

機関番号 : 10101

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21770129

研究課題名 (和文) 脂質分子から迫るオートファゴソーム形成機構の研究

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism of autophagosome formation from the viewpoint of lipid molecules

研究代表者

小原 圭介 (OBARA KEISUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号 : 30419858

研究成果の概要 (和文) : オートファジーでは、オートファゴソームという二重膜構造の新生によって細胞質成分を隔離する過程が基盤となっている。オートファゴソームの脂質組成はほとんど分かっておらず、電子顕微鏡観察からスフィンゴ脂質などの特殊な脂質を豊富に含む可能性が示されていた。本研究では、出芽酵母を用いた研究により、スフィンゴ脂質合成がオートファジーの正常な進行に必要である事を初めて明らかにした。また、スフィンゴ脂質のうちイノシトールホスホリルセラミド (IPC) がオートファジーに関与する事を示唆した。すなわち本研究により特定のスフィンゴ脂質分子種がオートファジーに関与することが示された。また、スフィンゴ脂質に関与する素過程を調べたところ、オートファジーに必須な二つのユビキチン様タンパク質の結合反応系やオートファジー関連タンパク質が集積する PAS という構造の構築にはスフィンゴ脂質は関与しない事が示唆された。また、液胞の成熟にも関与しない事が分かった。スフィンゴ脂質はこれらの過程以外の部分でオートファジーに関与すると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : In autophagy, sequestration of cytoplasmic contents by a newly formed double-membrane structure called the autophagosome is the most fundamental process. Lipid composition of the autophagosome is still largely unknown; but from electron microscopic analyses, it has been speculated that the autophagosome is rich in some unusual lipids such as sphingolipids. In this study, we discovered that sphingolipid synthesis is required for proper progression of autophagy. We also suggested that inositolphosphoryl ceramide is involved in autophagy among several sphingolipid species in yeast. We next tried to reveal the process in which sphingolipid is actually involved. Two ubiquitin-like conjugating reactions are essential for autophagy. Sphingolipid was not essential for these reactions. Sphingolipid synthesis was not required for the construction of the PAS a peri-vacuolar structure where autophagy-related proteins assemble, either. Maturation of vacuolar hydrolytic enzymes was not affected by inhibiting sphingolipid synthesis. Sphingolipid is considered to be involved in other processes in autophagy.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：脂質、タンパク質、オートファジー、タンパク質分解、スフィンゴ

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に保存された細胞質成分の分解システムであり、栄養源のリサイクルのみならず、様々な疾病の予防にも関与している。オートファジーの基幹プロセスは、細胞質成分をオートファゴソームと言う二重膜構造で囲い込む過程である。しかし、その重要性とは裏腹にオートファゴソームの脂質組成や構築過程など、基本的な特徴もほとんどが未知のままである。電子顕微鏡観察では、オートファゴソーム膜は、他の生体膜とは異なり、リン脂質の層が明瞭に観察されない。このことから、オートファゴソーム膜には生体膜の主要な構成脂質であるグリセロリン脂質以外の特殊な脂質（スフィンゴ脂質など）が豊富に含まれる可能性があったが、スフィンゴ脂質がオートファジーに関与するかどうかは分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、盛んに研究されているオートファジー関連タンパク質ではなく、もう一方の主役である脂質分子を切り口にオートファゴソームの構築機構を明らかにする事を目的としている。先述の通り、スフィンゴ脂質はオートファジーに関与する可能性が示されているものの、その詳細については未知の部分が多い。また申請者の所属研究室はスフィンゴ脂質に関する技術や知識を蓄積している。そこで脂質分子のうち、スフィンゴ脂質に特に焦点を当てて研究する。

### 3. 研究の方法

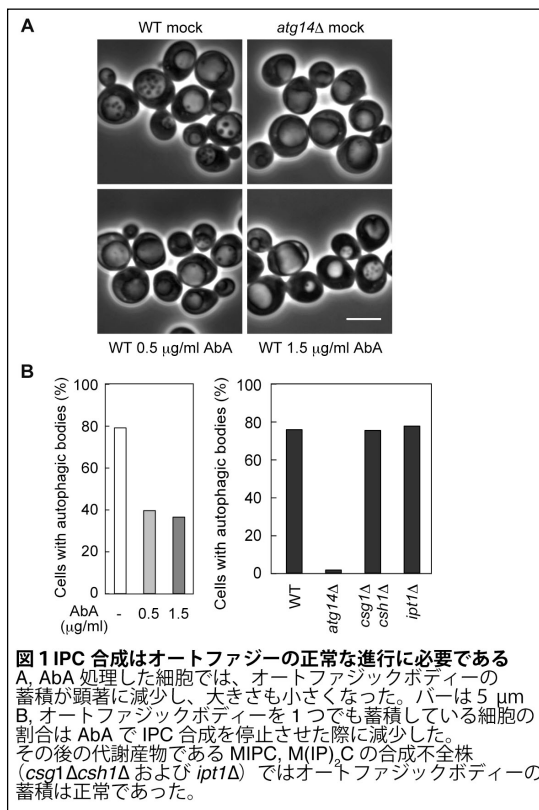
脂質分子のうち、特にスフィンゴ脂質に着目し、スフィンゴ脂質とオートファジーの関連を探った。スフィンゴ脂質の種類が少なく、遺伝子操作が容易な出芽酵母を主な材料とした。オートファジーの機構は真核生物で広く保存されていると考えられ、スフィンゴ脂質合成酵素もほとんどが保存されている。従って、出芽酵母を用いて得られた知見を一般化することは可能であると思われる。スフィンゴ脂質合成系のうち、遺伝子欠損が可能で過程は遺伝子欠損株を作製した。生育に必要な過程を触媒する酵素は、特異的阻害剤を用いた。この様に、スフィンゴ脂質合成の各段階を停止させた状態で、窒素炭素飢餓によりオートファジーを誘導し、オートファジー活性を顕微鏡観察および生化学的解析により

測定した。

また、オートファジーの素過程をモニターするため、関連タンパク質の翻訳後修飾、切断による成熟をイムノブロットで検出し、関連タンパク質が集積する液胞近傍のPASと呼ばれる構造の構築は、その基盤を成すAtg17の集積で評価した。

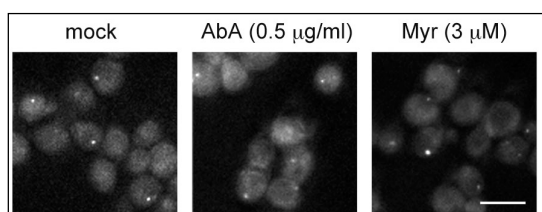
### 4. 研究成果

酵母の複合スフィンゴ脂質であるIPCの合成をオーレオバシジンA (AbA) で阻害すると、オートファジーが顕著に抑制される事を見出した (図1)。オートファジックボディーを顕微鏡下で観察すると、その数が減少すると共に小さいオートファゴソームの割合が増加していた。IPCは、MIPC、M(IP)<sub>2</sub>Cへとさらに代謝されるが、これらの合成はオートファジーに必要ではなかった。このことから、特定のスフィンゴ脂質すなわちIPCがオートファジーに関与する事が初めて明らかになった。



スフィンゴ脂質は、長鎖塩基部分と脂肪酸（酵母では主に炭素数 26 の極長鎖脂肪酸）部分からなるセラミド骨格を基本とする。長鎖塩基合成の初発段階であるセリンとパルミトイル-CoA の縮合反応をミリオシン (Myr) で阻害するとオートファジー活性が顕著に低下した。また、極長鎖脂肪酸合成に必須である *PHS1* 遺伝子の発現をシャットオフするシステムを用いて極長鎖脂肪酸の合成を停止させたところ、オートファジー活性が低下した。これらの結果は、複合スフィンゴ脂質である IPC が正常なオートファジー活性に必要であるという先の結果と一致する。

次に、スフィンゴ脂質がオートファジーのどの素過程に関与するかを調べた。Atg12 と Atg8 は、ユビキチン様タンパク質であり、最終的にそれぞれ Atg5、ホスファチジルエタノールアミンと共有結合体を形成する。どちらの結合反応系もオートファジーに必須である。AbA や Myr を添加してスフィンゴ脂質合成を停止させた状態で、これらの結合体を検出したところ、どちらも正常に形成されていた。このことから、スフィンゴ脂質は、これらの結合反応には必須ではない事が示された。また、オートファジー関連タンパク質が集積する液胞近傍の構造 pre-autophagosomal structure (PAS) の構築を、その基盤である Atg17 の集積でモニターした。するとスフィンゴ脂質合成を停止させた条件でも、Atg17 が PAS に集積しており、PAS の基盤形成にはスフィンゴ脂質が必須ではない事が明らかになった (図 2)。



**図 2 スフィンゴ脂質合成は PAS の基盤形成には必須ではない**  
AbA や Myr 処理によっても PAS の基盤である Atg17 の集積には影響がなかった。バーは 5 µm

次に選択的オートファジーの一種である Cvt 経路を積荷である ApeI の液胞への輸送とそれに続く切断で評価した。すると ApeI の切断は、AbA や Myr 処理により、多少抑制されたが、大きな影響は見られなかった。このことから、スフィンゴ脂質は Cvt 経路にある程度関与するものの必須ではないことが分かった。Cvt 経路では、オートファジーと類似した膜動態で Cvt 小胞が形成されて液胞へと輸送される。特にオートファジー誘導時には、オートファゴソームによっても ApeI は

液胞へと輸送される。Cvt 小胞はオートファゴソームよりも小さいため、スフィンゴ脂質合成を停止した状態で、小さいオートファゴソームが形成された場合でも、ApeI の輸送には大きな影響が出なかったと推測している。また、液胞の加水分解酵素を切断し、活性化する上位のプロテアーゼである Pep4 自身の成熟はスフィンゴ脂質合成を停止させても正常に起こっており、液胞の加水分解活性は正常に保たれている事が示唆された。スフィンゴ脂質は、これらの素過程以外の部分でオートファジーに関与しているのであろう。

一方、オートファジー誘導時のスフィンゴ脂質合成を放射標識したセリン、パルミチン酸および長鎖塩基を用いて追跡した。セラミド骨格は複数の箇所では水酸基が付加され、その水酸化レベルによって、酵母のスフィンゴ脂質には 5 つのサブタイプが存在する。オートファジー誘導時に、どのサブタイプのスフィンゴ脂質の合成が亢進しているかを調べたところ、水酸化レベルが最も低いタイプ (A タイプ) が蓄積していた。このタイプは、オートファジー非誘導時には比較的マイナーな分子種である。今後は、このタイプの IPC がオートファジーに関与する可能性を探っていく予定である。

## 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 1 件)

- ① Obara K and Ohsumi Y (2011) PtdIns 3-kinase orchestrates autophagosome formation in yeast. *Journal of Lipids*, 2011:1-9、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山形 麻旗、小原 圭介、木原 章雄、壺素飢餓応答におけるスフィンゴ脂質の役割、日本薬学会北海道支部第 134 回例会、2010 年 5 月 8 日～9 日、札幌
- ② 山形 麻旗、小原 圭介、木原 章雄、酵母を用いたオートファジー誘導におけるスフィンゴ脂質の機能解析、第 51 回日本脂質生化学会、2009 年 7 月 30 日～31 日、名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小原 圭介 (OBARA KEISUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30419858

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし