

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291040

研究課題名(和文) オートファゴソームをモデルとした真核細胞のオルガネラ形態形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of organelle biogenesis using autophagosome formation as a model system

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞の内部ではオルガネラが必要に応じて形成と分解を繰り返すことにより恒常性が維持されている。オルガネラの分解にはオートファジーと呼ばれる細胞内分解システムが重要な役割を担っている。オートファジーとは、被分解オルガネラを取り囲むように二重膜オルガネラであるオートファゴソーム(以下AP)が形成され、APが分解コンパートメントである液泡と融合することにより、標的オルガネラの分解を達成するシステムである。本研究では隔離膜マーカーの探索を形態学的に進め、AP形成に必要なAtg3が隔離膜に局在することを示した。また、最近になって新たな隔離膜マーカータンパク質を同定した(論文投稿中)。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a highly conserved cellular recycling process involved in degradation of eukaryotic cellular components. During autophagy, macromolecules and organelles are sequestered into the double-membrane autophagosome and degraded in the vacuole/lysosome. Atg3 is an E2-like enzyme that catalyzes the conjugation reaction between Atg8 and phosphatidylethanolamine (PE). We constructed functional GFP-tagged Atg3 (Atg3-GFP) by inserting the GFP portion immediately after the handle region of Atg3. During autophagy, Atg3-GFP transiently formed a single dot per cell on the vacuolar membrane. This Atg3-GFP dot colocalized with 2×mCherry-tagged Atg8, demonstrating that Atg3 is localized to autophagic structures. Furthermore, we found that Atg3-GFP is localized to the IM by fine-localization analysis. The localization of Atg3 suggests that Atg3 plays an important role in autophagosome formation at the IM.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー タンパク質分解 オルガネラ分解 出芽酵母 オルガネラ Atgタンパク質 生体膜

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核細胞に普遍的に見られる現象であり、細胞内の大規模かつ非選択的な分解機構として知られている。その中心を担っているのがオートファゴソーム(以下 AP)と呼ばれる脂質二重層の二重膜で区画化されたオルガネラである。AP は栄養飢餓により顕著に形成されるが、形成後は速やかに分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合して内容物と共に分解される。出芽酵母において、AP 形成のステップに必須な 19 種類の ATG (autophagy-related) 遺伝子が得られ、機能解析が進められてきた。その過程で Atg タンパク質がいくつかの機能群を構成して機能していることが明らかとなってきた。しかしながら、それらの機能群がオートファジーに関わる膜動態とどのように関連しているのかはほとんど分かっていなかった。

まず、Atg8 が AP に局在するタンパク質として同定された。申請者はオートファジーの温度感受性変異株を作製して、GFP を融合した Atg8 を蛍光顕微鏡下に経時的に観察した。その結果、AP が液胞近傍の一点から次々と作り出される様子を可視化することに成功した (Suzuki *et al.*, *EMBO J.*, 2001)。この Atg8 の集積した領域は pre-autophagosomal structure (以下 PAS) と名付けられた。現在 PAS の概念はオートファジー研究者の間で広く受け入れられている。また、申請者が導入し、改良を施した経時観察用蛍光顕微鏡システムは哺乳動物細胞における AP 形成過程の可視化にも大きく貢献した (Mizushima, *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2001)。

2. 研究の目的

Atg8 は PAS に集積した後、AP の前駆膜構造である隔離膜に移行して隔離膜を伸展させる役割を果たす。AP 形成過程の解析が困難なのは、PAS と隔離膜と AP とを区別する手法が確立していなかった点にある。申請者は PAS から隔離膜を経て AP が完成するまでの一部始終を可視化すべく研究を進めてきた。その結果、蛍光顕微鏡法を用いて PAS と隔離膜と AP とを区別することに成功した。この手法を応用して AP 形成過程における隔離膜の動態を追跡すると共に、生化学的に隔離膜を単離し、隔離膜上に局在する生体分子を形態学的かつ生化学的に同定することを目的とした。

3. 研究の方法

AP は伸展した隔離膜が閉じることによって完成するので、隔離膜の伸展機構を解析することは AP 形成を理解する上で最も重要な項目の一つである。これまで隔離膜上に局在する Atg タンパク質を同定する方法が免疫電子顕微鏡法以外になかったことから、Atg タンパク質の局在解析は遅々として進まなかった。報告者は、AP の選択的積荷タンパク質

であるアミノペプチダーゼ 1 (Ape1) を過剰発現することにより、細胞内に隔離膜が蓄積することを見いだした (図 1)。この手法を利用して隔離膜進展の分子機構を解明することを目指した。

隔離膜の由来に関しては、小胞体などの既存のオルガネラ膜が機能変換して隔離膜になるという説や、小胞が次々と融合

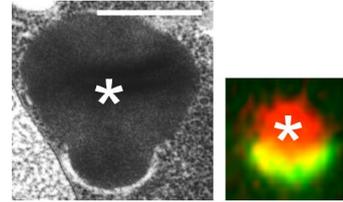


図 1 隔離膜の可視化。過剰発現された Ape1 (*) を取り囲むようにお椀状の隔離膜が見られる。(左) 電子顕微鏡像。(右) 蛍光顕微鏡像。GFP-Atg8 により隔離膜が可視化されている。スケールバーは 500 nm。

して隔離膜を伸展させるという説など諸説が入り乱れているが、決定的な証拠はない。このような混乱を招いている最大の要因は、隔離膜のマーカー分子が乏しいことにある。まず隔離膜に局在するタンパク質を同定し、できるだけ多くのマーカー分子を得ることが喫緊の課題である。

また、AP を単離する手法を確立し、AP に含まれるタンパク質や脂質の組成を解析することを通じてマーカー分子の同定を狙った。

4. 研究成果

隔離膜のマーカーとなる Atg タンパク質を同定するために Ape1 を過剰発現した細胞を使用して蛍光顕微鏡による Atg タンパク質の局在解析を行った。その結果、Atg8 が隔離膜に局在することが確かめられた。そこで、Atg8 を基準に他の Atg タンパク質の局在を詳細に解析したところ、Atg タンパク質は隔離膜形成時にそれぞれ特徴的な局在を示すことが分かり (図 2)、この成果を論文として発表した (Suzuki *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2013)。また、本手法を利用して、局在未知の Atg3 が隔離膜に局在することを示した (Ngu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2015)。

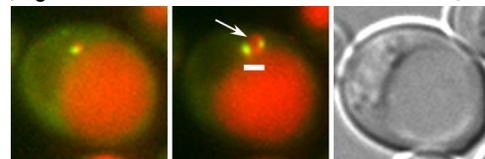


図 2 隔離膜の伸展。RFP-Atg8 を経時観察することにより、隔離膜が点状からお椀状へと伸展していく様子が観察される。また GFP で標識した Atg タンパク質 (緑) がお椀の縁に複数の点として分布している様子が観察される。(左) 観察開始時の細胞。(中央) 4 分後の細胞。(矢印) 隔離膜。(右) 微分干渉像。スケールバーは 1 μ m。

AP の解析に関しても大きな進展があった。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。報告者は、本研究課題を通じて、細胞破碎液中では、AP は浸透圧の低下に敏感に反応し、崩壊すること、細胞破碎液中で AP を形態的に検出するには、積荷タンパク質である Ape1 の過剰発現が必

須であること, GFP-Ape1 を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, これらのモニタリング法を利用し, 密度勾配遠心法を用いて AP を濃縮した画分が得られること, (図3) ショットガンプロテオミクスにより, AP 内部に取り込まれるタンパク質を網羅的に同定できることを示してきた。



図3 オートファゴソーム画分の単離。緩衝液中で細胞を破碎し、密度勾配遠心法によりオートファゴソーム画分を得た。GFP-Ape1をマーカーとし、GFPの蛍光によりオートファゴソーム画分を可視化した(左)。通常の明視野像(右)。

現在プロテオミクスの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数十個同定している。近年報告のあったリボ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 Ald6 などが候補に含まれていることから, この解析は妥当であるといえよう。リボソームや Ald6 が AP に選択的に取り込まれる機構は未知だったので, リボソームと Ald6 の分解を指標に細胞質タンパク質が AP 内部に選択的に取り込まれる分子機構を解析し, それに関わっているタンパク質を同定した (Suzuki *et al.*, *PLoS One*, 2014)。

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7件)

Akinori Yamasaki, Yasunori Watanabe, Wakana Adachi, Kuninori Suzuki, Kazuaki Matoba, Hiromi Kirisako, Hiroyuki Kumeta, Hitoshi Nakatogawa, Yoshinori Ohsumi, Fuyuhiko Inagaki and Nobuo N. Noda. Structural mechanisms of receptor-mediated selective autophagy of aggregated aminopeptidase I. *Cell Reports* (2016) *in press* (査読有)

Klionsky DJ, *et al.* (2467 人の著者中 2036 番目). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222, doi: 10.1080/15548627.2015.1100356 (2016) (査読有)

Meipin Ngu, Eri Hirata, Kuninori Suzuki. Visualization of Atg3 during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 290, 8146-8153,

doi: 10.1074/jbc.M114.626952 (2015) (査読有)

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, doi: 10.1371/journal.pone.0091651 (2014) (査読有)

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, doi: 10.1242/jcs.122960 (2013) (査読有)

Risa Matsumoto, Kuninori Suzuki and Yoshikazu Ohya. Organelle acidification is important for localisation of vacuolar proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma*, 250, 1283-1293, doi: 10.1007/s00709-013-0510-2 (2013) (査読有)

Kuninori Suzuki. Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death Differ.* 20, 43-48, doi: 10.1038/cdd.2012.73 (2013) (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

平田恵理, 鈴木邦律 出芽酵母のオートファゴソーム形成における Atg4 の機能解析, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド(神戸市)

平田恵理, 鈴木邦律 オートファゴソーム形成における Atg4 の機能解析, 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会, 2015年8月30日, 広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

白井亨, 鈴木邦律 液胞内リパーゼ様タンパク質 Atg15 の機能解析, 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会, 2015年8月30日, 広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

白井亨, 鈴木邦律 出芽酵母におけるオートファジックボディ分解機構の解析, 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年7月1日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

平田恵理, 鈴木邦律 オートファゴソーム形成における Atg4 の機能解析, 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年6月30日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

呉枚嬪, 鈴木邦律 Atg3 の可視化によるオートファゴソーム形成機構の解析, 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会, 2014年9月1日, 東京大学弥生講堂(東京都文京区)

鈴木邦律 Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*, 第14回日本タンパク質科学会年会(招待講演), 2014年6月25日, ワークピア横浜(横浜市)

松本理沙, 鈴木邦律, 大矢禎一 液胞および液胞膜タンパク質の局在化における液胞酸性化の重要性, 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会, 2013年9月8日, 東北学院大学土樋キャンパス(宮城県仙台市)

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, ウィンクあいち(名古屋市)

〔図書〕(計1件)

Kuninori Suzuki. Autophagic structures in yeast (Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging, Elsevier) (2016) *in press*

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院新領域創成科学研究科・プロスペクタス
http://www.k.u-tokyo.ac.jp/pros/person/kuninori_suzuki/kuninori_suzuki.htm

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻生命応答システム分野 HP
<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