

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657083

研究課題名(和文) 選択的オートファジーの積荷を予測するアルゴリズムの作製とスクリーニングへの応用

研究課題名(英文) Prediction and screening of selective autophagy cargo in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

鈴木 邦律 (Suzuki, Kuninori)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：20373194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質分解に関わるオートファゴソーム(以下AP)というオルガネラを単離し、内容物を網羅的に同定した後、統計処理を行うことで、AP内に選択的に積み込まれるタンパク質を網羅的に同定しようとしたものである。本研究結果により、非選択的と考えられてきたオートファジーの積荷タンパク質の多くに偏りのあることが明らかとなった。今後はこの偏りを生み出す分子機構を明らかにし、真核生物における選択的オートファジーの生理的役割を解明したい。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy (autophagy) is a bulk protein-degradation system ubiquitously conserved in eukaryotic cells. During autophagy, cytoplasmic components are enclosed in a membrane compartment, called an autophagosome. In this study, we developed a method for monitoring intact autophagosomes *ex vivo* by detecting the fluorescence of GFP-fused aminopeptidase I, the best-characterized selective cargo of autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. A combination of LC-MS/MS with subsequent statistical analyses revealed a list of autophagosome cargo proteins. The methods we describe will be useful for analyzing the mechanisms and physiological significance of Atg11-independent selective autophagy.

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：細胞内タンパク質分解 オートファジー 選択的オートファジー オートファゴソーム 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、飢餓に応答してオートファゴソームと呼ばれるオルガネラが細胞質に形成されることにより被分解物を包み込み、細胞内分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合した後に分解されるという現象である。我々の研究により、オートファジーによる選択的タンパク質分解（選択的オートファジー）が出芽酵母のゲノムの安定化に寄与していることが明らかとなった (Suzuki, K. (2011) *Dev. Cell*)。また、哺乳動物ではオートファジーの破綻が腫瘍形成を引き起こすことが示された (Takamura, A. (2011) *Genes Dev.*)。腫瘍形成の主原因は未だ明らかになっていないが、オートファジー不能によるゲノムの不安定性がその一原因であると考えられることもできるだろう。このような背景から、選択的オートファジーの積荷タンパク質を同定することは極めて意義深い。本研究によって得られる知見は、我々が真核生物のモデルとして用いている出芽酵母だけではなく、高等動物にも応用可能であることから、真核生物における選択的オートファジーの生理的役割の解明に寄与する知見となることが期待される。

2. 研究の目的

オートファジーの中心を担うオートファゴソーム(以下AP)という細胞内小器官が発見されてから今日まで、APを単離してタンパク質組成や脂質組成を分析しようとする様々な試みがなされてきた。しかし、これまでは細胞破碎液中のAPの安定性を検証する方法が限られていたことから、明確な結果は得られてこなかった。本研究では、APを生化学的に単離する手法を確立し、プロテオーム解析に供することにより、選択的オートファジーの積荷タンパク質を網羅的に同定することを目的とした。また、生化学的・バイオインフォマティクスの解析を進め、選択的オートファジーの生じるメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

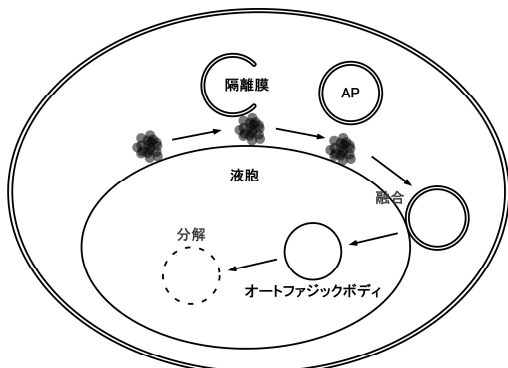


図1. オートファジーの模式図。細胞質に隔離膜が形成され、隔離膜が伸展することによりAPとなる。APは細胞内分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合した後速やかに分解される。

真核細胞が栄養飢餓にさらされるとオートファジーと呼ばれる細胞内分解システムが誘導され、細胞質に小さな袋状の膜が形成され、それが伸展して隔離膜となり、伸展した隔離膜の末端が閉じることによって被分解物を内包するAPが形成される(図1)。通常の野生株内においては、APの寿命は極めて短いため、APを単離してその内容を同定するためには、細胞内にAPを蓄積させる必要がある。そのために、我々は *ypt7* 破壊株を使用した。Ypt7はAPが液胞と融合するために必要なタンパク質であることから、*YPT7* 遺伝子を破壊してオートファジーを誘導すると、細胞内にAPが蓄積することが知られている(図2)。

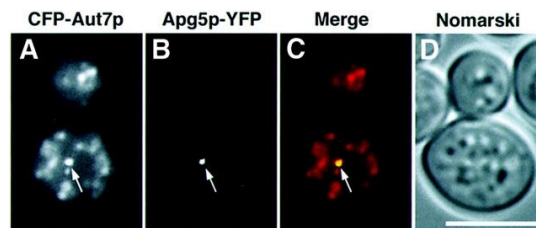


図2. オートファジーを誘導した *ypt7* 破壊株。(A) 蛍光タンパク質で標識したAP。多数のAPが輝点として確認される。(B) 蛍光タンパク質で標識したAP形成装置。(C) 両者を重ね合わせた図。(D) 明視野像。スケールバーは5 μm。Suzuki *et al.* (2001) *EMBO. J*より引用後改変。

このように、生きた細胞の中でAPを可視化することは可能であったが、細胞破碎液中ではWestern blot法を利用してAPの有無を確認する方法しか開発されておらず、単離法の最適化を迅速に進める上で難があった。そこで我々は、APの選択的積荷の中で最も解析の進んでいるアミノペプチダーゼ1 (prApe1) にGFPを融合することで細胞破碎液中でのAPの可視化を試みた。

4. 研究成果

まず、従来の生化学的手法により、APが細胞破碎液中で浸透圧の低下に敏感に反応し崩壊することを示した(図3)。

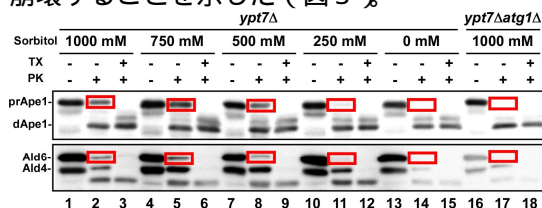


図3. APの浸透圧感受性。赤い四角で囲まれた領域のバンドがAPの存在を示す。prApe1は細胞質に存在するアミノペプチダーゼ1。Ald6は細胞質に存在するタンパク質。共にAPの選択的積荷である。どちらも250 mM sorbitol存在下でバンドがほとんど消失していることから低浸透圧によりAPが壊れていることが示唆される。

続いてGFP-prApe1を過剰発現する *ypt7* 破壊株を作製した。この細胞を用いてオートファジーを誘導後、細胞を破碎し、蛍光顕微鏡観察することによってAPの存在をモニターできることを見出した(図4)。また、この細胞破碎液を低速遠心し、沈殿画分に回収されたAPを免疫電子顕微鏡法により確認することに成功した(図5)。

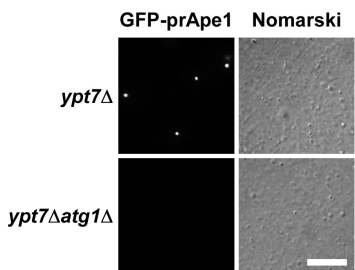


図4. GFP-prApe1によるAPのモニタリング. オートファジーを誘導したypt7破壊株およびypt7 atg1破壊株(オートファジー不能株)を破碎し、蛍光顕微鏡により観察した。ypt7破壊株ではAPが輝点として観察されるが、ypt7 atg1破壊株では輝点が観察されないことから、これらの輝点はAPであると考えられる。スケールバーは10 μm。Suzuki *et al.* (2014) *PLoS One*より引用。

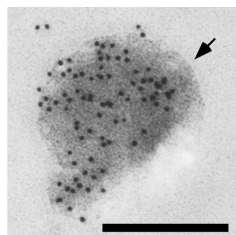


図5. 抗Ape1抗体を使用した免疫電子顕微鏡法により確認されたAP。矢印はAP膜。スケールバーは200 nm。Suzuki *et al.* (2014) *PLoS One*より引用後改変。

GFP-prApe1 を用いて AP 画分をモニターしつつ、密度勾配遠心法を用いることによって AP 画分を得ることに成功した(図6)。

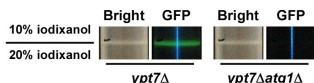


図6. 密度勾配遠心法により得られたAP画分。ypt7破壊株にのみAPIに含まれるGFP-prApe1由来のバンドが確認される。Suzuki *et al.* (2014) *PLoS One*より引用後改変。

こうして得られた AP 画分をショットガンプロテオミクスに供し、AP 内部に取り込まれるタンパク質を網羅的に同定した。さらに、本解析により得られたデータを分析することにより、AP 内部に選択的に積み込まれるタンパク質の候補を複数個同定した。近年報告のあたりリソソームを構成するタンパク質や、かつて我々のグループが同定した aldehyde dehydrogenase 6 (Ald6)などが候補に挙がってきた。得られた新規の候補の中で、解糖系の初発酵素である phosphofructokinase 複合体を構成する Pfk1/2 の選択的取り込みが確認された(図7)。

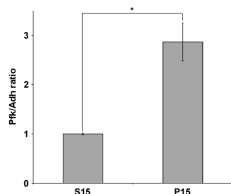


図7. Phosphofructokinase複合体の濃縮。Pfk1/2タンパク質と非選択的積荷タンパク質Adhのタンパク質の量をWestern blottingにより定量した。AP画分(P15)のPfk/Adhの比は細胞質画分(S15)よりも有意に大きかった。これはAP内部にPfkが濃縮されていることを示唆する。Suzuki *et al.* (2014) *PLoS One*より引用後改変。

現在これらのタンパク質が AP に選択的に取

り込まれる機構を生化学的手法・バイオインフォマティクス的手法により解析中である。

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5件)

1. Kuninori Suzuki, Shingo Nakamura, Mayumi Morimoto, Kiyonaga Fujii, Nobuo N. Noda, Fuyuhiko Inagaki, Yoshinori Ohsumi. Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 9, e91651 (2014) (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0091651

2. Kuninori Suzuki, Manami Akioka, Chika Kondo-Kakuta, Hayashi Yamamoto and Yoshinori Ohsumi. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 126, 2534-2544 (2013) (査読有)

DOI: 10.1242/jcs.122960

3. Risa Matsumoto, Kuninori Suzuki and Yoshikazu Ohya. Organelle acidification is important for localisation of vacuolar proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* 250, 1283-1293 (2013) (査読有)

DOI: 10.1007/s00709-013-0510-2

4. Kuninori Suzuki. Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death Differ.* 20, 43-48 (2013) (査読有)

DOI: 10.1038/cdd.2012.73

5. Takafumi Kobayashi, Kuninori Suzuki and Yoshinori Ohsumi. Autophagosome formation can be achieved in the absence of Atg18 by expressing engineered PAS-targeted Atg2. *FEBS Lett.* 586, 2473-2478 (2012) (査読有)

DOI: 10.1016/j.febslet.2012.06.008

(学会発表)(計2件)

1. 鈴木邦律・オートファジーによる被分解タンパク質の網羅的解析・第65回日本細胞生物学会大会・2013年6月19日~6月21日・ウインクあいち(愛知県名古屋市)

2. 鈴木邦律・Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*・第64回日本細胞生物学会大会・2012年5月28日~5月31日・神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://ps.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 邦律 (SUZUKI, Kuninori)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
准教授
研究者番号：20373194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

野田 展生 (NODA, Nobuo)
微生物化学研究所・主席研究員
研究者番号：40396297