

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860149

研究課題名(和文) Atg9を含む新規膜構造体のプロテオーム解析とオートファゴソーム膜形成機構の研究

研究課題名(英文) Isolation and characterization of Atg9-containing membrane structures

研究代表者

角田 宗一郎(KAKUTA, Soichiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80551209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内に扁平な膜構造が現れ、それが細胞成分を包み込みリソソームに運びこむことで分解を行う現象である。このオートファジーの障害は様々な疾患に繋がることが知られている。本研究課題はこの膜形成の機構解明を目的として行った。オートファジーに関わる重要なタンパク質の一つがAtg9であり、細胞の膜上に存在している。我々はこのAtg9の局在を解析し、直径50nm程度の小胞構造「Atg9小胞」上にあることを明らかにした。さらに同じ膜上にあるタンパク質を調べていくことで、Rab1と呼ばれる小胞輸送に関わるタンパク質がAtg9小胞上に共局在し、膜形成に関与することを明らかにした。

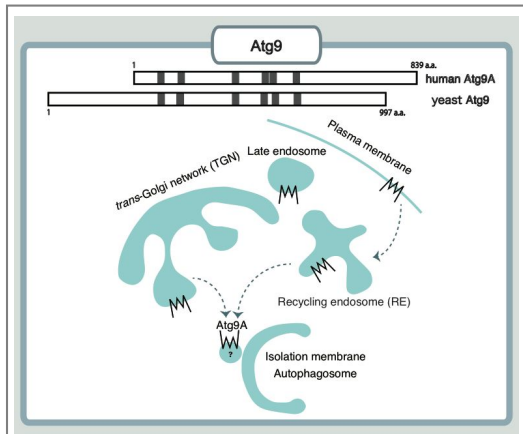
研究成果の概要(英文)：Atg9 is a membrane protein essential for autophagy and considered to be directly involved in the autophagosome formation. Mammalian Atg9A was reported to be localized to trans-Golgi network and endosomal compartment. For dissecting the Atg9A-containing membranes, we examined subcellular localization of Atg9A and performed immunoprecipitation of those membranes. Atg9A-GFP in human culture cells was observed as numerous puncta that move rapidly throughout the cytoplasm. We succeeded in isolation of these cytoplasmic membranes, and revealed that they were small vesicles by electron microscopy. Proteomic analyses revealed that isolated these vesicles contained proteins including Rab1, a small GTPase in ER-Golgi vesicle trafficking. In Rab1B-depleted cells, Atg9A accumulated on intermediate membrane structures at autophagosome formation site. These results indicated that Rab1B is involved in the regulation of proper development of autophagosome.

研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー 小胞輸送 電子顕微鏡 形態解析 質量分析

1. 研究開始当初の背景

真核生物における細胞内分解系であるオートファジーは、様々な細胞内現象に関わるとともに種々の疾患に関与するなど生理的な重要性についても知見が増してきている[1]。オートファジーの基礎的な研究において重要なテーマの一つが、オートファジーの特徴である膜構造（オートファゴソームおよび隔離膜）の形成機構である。膜形成に関与する数十個のタンパク質がこれまで報告されているが詳細なメカニズムは不明な点が多く、現在も活発に研究がなされている。オートファジーに必須のタンパク質のうち唯一の膜貫通型タンパク質である Atg9 は膜形成において重要な役割を担うと推測されている[2]。



Atg9 はゴルジ体・エンドソームへの局在が知られておりオートファゴソーム膜形成に直接的に関与するとされている

我々はこの Atg9 を対象として研究を行っている。過去に我々が行った出芽酵母細胞における研究で出芽酵母 Atg9 が特殊な膜構造（Atg9 小胞）上に存在することを発見した[3, 4]。ヒト・動物細胞においては Atg9A が主にオートファジーに関与していることが知られており、これまでは主にゴルジ装置・エンドソーム系への局在が報告されており、酵母と同様な特殊化された膜構造があるかどうかははっきりしていない。そこでこの Atg9A が局在する膜構造の同定・解析を行うことから Atg9A の機能の解明に繋がる知見を得ることができ、さらにはオートファジーにおける膜形成機構全体を考える上でも重要な手がかりを得られると期待して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、哺乳類細胞における Atg9A についてオートファジーにおける役割の解明を目的とする。Atg9A が局在する膜構造を単離、形態的・生化学的な解析を行うことで、オートファジーに直接関与する膜構造体を同定すること、さらには Atg9 と共局在・相互作用する因子を同定し、その機能を解析することでオートファゴソーム膜形成時の分子機構について理解を深めるために

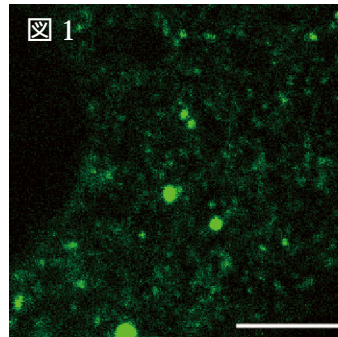
研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞を用いて、Atg9A の GFP 融合体を発現し観察を行った。Atg9A の局在に関して理解したうえで Atg9A を含む膜構造の単離精製を試みた。単離は界面活性剤を用いずに膜構造を維持したままで行うことで膜上の複数のタンパク質の解析が行えるようにした。単離した膜構造を電子顕微鏡により形態解析を行い、さらに質量分析により膜構造全体のプロテオーム解析を行うことで、膜成分の由来・性質を明らかにする。さらに Atg9A と相互作用するタンパク質を網羅的に同定することで膜形成に係る新規因子を同定した。同定した因子の局在解析およびノックダウン実験を行い、その機能の解明を試みた。

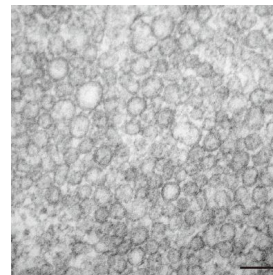
4. 研究成果

HEK293 細胞および HeLa 細胞において Atg9A-GFP を発現させて観察を行った。その結果それまでに知られているエンドソーム・ゴルジ体への局在に加えて高解像度、高速度でなければ検出出来ない小さな構造が細胞質中を動き回っていることを見出した(図1)。



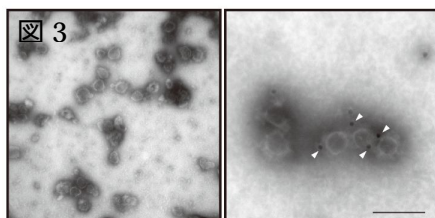
さらには超薄切片法による電子顕微鏡観察により、これらの細胞の一部には小胞の集合体があることが分かった(図2)。

図 2

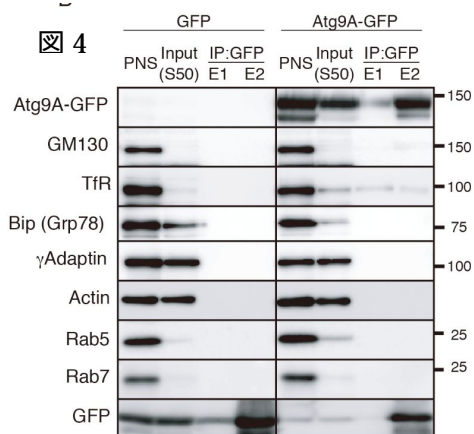


これらの構造の由来と性質を明らかにするために免疫沈降法による単離を行った。Atg9A-GFP を含む構造体を膜構造を保ったまま超遠心分離にかけ、Atg9A を含む上清から GFP 抗体で Atg9-GFP 陽性膜構造を単離した。単離膜構造をネガティブ染色法電子顕微鏡解析により観察を行った。その結果、直径 50 nm 程度

の小胞であることを見出した (図3)。



またウェスタンブロッティング解析により一般的なオルガネラタンパク質 (ゴルジ体タンパク質: GM130・Adaptin、エンドソームタンパク質: Rab5・Rab7・TfR) を含まない特殊な膜構造であることが示された (図4)。

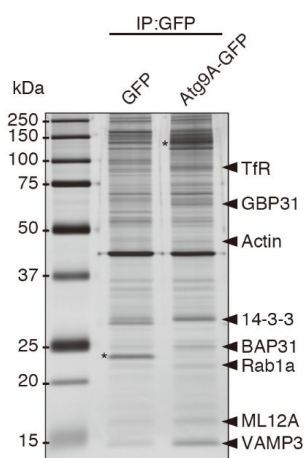


加えてオートファジー誘導時における局在解析を行った。アミノ酸飢餓でオートファジーを誘導し、さらに薬剤 (PI3K 阻害剤ウォルトマニン) 処理により中途段階で阻害すると、本来オートファゴソーム上には蓄積しない Atg9A がオートファゴソーム形成部位に蓄積する。この条件で上記のゴルジ体・エンドソーム関連タンパク質は凝集した Atg9A と共局在しない。以上の結果を合わせて、Atg9A を含む特殊な小胞がゴルジ体・エンドソームから生じてオートファゴソーム膜形成に関わることを示した。この結果は今後の Atg9 の機能解析をする上で非常に重要な知見となる。

Atg9 小胞のさらなる解析を行うために、単離小胞のプロテオーム解析を行った。免疫沈降法により単離した Atg9A 小胞上のタンパク質を電気泳動により分離し、タンパク質の銀染色を行った。特異的バンドを切り出し LC-MS/MS による質量分析を行った (図5)。さらに iTRAQ 法による定量ショットガン質量分析も行い、両者の結果を合わせて Atg9 小胞上に存在するタンパク質を網羅的に同定した。その中でオートファジーに関連の強い低分子量 G タンパク質 Rab1 についてさらなる解析をおこなった。まず内在性の Atg9A を用いた免疫沈降法により、正常な細胞においても Rab1B が Atg9 小胞上に存在することを示した。次に局在解析によりオートファゴソーム形成部位に Rab1B の一部が局在することを確認した。その後 Rab1B のオートファジー

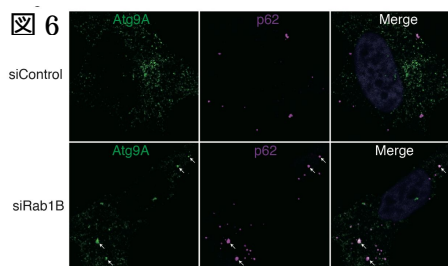
における機能について調べるために、

図5

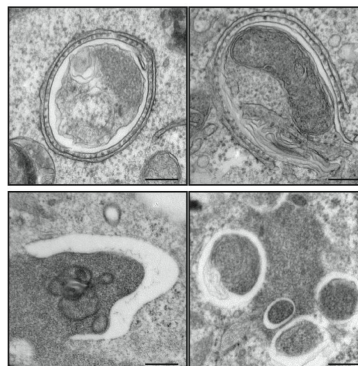


siRNA によるノックダウン実験を行った。その結果 siRab1B 処理細胞においては、1) オートファゴソーム形成部位 (p62 で標識) に LC3 が蓄積する。2) 同じくオートファゴソーム形成部位に Atg9A が蓄積することが分かった (図6)。

図6



LC3 は C 末端の脂質化によりオートファゴソーム膜上に局在するタンパク質であり、Atg9 は 6 回膜貫通タンパク質であることから局在場所には何らかの膜構造が出来ていることを示している。また Atg9A は完成したオートファゴソーム上には殆ど存在しないことから、中間段階の構造があると予想される。実際に Rab1B ノックダウン細胞を電子顕微鏡で観察したところ膜構造 (オートファゴソーム膜の中間体と思われるもの) が多数見られた (図7)。



通常の細胞ではこれらはそのまま完成したオートファゴソームとなり、リソソ

ームによる分解へと進んで消失するため電子顕微鏡ではめったに観察されない。以上の結果から Rab1B は正常なオートファゴソーム膜形成（伸長もしくは形状維持）に必要であり、その抑制によりオートファゴソーム形成が中途段階で阻害されることと考えられる。

Rab1 は小胞体とゴルジ体を結ぶ小胞輸送に関わる因子である。近年の研究によりオートファゴソーム形成には小胞体が密接に関与すると考えられている[7]。オートファゴソーム・隔離膜が小胞体近傍で形成される際に、小胞体から膜を供給する機構に Rab1 が関わりと推測される。Atg9A および Atg9 小胞の役割の一つとして、この様な膜形成に直接関わる因子をオートファゴソーム形成部位に連れてきて機能させるということが示唆された。以上の結果はオートファゴソーム膜形成の分子機構についての理解を深めることに貢献したと考えている。以上の成果は複数の学会発表で発表しており、現在原著論文を作成中である。また本課題でのプロテオーム解析により同定したもう一つの Rab1 タンパク質 Rab1A についての予備的な実験では、Rab1A の抑制によりオートファゴソーム形成が阻害されるが、Rab1B とは違って LC3 や膜構造の蓄積があまり見られないという結果を得ている。このことは Rab1 のホモログである Rab1A と Rab1B はオートファジーにおいては違う機能を有し、Rab1A の方がより上流で機能していることを示唆する。今後は Rab1A のオートファジーにおける機能についてもより具体的に解析を進めていく予定である。

[引用文献]

1. Mizushima and Komatsu. Cell 2015 147:728-741.
 2. Mizushima et al. Annu Rev Cell Dev Biol 2011 27;107-132.
 3. Hayashi et al. J Cell Biol 2012 198;219-233.
 4. Kakuta et al. J Biol Chem 2012 44261-44269.
 5. Shibutani and Yoshimori Cell Res 2014 24:58-68.
- 290:29506-29518.2015.D0I:10.1074/jbc.M115.684233 (査読有)
 2. Fuse A, Furuya N, **Kakuta S**, Inose A, Sato M, Koike M, Saiki S, Hattori N. VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. FEBS Letters. 589:1430-1436. 2015 DOI: 10.1016/j.febslet. (査読有)
 3. Cheng J, Fujita A, Yamamoto H, Tatematsu T, **Kakuta S**, Obara K, Ohsumi Y, Fujimoto T. Yeast and mammalian autophagosomes exhibits distinct phosphatidylinositol-3 phosphate asymmetries. Nat Commun. 5:1-10. 2014 DOI;10.1038/ncomms4207 (査読有)

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 3 件)

1. Yamamoto H, Shima T, Yamaguchi M, Mochizuki Y, Hoshida H, **Kakuta S**, Kondo-Kakuta C, Noda N, Inagaki F, Itoh T, Akada R, Ohsumi Y. The thermotolerant yeast *Kluyveromyces fragilis* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy. J Biol Chem.

[学会発表](計 8 件)

1. **角田宗一郎**、内山安男 Atg9 及び関連タンパク質のオートファジーにおける機能の解析 第 121 回日本解剖学会全国学会集會 2016 年 3 月 30 日 福島県郡山市
2. **角田宗一郎**、内山安男 オートファゴソーム形成における Atg9 と関連タンパク質の役割 第 9 回オートファジー研究会 2015 年 11 月 16 日 兵庫県淡路市
3. **Soichiro Kakuta**, Yasuo Uchiyama Analysis of Atg9-containing membrane structures ultrastructure and function in autophagy. 第 120 回日本解剖学会全国学会集會 2015 年 3 月 21 日 兵庫県神戸市
4. **角田宗一郎**、内山安男 オートファゴソーム形成における Atg9 と関連タンパク質の役割 日本顕微鏡学会関東支部講演会 2015 年 2 月 28 日 東京都新宿区
5. **Soichiro Kakuta**, Hayashi Yamamoto, Yoshinori Ohsumi, Yasuo Uchiyama. Ultrastructural and biochemical analysis of Atg9-containing membrane structures. 日本顕微鏡学会第 70 回学会集會 2014 年 5 月 11 日 千葉県千葉市
6. **角田宗一郎**、山本林、大隅良典、内山安男 Atg9 を含む膜構造における機能の解明 第 119 回日本解剖学会全国学会集會 2014 年 3 月 28 日 栃木県下野市
7. **角田宗一郎**、山本林、大隅良典、内山安男 Atg9 関連構造体の単離と解析 第 7 回オートファジー研究会 2013 年 12 月 0 日 静岡県掛川市

8. **角田宗一郎**、山本林、大隅良典、内山安男 Isolation and characterization of Atg9-containing membrane structures.
第36回日本分子生物学会 2013年12月4日 兵庫県神戸市

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=4852>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 宗一郎 (KAKUTA, Soichiro)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：80551209

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし