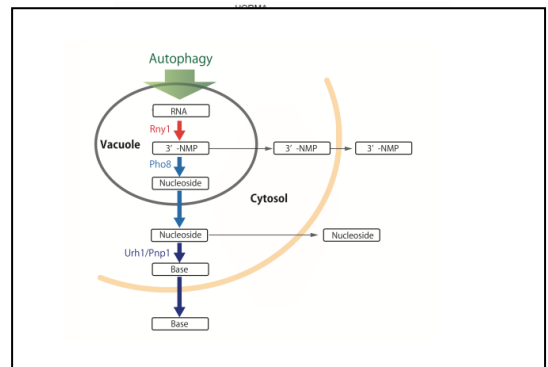
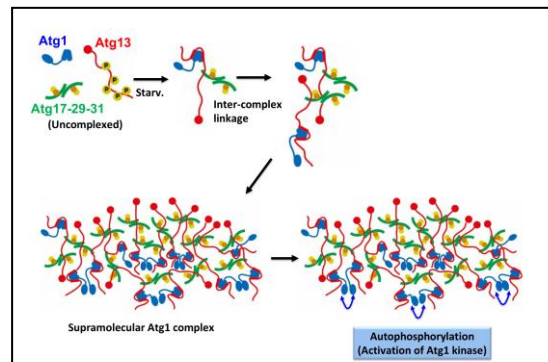
課題 II

1. 様々な炭素源、窒素源などの培養条件における、各増殖相におけるオートファジー活性を網羅的に解析する。
 2. オートファジーが誘導される細胞の状態、分解がもたらす細胞機能の摂動を、代謝分子の網羅的な解析から理解する。
 3. Diauxic shift におけるオートファジー誘導の役割を明らかにする。
 4. Atg タンパク質のリン酸化状態を網羅的に解析し、関与するキナーゼを同定し、オートファジーの制御機構を明らかにする。
 5. オルガネラの形成、分解、様々な様式のオートファジーの役割を明らかにする。
- 以上の解析を通じてオートファジーを細胞増殖過程に位置づける。

4. 研究成果

主な成果は以下の通りである。1. オートファジー誘導の初期過程、Atg1 複合体形成の詳細を明らかにした。その過程で中心的な役割を担う Atg13 の C-末の天然変性領域内に Atg1、2つの Atg17 の結合領域を同定した。複合体の結晶構造解析からその結合が、Tor キナーゼによるリン酸化のによって制御され

ることを明らかにした。また2つの Atg17 結合部位は、5者からなる Atg1 複合体をさらに PAS に高次集積させ、膜形成に必須であることを明らかにした。N-末の HORMA ドメインが Atg9 と結合能を有し、Atg9 小胞を呼び込むことを明らかにした。2. オートファジーに必要なユビキチン様反応産物 Atg12-Atg5 が Atg8 の脂質化反応に関わる Atg3 の構造変化を誘導することにより促進する機構を明らかにした。3. 高温耐性酵母、*K. marxianus* の Atg タンパク質を同定し、*S. cerevisiae* との相補性を解析し、構造解析などにおける優位性の分子基盤を明らかにした。4. オートファジーによって大量の RNA が液胞内で分解されることを明らかにし、その過程に関わる酵素群を同定した。この分解で生じる塩基の大半が細胞外に放出されることを見いだした。5. 選択的オートファジーに関して、マイトファジーにおける Atg32 の制御、各種レセプターの Hrr25 などのキナーゼによる制御を明らかにした。6. タンパク質分解基質の網羅的解析手法の新規性の高い手法を確立しつつある。



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 37 件)

1. Suzuki SW, Onodera J, and Ohsumi Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS ONE*, 6, e17412 (2011)
2. Suzuki K, Morimoto M, Kondo C, and Ohsumi Y. Selective autophagy regulates

- insertional mutagenesis by the Ty1 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell*, 21, 358-365 (2011)
3. Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, and Inagaki F. Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Mol. Cell*, 44, 462-475, (2011)
 4. Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, and Ohsumi Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8, 177-186 (2012)
 5. Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y, and Okamoto K. Autophagy-related protein 32 as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J. Biol. Chem.*, 287, 10631-10638 (2012)
 6. Noda NN, Kobayashi T, Adachi W, Fujioka Y, Ohsumi Y, and Inagaki F. Structure of the novel C-terminal domain of vacuolar protein sorting 30/autophagy-related protein 6 and its specific role in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 287, 16256-16266 (2012)
 7. Yamaguchi M, Noda NN, Yamamoto H, Shima T, Kumeta H, Kobasigawa Y, Akada R, Ohsumi Y, and Inagaki F. Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure*, 20, 1244-1254 (2012)
 8. Kobayashi T, Suzuki K, and Ohsumi Y. Autophagosome formation can be achieved in the absence of Atg18 by expressing engineered PAS-targeted Atg2. *FEBS Lett.*, 586, 2473-2478 (2012)
 9. Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakura C, Ichikawa R, Kinjo M, and Ohsumi Y. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.*, 198, 219-233. (2012)
 10. Nakatogawa H, Ohbayashi S, Sakoh-Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, Kondo-Kakuta C, Noda NN, Yamamoto H, and Ohsumi Y. The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J. Biol. Chem.*, 287, 28503-28507 (2012)
 11. Watanabe Y, Kobayashi T, Yamamoto H, Hoshida H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, and Noda NN. Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18. *J. Biol. Chem.*, 287, 31681-31690 (2012)
 12. Kakuta S, Yamamoto H, Negishi L, Kondo-Kakuta C, Hayasi N, and Ohsumi Y. Atg9 vesicles recruit vesicle-tethering proteins, Trs85 and Ypt1, to the autophagosome formation site. *J. Biol. Chem.*, 287, 44261-44269 (2012)
 13. Yamaguchi M, Matoba K, Sawada R, Fujioka Y, Nakatogawa H, Yamamoto H, Kobashigawa Y, Hoshida H, Akada R, Ohsumi Y, Noda NN, and Inagaki F. Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, doi: 10.1038/nsmb.2451 (2012)
 14. Noda NN, Fujioka Y, Hanada T, Ohsumi Y, and Inagaki F. Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation recognition. *EMBO rep.*, 14, 206-211 (2013)
 15. Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, Inagaki F, Nakatogawa H, and Ohsumi Y. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 433-439 (2013)
 16. Suzuki K, Akioka M, Kondo-Kakuta C, Yamamoto H, and Ohsumi Y. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 1, 2534-44 (2013)
 17. Tsuganezawa K, Shinohara Y, Ogawa N, Tsuboi S, Okada N, Mori M, Yokoyama S, Noda NN, Inagaki F, Ohsumi Y, and Tanaka A. Two-Colored Fluorescence Correlation Spectroscopy Screening for LC3-P62 Interaction Inhibitors. *J. Biomol. Screen.*, 18, 1103-1109 (2013)
 18. Araki Y, Ku WC, Akioka M, May AI, Hayashi Y, Arisaka F, Ishihama Y, and Ohsumi Y. Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.*, 203, 299-313 (2013)
 19. Shibata M, Oikawa K, Yoshimoto K, Kondo M, Mano S, Yamada K, Hayashi M, Sakamoto W, Ohsumi Y, and Nishimura M. Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25, 4967-4983 (2013)
 20. Yoshimoto K, Shibata M, Kondo M, Oikawa K, Sato M, Toyooka K, Shirasu K, Nishimura M, and Ohsumi Y. Organ-specific quality control of plant peroxisomes is mediated by autophagy. *J. Cell Sci.*, 127, 1161-1168 (2014)
 21. Cheng J, Fujita A, Yamamoto H, Tatematsu T,

- Kakuta S, Obara K, Ohsumi Y, and Fujimoto T. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat. Commun.*, 5, 3207 (2014)
22. Suzuki K, Nakamura S, Morimoto M, Fujii K, Noda NN, Inagaki F, and Ohsumi Y. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 9, e91651(2014)
 23. Fujioka Y, Suzuki SW, Yamamoto H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Akada R, Inagaki F, Ohsumi Y, Noda NN. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513-21 (2014)
 24. Tanaka C, Tan LJ, Mochida K, Kirisako H, Koizumi M, Asai E, Sakoh-Nakatogawa M, Ohsumi Y, and Nakatogawa H. Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J. Cell Biol.*, 207, 91-105 (2014)
 25. Mochida K, Ohsumi Y, and Nakatogawa H. Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of α -mannosidase under nitrogen starvation conditions. *FEBS Lett.*, 588, 3862-3869 (2014)
 26. Huang H, Kawamata T, Horie T, Tsugawa H, Nakayama Y, Ohsumi Y, and Fukusaki, E. Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J.*, 34, 154-168 (2015)
 27. Sakoh-Nakatogawa M, Kirisako H, Nakatogawa H, and Ohsumi Y. Localization of Atg3 to autophagy-related membranes and its enhancement by the Atg8-family interacting motif to promote expansion of the membranes. *FEBS Lett.*, 589, Issue 6, 744-749 (2015)
 28. Suzuki SW, Yamamoto H, Oikawa Y, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, and Ohsumi Y. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, doi: 10.1073/1421092112 (2015)
 29. Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, and Nakatogawa H. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, doi:10.1038/nature14506 (2015)
 30. Fei-Fei Yu, Imamura Y, Ueno M, Suzuki SW, Ohsumi Y, Yukawa M, Tsuchiya E. The yeast chromatin remodeler Rsc1-RSC complex is required for transcriptional activation of autophagy-related genes and inhibition of the TORC1 pathway in response to nitrogen starvation. *BBRC.*, 07.114 (2015)
 31. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Ajay Shah, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.*, 6, 7527 (2015)
 32. Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, Okamoto K. Phospholipid methylation controls Atg32 - mediated mitophagy and Atg8 recycling *EMBO J.*, DOI 10.15252/embj.201591440.(2015)
 33. Yamamoto H, Shima T, Yamaguchi M, Mochizuki Y, Hoshida H, Kakuta S, Kondo-Kakuta C, Noda NN, Inagaki F, Itoh T, Akada R, Ohsumi Y. The Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of Autophagy. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M115.684233 (2015)
 34. Yamasaki A, Watanabe Y, Adachi W, Suzuki K, Matoba K, Kirisako H, Kumeta H, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F, Noda NN* Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates, *Cell Rep.*, 16, 19-27 (2016)
 35. Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, Noda N & Ohsumi Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Dev. Cell.*, 10.1016/j.devcel. (2016)
 36. Kawamata T, Horie T, Matsunami M, Sasaki M, and Ohsumi Y. Zinc starvation induces autophagy in yeast, *J. Biol. Chem.* [editor's pick up] (2017)
 37. Horie T, Kawamata T, Matsunami M, Ohsumi Y. Recycling of iron via autophagy is critical for the transition from glycolytic to respiratory growth *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M116.762963, [Faculty of 1000], (2017)

〔学会発表〕（計 14 件）

- 2015.3.19-3.23 7th. ISA, Yellow Mountain, China
- 2015.5.27-5.28 Cell Biology symposium, Alberta Univ. Edmonton, Canada
- 2015.8.23-8.27 ISN 2015, Australia, Cairns
- 2015.9.6-9.12 ICYGMB, Verona, Italy
- 2015.10.26-10.29 Gairdner International Award Symposium, Vancouver and Toronto, Canada Life Sciences BC & Genome BC, High School Lecture (grade 10-12 students), UBC Symposium (trainees and faculty members)
- 2016.4.6 Rosenstiel Award, Brandeis Univ. Boston, USA
- 2016.4.7 Wiley Prize, Rockefeller Univ. NYC, USA
- 2016.4.22-4.25 SINO-JAPAN Autophagy Symposium, Beijing, CHINA
- 2016.5.19-5.20 KSBMB 2016, COEX, Soul, KOREA
- 2016.9.7 Dr. Paul Janssen Award Symposium, Beerse, Belgium
- 2016.9.9 Milstein Lecture, Cambridge, MRC, UK
- 2016.9.11-9.15 ICY16, Awaji, JAPAN
- 2016.9.22 Dr. Paul Janssen Award symposium, NYC, USA
- 2016.12.7 The Nobel Prize Lecture, Stockholm, Sweden

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：平成 年 月 日

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：平成 年 月 日

取得年月日：平成 年 月 日

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 良典 (OHSUMI Yoshinori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・荣誉教授

研究者番号：30114416

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：