

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247034

研究課題名(和文)オートファジーにおける膜の起源：オルガネラバイオジェネシスの解明

研究課題名(英文)Origin of autophagic membrane: study on organelle biogenesis

研究代表者

吉森 保 (Yoshimori, Tamotsu)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：60191649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,300,000円、(間接経費) 11,190,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の分解システムであるオートファジーは、発生・分化から、発がん・神経変性疾患・感染症等の抑制まで多岐に亘る機能を持つ。オートファジーを遂行する膜で出来た構造体オートファゴソームがどこで作られているのかが、40年来論争の的となってきた。今回我々は、オートファゴソームがミトコンドリアと小胞体の接触点で形成されることを発見した。永年の謎が解けると共に、オートファジーを制御して疾患を治療する方法の開発に役立つ情報が得られたことになる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular degradation system having multiple functions from development and differentiation to suppression of tumorigenesis, neurodegeneration, infectious diseases, etc. The membrane-bound compartment, autophagosome executes autophagy. Where autophagosome is formed has been a target of the long-standing debate. In this project we demonstrated that it is formed the contact sites between mitochondria and the endoplasmic reticulum. Our finding resolved the enigma and provided useful information for developing autophagy regulating therapy.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：たんぱく質分解 オートファゴソーム ミトコンドリア 小胞体 発がん 神経変性疾患 感染症 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

細胞内大規模分解システム・オートファジーは、発生・分化から、がん・神経変性・感染症等の抑制まで多岐に亘る機能を持つ。オートファジーを遂行する膜オルガネラであるオートファゴソームは、他のオルガネラとは異なり必要に応じて新たに形成されるが、どこからそれが現れるのか40年来論争的となってきた。近年我々は、関連たんぱく質の解析と、3次元超微細形態の観察から小胞体起源説を唱えそれを支持する他グループの報告も出てきたが、一方でアメリカのグループがミトコンドリア起源説を提唱し混沌とした状況となっていた。

2. 研究の目的

本研究計画では、集中的かつ統合的な解析を展開し、オートファジー分野における最大の謎「膜の起源」問題について最終的な決着をつけることを目的とした。得られた成果は、細胞生物学の重要課題であるオルガネラ・バイオジェネシスの理解に寄与するだけでなく、オートファジーが関わる各種の疾患制圧に資する知的財産をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1) オートファゴソーム形成に働く分子の解析：オートファゴソーム形成の初期過程に働くことが判っているたんぱく質の解析を行うと同時に、それを手がかりとして新規関連たんぱく質の同定を行い、膜創成の分子メカニズムを解明する。

(2) 他のオルガネラの関与の解析：他グループが提唱するミトコンドリア起源説の検証を行う。特に、ミトコンドリアと小胞体が連携して膜創成を行っている可能性について予備的知見を得ているのでその追求を行う。

4. 研究成果

(1) オートファゴソーム形成初期過程に必要で普段小胞体に拡散して分布している Atg14L は、オートファジーが誘導されると、小胞体上で点状に集合し、そこでオートファゴソームが形成される。Atg14L の点状集合に必要な分子として Syntaxin 17 を同定した(大阪大学歯学部天野敦雄教授らとの共同研究)。Syntaxin 17 は小胞体に局在する SNARE family の膜タンパク質で、これまで機能ははっきりしていなかった。我々は、Syntaxin 17 が Atg14L の上流に位置し、Atg14L の点状集合に必須であることを見出した。また Syntaxin 17 もオートファジー誘導時に、Atg14L と同じ場所に集合することを明らかにした。

(2) 蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の観察から、Syntaxin 17 と Atg14L がミトコンドリア・小胞体接触サイトに点状集合することが判明した。さらに、接触サイトの形成に必要な

PACS2 のノックダウンによって、両者の点状集合が阻害され、かつオートファゴソームも形成されなくなることを示した。

(3) これまで世界的に前例が無いレーザー蛍光顕微鏡による3色同時撮影システムを構築し、小胞体とミトコンドリアがダイナミックに接触する様子をライブ観察で捉え、その接触点でオートファゴソームが形成される様子を動画撮影することに成功した。オートファゴソームの生成と接触点の関係を直接観察した画期的な成果である。さらには画像のデジタル処理により形成を定量化し、また形成途上のオートファゴソームが常に小胞体上にあるのに対し、ミトコンドリアに対しては接触と僅かな解離を繰り返していることも明らかにした。

(4) Atg14L を接触点に集合させる Syntaxin17 が、Atg14L と結合していることを示した。Syntaxin17 をノックダウンすると、Atg14L は接触点ではない他の場所で集合しそこで隔離膜は形成されるが、閉じてオートファゴソームにならない。従って接触点では隔離膜閉鎖に必要なものが供給されているものと思われる。

以上の成果は、対立してきた2つの説「小胞体起源説」と「ミトコンドリア起源説」の両方が正しかったことを示唆している。それぞれは、両オルガネラの接触点におけるオートファゴソーム形成を片方のオルガネラから観測していたのである。近年小胞体とミトコンドリアの接触点が、カルシウムイオンシグナリングや脂質輸送、ミトコンドリア分裂に働き生理的に重要であることが明らかになってきているが、オートファゴソーム形成の場でもあることが今回判明した。この発見は、永年の細胞生物学上の謎を解明しただけではなく、2つの全く相異なるオルガネラが協働して第3のオルガネラを創成するという新たなパラダイムをもたらした点で画期的である。本成果は、2013年3月に nature 誌に掲載された。

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 16 件)

1. Suzuki H, Tabata K, Morita E, Kawasaki M, Kato R, Dobson RC, Yoshimori T, Wakatsuki S. Structural Basis of the Autophagy-Related LC3/Atg13 LIR Complex: Recognition and Interaction Mechanism. *Structure*. 22, 47-58. doi: 10.1016/j.str.2013.09.023 (2014) 査読有
2. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh

- T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J Cell Biol.* 203,115-28. doi: 10.1083/jcb.201304188 (2013) 査読有
3. Yamanaka-Tatematsu M, Nakashima A, Fujita N, Shima T, Yoshimori T, Saito S. Autophagy Induced by HIF1 Overexpression Supports Trophoblast Invasion by Supplying Cellular Energy. *PLoS One.* 8, e76605. doi: 10.1371/journal.pone.0076605 (2013) 査読有
 4. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Mol Cell.* 51, 618-31. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003 (2013) 査読有
 5. Shirahama-Noda K, Kira S, Yoshimori T, Noda T. TRAPPIII is responsible for the vesicular transport from early endosomes to the Golgi apparatus that facilitates Atg9 cycling in autophagy. *J Cell Sci.* 126, 4963-73. doi: 10.1242/jcs.131318 (2013) 査読有
 6. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336-47. doi: 10.1038/emboj.2013.171 (2013) 査読有
 7. Murase D, Hachiya A, Takano K, Hicks R, Visscher MO, Kitahara T, Hase T, Takema Y, Yoshimori T. Autophagy Has a Significant Role in Determining Skin Color by Regulating Melanosome Degradation in Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 133, 2416-24. doi: 10.1038/jid.2013.165 (2013) 査読有
 8. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Omori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A*, Yoshimori T*. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 495, 389-93. doi: 10.1038/nature11910 (2013) 査読有
 9. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 131, 548-57. doi: 10.1002/ijc.26374 (2012) 査読有
 10. Raju D, Hussey S, Ang M, Terebiznik MR, Sibony M, Galindo-Mata E, Gupta V, Blanke SR, Delgado A, Romero-Gallo J, Ramjeet MS, Mascarenhas H, Peek RM, Correa P, Streutker C, Hold G, Kunstmann E, Yoshimori T, Silverberg MS, Girardin SE, Philpott DJ, El Omar E, Jones NL. Vacuolating Cytotoxin and Variants in Atg16L1 That Disrupt Autophagy Promote *Helicobacter pylori* Infection in Humans. *Gastroenterology.* 142, 1160-71. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.043 (2012) 査読有
 11. Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H*, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y*, Rakugi H. Autophagy guards against Cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol.* 180, 517-25. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.001 (2012) 査読有
 12. Ishibashi K, Fujita N, Kanno E, Omori H, Yoshimori T, Itoh T, Fukuda M*.

- Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy*. 7, 1500-13.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082872> (2011) 査読有
13. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y*. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol*. 85, 13185-94. doi: 10.1128/JVI.06099-11 (2011) 査読有
 14. Tachiyama R, Ishikawa D, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M, Tanaka Y, Fujita H*. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells*. 16, 448-66. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01499.x (2011) 査読有
 15. Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A*. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol*. 18, 1042-52. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.013 (2011) 査読有
 16. Kageyama S, Omori H, Saitoh T, Sone T, Guan JL, Akira S, Imamoto F, Noda T, Yoshimori T*. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against *Salmonella*. *Mol Biol Cell*. 22, 2290-300. doi: 10.1091/mbc.E10-11-0893 (2011) 査読有
- [学会発表](計 40 件)
1. Tamotsu Yoshimori, New insights into membrane dynamics in autophagy, APOCB Congress and ASCB Workshops, Biopolis, Singapore (2014.2.25)
 2. Tamotsu Yoshimori, New insights into autophagosome formation, 9th International EMBO-Annaberg Conference on Protein and lipid function in secretion and endocytosis, Goldegg am See, Austria (2014.1.18)
 3. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic insights into membrane dynamics in autophagy, The 2013 Cold Spring Harbor Asia Conference, Suzhou Dushu Lake Conference Center, China (2013.11.19)
 4. 吉森 保, オートファジー：疾患に対抗する細胞内自己分解システム、第25回日本色素細胞学会学術大会、大阪大学 (2013.11.16)
 5. Tamotsu Yoshimori, Mammalian autophagy: its machinery, membrane dynamics, and role in diseases, Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology scientific meeting (SAIB 2013), the Fundacion Leloir, Buenos Aires, Argentina (2013.11.7)
 6. 吉森 保, オートファジーの膜動態制御機構、第72回日本癌学会学術総会・シンポジウム S10 “がんオートファジー”、パシフィコ横浜 (2013.10.3)
 7. 吉森 保, Lysosome homeostasis: damaged lysosomes are selectively eliminated by autophagy、第86回日本生化学会大会、パシフィコ横浜 (2013.9.11)
 8. 吉森 保, オートファゴソームはどこから来るのか、第65回日本細胞生物学会大会、愛知県産業労働センター、名古屋 (2013.6.19)
 9. Tamotsu Yoshimori, 50 Years of Autophagy: towards Understanding

- The Intracellular Self-Degradation System Sustaining Life, 2013 The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan (2013.3.23)
10. 吉森 保, Insights into Membrane Dynamics in Mammalian Autophagy, 第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (2012.12.15)
 11. 吉森 保, オートファジー：発見から半世紀を経て、第 41 回日本免疫学会 学術集会、神戸国際会議場 (2012.12.5)
 12. Tamotsu Yoshimori, Autophagy : Molecular Machinery and Role in Diseases, The 12th International Symposium on Dendritic Cells, Convention Center EXCO, Daegu, Korea(2012.10.8)
 13. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic Insights into Autophagy against Bacteria Invading Host Cells, Cambridge Immunology Forum 2012, Peterhouse in Cambridge University, UK (2012.9.20) (Roche Distinguished Lecturer)
 14. Tamotsu Yoshimori, New insights into selective autophagy, Beatson International Cancer Conference, Glasgow University, Scotland (2012.7.2)
 15. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic insights into membrane dynamics in autophagy, ASBMB 2012 Annual Meeting, San Diego Convention Center, U.S.A. (2012.4.23)
 16. Tamotsu Yoshimori, Autophagy : molecular machinery and role in diseases, BSCB- BSDB- JSDB Joint Spring Meeting, University of Warwick, Coventry, UK (2012.4.18)
 17. Tamotsu Yoshimori, New Insights into Selective Autophagy, Zing Conference on Autophagy 2011, Occidental Grand Xcaret, Mexico (2011.12.9)
 18. Tamotsu Yoshimori, Insights into Membrane Dynamics in Autophagy, EMBO Conference on Autophagy in Health and Disease, Ma'ale Hachamisha Hotel, Tel Aviv, Israel (2011.10.31)
 19. Tamotsu Yoshimori, Autophagosome Formation: between the ER and Mitochondria, The Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology, Proctor Academy, Andover, NH, U.S.A. (2011.7.14)
 20. Tamotsu Yoshimori, Autophagy, A Guardian of Cells against Infection, The 19th Federation Meeting of Korean Basic Medical Scientists, Grand Hilton Seoul Convention Center, Korea (2011.5.13)
- 〔図書〕(計 2 件)
1. Keisuke T, Mitsuko H-N, Takeshi N. Akitsugu Y. Yoshimori T, Morphological Analysis of Autophagy. Cell Imaging Techniques Methods and Protocols Second Edition. 931, 449-466. (2013)Humana Press
 2. 吉森 保, Q&A / 哺乳類におけるオートファジー関連因子、オートファジー 生命をささえる細胞の自己分解システム、水島昇・吉森保 編、化学同人 C1-10 / 48-66 (2012)
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
吉森 保 (YOSHIMORI, Tamotsu)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：60191649