

平成23年 5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006年度～2010年度

課題番号：18076002

研究課題名（和文）オートファジーによる選択的細胞内分解のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of intracellular degradation through selective autophagy

研究代表者

阪井 康能（SAKAI YASUYOSHI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60202082

研究成果の概要（和文）：ペルオキシソーム特異的分解（ペキソファジー）に関与する液胞膜タンパク質 Vac8 の機能、液胞形態制御のための Atg8 の新規機能を解明した。また酵母の細胞増殖誘導期に亢進するオートファジー経路や植物病原性カビの感染に要するペキソファジーの分子機構を解明し、オートファジーの新たな生理機能を見出した。

研究成果の概要（英文）：We elucidated novel functions of Vac8 in peroxisome degradation (pexophagy) and of Atg8 in regulating the vacuolar morphology. Furthermore, we revealed the molecular mechanisms of an autophagic pathway induced in the lag phase of yeasts and a pexophagy process responsible for infection of a plant pathogen fungus, discovering new physiological functions of autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,400,000	0	12,400,000
2007年度	17,200,000	0	17,200,000
2008年度	17,200,000	0	17,200,000
2009年度	17,200,000	0	17,200,000
2010年度	17,200,000	0	17,200,000
総計	81,200,000	0	81,200,000

研究分野：タンパク質分解による細胞・個体機能の制御

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファジー・ペルオキシソーム・液胞・ペキソファジー・酵母

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは細胞内構成成分を液胞/リソソームに輸送して分解する機構の総称であり、初期の研究ではその非特異的な分解様式についての研究が進んだ一方で、オルガネラ等を特異的に分解する分子機構については未解明な点が多かった。また、オートファジーの持つ高次の生理機能については、栄養飢餓時のアミノ酸リサイクリングを除い

て、はっきりと示されたものはほとんどなかった。

2. 研究の目的

ペルオキシソーム研究のモデル生物として用いられてきたメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を主たる対象として用い、ペルオキシソームを特異的に分解するオートファジー機構（ペキソファジー）の分子メ

カニズムを、特に液胞膜動態の解析を通じて解明すること、同時に Atg タンパク質の新規機能を見出すことを目的とした。また、上記酵母や植物病原性真菌におけるオートファジーの新規生理機能の探索も目的とした。

3. 研究の方法

1) ペキシソファジーにおける液胞膜タンパク質 Vac8 の機能解析

Vac8 は液胞膜上に局在し、娘細胞への液胞輸送に機能する因子であり、出芽酵母では選択的オートファジーの 1 つ CVT pathway に機能することが分かっている。本研究では Vac8 が *P. pastoris* のペキシソファジーに関与するかどうか、また関与するとすれば膜動態のどの段階に機能するのかを調べるため、*VAC8* 遺伝子破壊株におけるペキシソファジー活性の解析、および液胞膜とオートファジー膜との蛍光顕微鏡観察を行った。また、本タンパク質はアルマジロリピートと呼ばれるドメインを分子内に持つが、この部分がペキシソファジー機能に寄与するのかどうかを調べるため、分子内領域を欠損した Vac8 変異体発現株における上記解析も並行して行った。

2) Atg8 の液胞形態制御に関する新たな機能の解明

Atg8 はオートファジー膜に局在するマーカータンパク質として知られる因子であるが、*Pichia pastoris* においてこのタンパク質を欠損させると、液胞形態が異常になることを既報にて見出していた。そこで Atg8 が液胞形態制御に機能する際の分子基盤を明らかにするため、Atg8 の細胞内局在を蛍光顕微鏡観察で解析した。また、Atg8 自身やその機能を支える他の *ATG* 遺伝子の多数の変異株を用い、メタノール培養をはじめとする様々な培養条件下での液胞膜の形態を観察した。見出した Atg8 の分子機能が持つ生理的役割を知るため、Atg8 の変異が増殖速度に与える影響も調べた。

3) メタノール資化性酵母の代謝変換時に誘導されるオートファジーの解析

メタノール資化性酵母をグルコース培養からメタノール培養へと培地変換するとペルオキシソームの発達をはじめとする劇的な細胞内の体制変換が生じるが、この際にオートファジーの果たす役割を知るために、上記 Atg8 に加えて、選択的オートファジー経路の輸送基質である ApeI、Ald6 の液胞への輸送を、野生株および *ATG* 遺伝子変異株において調べた。同時に上記の変異株におけるメタノール培養時の生育速度を比較した。さらに本条件下での細胞内栄養状態をアミノ酸添加により調節し、オートファジー活性との相関を調べた。

4) 植物病原性菌の感染時に誘導されるペキシソファジーの解析

植物病原性の真菌である *Colletotrichum orbiculare* は植物感染の前段階にあたる分生孢子形成時にペルオキシソーム合成が重要であることが先行論文において見出されていた。そこで、続く感染の過程においてペルオキシソーム分解が誘導されるかどうかを形態学的に解析した。本研究代表者らが以前ペキシソファジーに機能することを示していた *P. pastoris* Atg26 のホモログが本菌においても存在することが見出されたことから、本タンパク質の触媒活性・膜結合性が感染に果たす機能を変異株解析により調べた。

4. 研究成果

1) ペキシソファジーにおける液胞膜タンパク質 Vac8 の機能解析

P. pastoris において *VAC8* 遺伝子破壊株を取得すると、本株ではペキシソファジーの様式の 1 つマイクロペキシソファジーが停止していることが分かった。液胞膜および Atg8 を用いたオートファジー膜の顕微鏡解析から、本株ではオートファジー膜の形成、伸長は起こるが液胞膜によるペルオキシソーム包み込みが阻害されていることが分かった。また驚くべきことに、分子内のアルマジロリピートを欠損させた Vac8 は、液胞の娘細胞への受け渡しには機能しないものの、ペキシソファジー時の液胞膜変形には機能を持つことがわかり、Vac8 による液胞膜形態制御には複数の分子機序が存在することが分かった。

酵母における液胞膜形態制御機構の研究は生体膜動態を支える分子メカニズムのモデル研究としてその重要性が認識されている。今研究において見出した、ペキシソファジーにおける Vac8 の新たな液胞膜形態制御機構は本タンパク質の膜変形メカニズムの多様性を示すものとして価値あるものであると言える。

2) Atg8 の液胞形態制御に関する新たな機能の解明

P. pastoris 野生株の培養炭素源をグルコースからメタノールに移した際の液胞形態を追跡観察すると、液胞膜の融合が誘導されることを見出した。この融合活性は Atg8 欠損株では見られなかったことから、Atg8 が液胞膜の融合に機能すると予想された。そこで蛍光タンパク質で標識された Atg8 を顕微鏡観察すると、予想通り本タンパク質が液胞膜上に存在することを見出した。また、Atg8 欠損株では上記炭素源変換時の細胞の増殖速度が野生株に比較して顕著に低下することを発見した。このような Atg8 の液胞融合への寄与は、低浸透圧への対応時に見られる液胞融合や、娘細胞への液胞輸送にも重要であることも見出し、オートファジーとは異なる Atg8 の新たな機能をはじめて明らかにした。

通常のオートファジー誘導時において Atg8 はユビキチン化に類似した反応経路を経てリン脂質フォスファチジルエタノールアミンに結合する。また Atg8 のオートファジー機能にはその（膜）半融合活性が重要であることが先駆的論文から知られている。そこで Atg8 のアミノ酸残基を置換することで、リン脂質結合のできない、あるいは半融合活性を持たない変異タンパク質を作成しその液胞形態への影響を調べたところ、驚くべきことに脂質結合のできない Atg8 も液胞の融合に機能することが分かった。一方で Atg8 の半融合活性は液胞形態制御に必要であった。以上のことから、リン脂質結合に依存しない Atg8 の機能を初めて明らかにした（下図 1）。

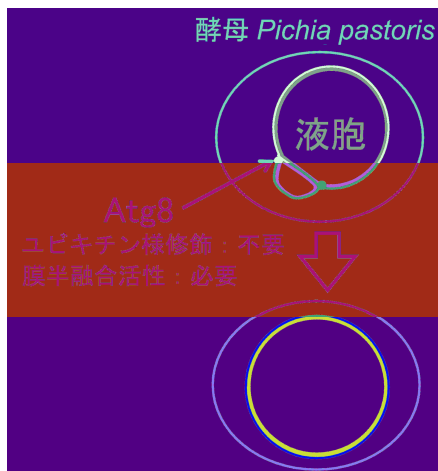


図 1 本課題研究で見出された Atg8 の新規生理機能

3) メタノール資化性酵母の代謝変換時に誘導されるオートファジーの解析

P. pastoris 野生株の培養炭素源をグルコースからメタノールに変換しオートファジー活性を、蛍光タンパク質で標識された Atg8 の液胞への輸送を指標にして調べたところ、培地変換後約 6 時間までオートファジー活性が上昇することを見出した。このことは電子顕微鏡による微細構造観察によっても確認された。オートファジー活性上昇は本酵母の増殖誘導期 (Lag Phase) と一致して観察されたことから、誘導を Lag Phase Autophagy (LPA) と命名しその分子機構を調べた。

酵母細胞において選択的オートファジーの基質である ApeI、Ald6 の液胞内への輸送をそれぞれのタンパク質に蛍光タンパク質標識を付加して調べたところ、両タンパク質とも LPA によって液胞への輸送が亢進していた。オートファジーに機能するタンパク質複合体の形成には、核となる足場タンパク質が必要であり、選択的なオートファジーでは Atg11 が、非選択的なオートファジーでは

Atg17 がその役割を担うとされてきた。これらのタンパク質を欠損した株において液胞内への輸送を調べると、ApeI の輸送は Atg11 欠損株で、Ald6 の輸送は Atg11 と Atg17 の両欠損株で阻害されていた。すなわち複数の分子機構によるオートファジーが本条件下で誘導されていることが分かった。

興味深いことに、LPA の誘導できない変異株のほとんどでメタノール培地転換後の増殖誘導期が野生株と比較して伸長し、増殖開始までにより時間がかかるようになっていた（下図 2）。また、上記変異株ではペルオキシソーム合成速度の低下も見られた。このような LPA 変異株に対してアミノ酸を過剰投与すると増殖誘導期の伸長は見られなくなったことから、LPA の役割は細胞内構造の劇的な変化に伴うアミノ酸等の欠乏に対応するためのものであると結論付けられた。

一般に微生物の増殖誘導期は、タンパク質の発現パターンが大きく変動する時期であることが知られている。この変動のために細胞が転写・翻訳段階での調節機構だけでなく、オートファジーによるタンパク質分解を利用した調節機構を持つことが本研究により初めて明示された。

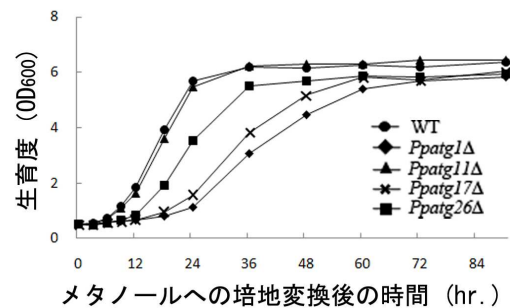


図 2 オートファジー変異株における増殖誘導期の伸長

4) 植物病原性菌の感染時に誘導されるペキシソファジーの解析

電子顕微鏡解析、そして蛍光タンパク質標識されたペルオキシソーム、Atg8 を用いた蛍光顕微鏡解析によって、*C. orbiculare* の分生胞子から生じる付着器と呼ばれる細胞内でペキシソファジーが誘導されることが分かった。一方で、遺伝学的解析から本菌の感染に必要な因子として Atg26 のホモログタンパク質が同定されたことから、本タンパク質欠損株におけるペキシソファジー活性を調べたところ、その阻害が見出された。Atg26 の変異タンパク質で、GRAM ドメインとよばれる部位を中心とした脂質結合領域を欠失したもの、あるいは Atg26 の触媒活性であるステロールグルコシド合成能を失ったものほども atg26 変異株のペキシソファジー機能不全を回復できず、また感染能も回復しなかった。以

上のことから Atg26 を用いるペキシソファジーが本菌の植物への感染に必要であることを示した。これは選択的オートファジーであるペキシソファジーの高次生理機能を見出した最初の報告である。

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 16 件)

- ① Naoki Tamura, Masahide Oku, Yasuyoshi Sakai, Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*, *Journal of Cell Science*, 査読有、Vol.123、2010、pp. 4107-4116
- ② Masahide Oku、Yasuyoshi Sakai、Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation, *FEBS Journal*, 査読有、Vol.277、2010、pp. 3289-3294
- ③ 阪井康能、自然界での生存戦略からみたオートファジーと糸状菌の植物病原性～To be, or not to be: that is the question・・・～、*化学と生物*、査読無、Vol. 48、No. 3、2010、pp. 153-155
- ④ Kohki Yoshimoto、Yoshitaka Takano、Yasuyoshi Sakai、Autophagy in plants and phytopathogens, *FEBS Letter*、査読有、Vol.584、2010、pp. 1350-1358
- ⑤ 阪井康能、高野義孝、植物病原菌の宿主感染・オルガネラ数の制御とオートファジー、*ブレインテクノニュース*、査読無、Vol.135、2009、pp. 25-30
- ⑥ Yoshitaka Takano、Makoto Asakura、Yasuyoshi Sakai、Atg26-mediated pexophagy and fungal phytopathogenicity, *Autophagy*、査読有、Vol. 5、No. 7、2009、pp. 1041-1042
- ⑦ Y. Watanabe, N.N. Noda, K. Honbou, K. Suzuki, Y. Sakai, Y. Ohsumi, F. Inagaki, Crystallization of *Saccharomyces cerevisiae* α -mannosidase, a cargo protein of the Cvt pathway, *Acta Crystallographica*、査読有、Vol. 65、Part6、2009、pp. 571-573
- ⑧ Shun-ichi Yamashita、Hiroya Yurimoto、Dai Murakami、Mari Yoshikawa、Masahide Oku、Yasuyoshi Sakai、Lag-phase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Genes to Cells*、査読有、Vol.14、2009、pp. 861-870
- ⑨ Makoto Asakura、Sachiko Ninomiya、Miki Sugimoto、Masahide Oku、Shun-ichi Yamashita、Tetsuro Okuno、Yasuyoshi Sakai、Yoshitaka Takano、Atg26-Mediated Pexophagy is required for host invasion

by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*, *Plant Cell*、査読有、Vol.21、2009、pp.1291-1304

- ⑩ Masahide Oku、Yasuyoshi Sakai、Pexophagy in *Pichia pastoris*, *Methods in Enzymology*、査読有、Vol.451、2008、pp. 217-228
- ⑪ 阪井康能、オルガネラ・ダイナミクスとオートファジー、*実験医学*、査読無、Vol. 26、2008、pp. 284-288
- ⑫ Shun-ichi Yamashita、Masahide Oku、Yasuyoshi Sakai、Functions of PI4P and sterol glucoside are necessary for the synthesis of a nascent membrane structure during pexophagy, *Autophagy*、査読有、Vol. 3、No. 1、2007、pp. 35-37
- ⑬ 山下俊一、阪井康能、出芽酵母のオートファジーに必須な遺伝子群 Atg 分子による膜動態の制御とペキシソファジー、*蛋白質核酸 酵素*、査読無、Vol. 51、No. 10、2006、pp. 1474-1479
- ⑭ Masahide Oku、Taku Nishimura、Takeshi Hattori、Yoshitaka Ano、Shun-ichi Yamashita、Yasuyoshi Sakai、*Autophagy*、査読有、Vol. 2、No. 4、2006、pp. 272-279
- ⑮ Yasuyoshi Sakai、Masahide Oku、Ida J. van der Klei、and Jan A.K.W. Kiel、Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes, *Biochimica et biophysica acta*、査読有、Vol.1763、2006、pp. 1453-1462
- ⑯ Shun-ichi Yamashita、Masahide Oku、Yuko Wasada、Yoshitaka Ano、Yasuyoshi Sakai、PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy, *The Journal of Cell Biology*、査読有、Vol. 173、No. 5、2006、pp. 709-717

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① Yasuyoshi Sakai、Vacuole dynamics during microautophagy、Swiss Yeast Meeting、2010年9月6日、University of Fribourg、Switzerland
- ② Yasuyoshi Sakai、Recruitment of PI4-kinase from the Golgi apparatus to PAS、Gordon research conference on "Autophagy in Stress, Development and Disease"、2010年4月27日、Lucca (Barga)、Italy
- ③ Yasuyoshi Sakai、Roles of phosphoinositide signaling and Atg molecules during yeast microautophagy、EMBO conference series: Autophagy Cell Biology, Physiology & Pathology、2009年10月19日、Ascona、Switzerland
- ④ Yasuyoshi Sakai、A Molecular System

For Degradation of Proteins and Organelles under Phosphoinositide Signaling, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009年7月31日, 京都市

- ⑤ 阪井 康能、 Peroxisome homeostasis maintained by multiple autophagic pathways、第31回分子生物学会年会・第81回生化学会大会合同大会シンポジウムオルガネラダイナミクスー形成・分解と機能制御、2008年12月9日、兵庫県神戸市
- ⑥ Yasuyoshi Sakai、 Autophagy at the lag phase of methylotrophic growth in *Pichia pastoris* 、 The 12th International Congress on Yeasts, Session "Organelles and Autophagy"、2008年8月11-15日、Kyiv, Ukraine
- ⑦ Yasuyoshi Sakai、 Roles of Atg26 in Methanol-Induced Autophagy and Plant Pathogenicity 、 Keystone Symposia, "Autophagy in Health and Disease"、2007年4月16日、Monterey, California, USA
- ⑧ Yasuyoshi Sakai、 Regulation of Micropexophagy by Phosphoinositide signaling、4th International Symposium of Autophagy、2006年10月1日、静岡県三島市
- ⑨ Yasuyoshi Sakai、 Pexophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*、 *Hansenula polymorpha* Worldwide Network Meeting、2006年9月3日、Haren、Netherlands

[その他]

ホームページ等

第5回オートファジーに関する国際会議

ホームページ (2009年9月主催)

<http://www.isa5.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪井 康能 (SAKAI YASUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60202082

(2) 研究分担者

由里本 博也 (YURIMOTO HIROYA)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

奥 公秀 (OKU MASAHIDE)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10511230

(H20より)

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：