

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25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890059

研究課題名（和文） リン酸化サイクルを介したオートファゴソーム形成機構の解明

研究課題名（英文） Studies on regulation of autophagosome formation by kinases and phosphatases

研究代表者

荒木 保弘 (ARAKI YASUHIRO)

東京工業大学・フロンティア研究機構・特任助教

研究者番号：60345254

研究成果の概要（和文）：オートファジーは真核生物が普遍的に備える大規模タンパク質分解系で、二重膜構造の形成を伴う、アティピカルな膜動態から成り立っている。しかし、オートファジーの分子機構は依然不明な点が山積している。本研究では、基質未同定だった蛋白質キナーゼ Atg1 が Atg13 と Vps34 をリン酸化することを見出した。また、オートファジーに必須な、新規 PI3 キナーゼ構成因子 Atg38 を同定し、この因子が複合体形成に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a conserved eukaryotic process of vacuolar/lysosomal-mediated degradation targeting proteins and organelles. Autophagy is characterized by the formation of a cytosolic double-membrane structure, the autophagosome. The molecular mechanisms underlying the process of autophagy remain to be elucidated. Here, I demonstrate that Atg1 kinase, the substrates of which were unknown, phosphorylates Atg13 and Vps34. In addition, I identify a novel component of the PI3 kinase complex, Atg38. Atg38 is required for the integrity of this complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度		0	0
年度			0
年度			0
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：オートファジー、リン酸化、キナーゼ、ホスファターゼ、蛋白質分解、酵母

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物が普遍的に備える大規模タンパク質分解系で、二重膜構造の形成を伴う、アティピカルな膜動態から成り立っている。出芽酵母では飢餓によってオートファジーが誘導されると、細胞質に扁平な膜構造(隔離膜)が登場し、この膜が伸展・成長するにともない細胞質やオルガネラを取り込んだ後、液胞に輸送され、内容物が分解される。この二重膜構造体(オートファゴソーム)形成機構の理解は、オートファジー研究の中で最大の課題である。出芽酵母におけるオートファジーの発見と、オートファジー不能変異株の取得・解析を中心として、現在までにオートファゴソームの形成に必須な因子が同定されている。しかし各因子がどのようにオートファゴソーム形成に貢献しているか、どのように有機的に関連しているか、について依然不明な点が山積していた。

2. 研究の目的

貧栄養下で活性化する蛋白質キナーゼである Atg1 は、富栄養条件下では、栄養素の感知に主な役割を担う Tor キナーゼの直接の標的であり、不活性状態にある。従って Atg1 はオートファジー誘導・維持の情報伝達経路の最上流に位置するといえる。Atg1 キナーゼ不活性変異体の解析から、キナーゼ活性はオートファゴソーム形成に必須であることが判明しているが、その基質は不明である。本研究では、オートファジー誘導の情報伝達経路の最上流に位置する Atg1 キナーゼの基質を同定することにより、オートファゴソーム形成の初期段階の分子基盤とそのリン酸化による制御機構を明らかにすることを目的とする。また、オートファジーは栄養の再添加で速やかに停止することから、Atg1 キナーゼに拮抗するホスファターゼの存在が強く示唆される。Atg1 キナーゼに拮抗するホスファターゼを同定し、オートファゴソーム形成制御に対するリン酸化サイクルの意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Atg1 キナーゼの基質同定

オートファジーに必須である Atg1 キナーゼの基質及びそのリン酸化される残基を同定する。オートファジー関連タンパク質群は Atg1

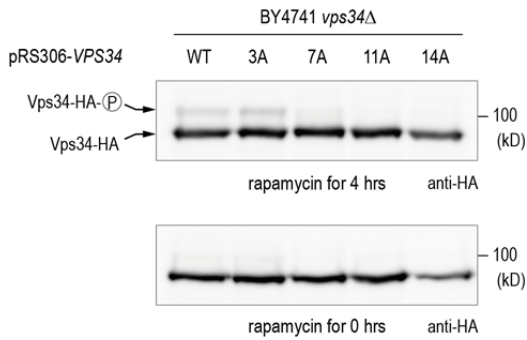
キナーゼの有力な基質候補である。基質候補の精製標品、活性化 Atg1 と ^{32}P 標識された ATP を混合した *in vitro* キナーゼアッセイにより、リン酸化修飾の有無を検証する。リン酸化が認められたタンパク質は質量分析により、リン酸化部位を同定する。同時に、飢餓状況下の酵母から精製した候補タンパク質上の同部位がリン酸化されていることも確認する。リン酸化部位をアラニンに置換した変異株を作製し、オートファジー活性への影響を生化学的手法により検証する。

(2) Atg1 キナーゼに拮抗するホスファターゼの同定

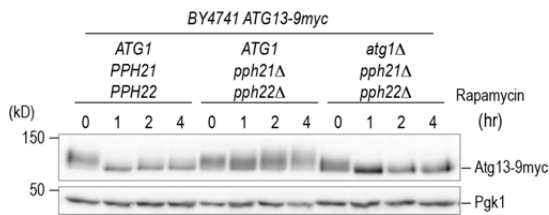
出芽酵母の蛋白質ホスファターゼのうち 32 について欠失株、条件致死株を取得している。飢餓状態でリン酸化が亢進する、または富栄養条件下でリン酸化が持続する変異体を同定する。同定したホスファターゼの変異株を用いて、オートファジー活性への影響を検証し、オートファジー終結における脱リン酸化の意義を検証する。

4. 研究成果

(1) すべての基質候補蛋白質を *atg1* 欠損酵母株から調製し、活性化 Atg1 と ^{32}P 標識された ATP を混合した *in vitro* キナーゼアッセイにより、リン酸化修飾の有無を検証した結果、Atg1 結合因子である Atg13 とホスファチジルイノシトール 3 リン酸を産出する PI3 キナーゼ構成因子 Vps34 が Atg1 によりリン酸化されることを見いだした。酵母細胞内でも、これらの因子は飢餓によるオートファジー誘導と共にリン酸化されており、この修飾が Atg1 依存的事であることも明らかとなった。*in vitro* リン酸化標品、飢餓状況下の酵母から精製した候補タンパク質のリン酸化部位を同定した。リン酸化部位をアラニンに置換した Vps34 変異株ではオートファジーに異常を生じた。

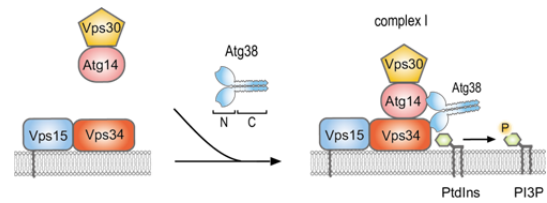


(2) 富栄養条件下で、Atg13 は Tor キナーゼにより直接リン酸化され、飢餓状態下では速やかに脱リン酸化され、これが Atg1 のキナーゼを活性化する。出芽酵母の蛋白質ホスファターゼ変異株を用いたスクリーニングの結果、PP2A 欠失株では飢餓状態下にも拘らず Atg13 のリン酸化が亢進し、このリン酸化は Atg1 に依ることを明らかにした。現在、PP2A 欠失株のオートファジーへの影響の有無を検証している。



(3) Atg1 キナーゼによる Vps34 のリン酸化を解析する過程において、質量分析解析により機能未知因子を Vps34 と免疫沈降で共沈される因子として同定し、Atg38 と名付けた。このタンパク質はオートファジーに寄与する complex I と共沈されるが、液胞酵素の輸送に寄与する complex II 特異的因子 Vps38 とは結合しないこと、飢餓に応答して、オートファゴソーム形成の場である PAS に局在することから、Atg38 は complex I 特異的構成因子であることが明らかとなった。Atg38 欠失株ではオートファジー活性が低下し、複合体が Atg14/Atg6 と Vps34/Vps15 の二つのサブコンプレックスに解離した。Atg38 は Atg14 と Vps34/Vps15 の両者にその N 末側領域を介して相互作用する。更なる生化学的解析により Atg38 は C 末側領域でホモ 2 量体化すること、この 2 量体が complex I 形成に必須であることが判明した。これらの結果は Atg38 の 2 量体が Atg14/Atg6 と Vps34/Vps15 の間を繋ぎ止

める役割を果たしていることを示唆する。



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 2 件)

① 荒木保弘、大隅良典、オートファジーを長期眠りからめざませめた酵母、ライフサイエンス 領域融合レビュー、査読無、2012、e005、1-10、DOI: 10.7875/leading.autho.1.e005

② Luconi L.、Araki Y.、Erlemann S. and Schiebel E.、The CENP-A chaperone Scm3 becomes enriched at kinetochores in anaphase independently of CENP-A incorporation. Cell Cycle、査読有、2011、10、3369-3378

[学会発表] (計 3 件)

① 荒木保弘、Wei-chi Ku、石濱泰、大隅良典、p25 is a novel component required for autophagy-specific PI3K complex integrity in yeast、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日-2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県

② Yasuhiro Araki、Wei-chi Ku、Yasushi Ishihama、Yoshinori Ohsumi、Identification of a novel component required for autophagy-specific PI3K complex integrity in yeast、The 6th International Symposium on Autophagy 2012、2012 年 10 月 28 日-2012 年 11 月 01 日、Bankoku Shinyokan, Okinawa

③ 荒木保弘、Wei-chi Ku、石濱泰、大隅良典、Identification of targets of the Atg1 protein kinase in autophagy、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日-2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜、神奈川県

[その他]

ホームページ等

<http://www.ohsumilab.aro.iri.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 保弘 (ARAKI YASUHIRO)

東京工業大学・フロンティア研究機構・特
任助教

研究者番号：60345254

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし