

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20113002

研究課題名（和文） 細胞内分解系ロジスティクスの疾患における役割と作動機構の解析

研究課題名（英文） Study on role of intracellular degradative logistics in diseases and its molecular machinery

研究代表者

吉森 保 (YOSHIMORI TAMOTSU)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：60191649

研究成果の概要（和文）：

細胞の消化器官であるリソソームへは細胞外からエンドサイトーシス経路、細胞質からオートファジー経路が物質を運び込み、何がいつでもどれだけ分解されるかが巧妙に調節されている。本研究では、この2つの輸送経路を制御する分子機構を明らかにし、感染症、がん、大理石病などの疾患との関係の解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Both the endocytic and autophagic pathway delivers materials into lysosomes, intracellular digestive organelles, from outside of cells and from the cytoplasm, respectively. The pathways tune when, how much, and what is degraded in lysosomes. We revealed molecular machineries underlying the pathways and their role in diseases including infectious diseases, cancer, and osteopetrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	43,700,000	13,110,000	56,810,000
2009年度	33,500,000	10,050,000	43,550,000
2010年度	49,100,000	14,730,000	63,830,000
2011年度	33,500,000	10,050,000	43,550,000
2012年度	33,100,000	9,930,000	43,030,000
総計	192,900,000	57,870,000	250,770,000

研究分野：生物学

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、エンドサイトーシス経路

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の消化器官であるリソソームへは細胞外からエンドサイトーシス経路、細胞質からオートファジー経路が物質を運び込み、それらの物流システムによって、何が・いつ・どれだけ分解されるか、が巧妙に調節されている。近年急速に進展しているオートファジー研究は我が国が主導的立場にあり、本研究代表者は哺乳類のオートファジー関連タンパク質（Atg）の解析を通してその一翼を担ってきた。オートファジー分野は爆発的な発

展を遂げたが、オートファジーの分子機構や明らかになってきた疾患との関わりについては本質的な謎は解けていない。一方エンドサイトーシス経路は比較的早くから解析が行われ分子機構の解明が進んでいる。しかしまだ未知の部分も多く、特に疾患との関係は喫緊の課題と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のこれまでの成果を礎とし、オートファジーとエンドサイトー

シス経路の分子機構について、疾患との関わりに焦点を絞りながら解明を進めることを目標とした。具体的には、感染症、がん、大理石病などを抑制するメカニズムとしての2つの分解系ロジスティクスの制御機構、とりわけ膜動態のコントロールメカニズムを解析した。オートファジーについては、実行膜構造のオートファゴソームの起源の解明も目指した。また将来の創薬を視野に入れ、オートファジーを制御する低分子化合物を同定することも目的の一つとした。

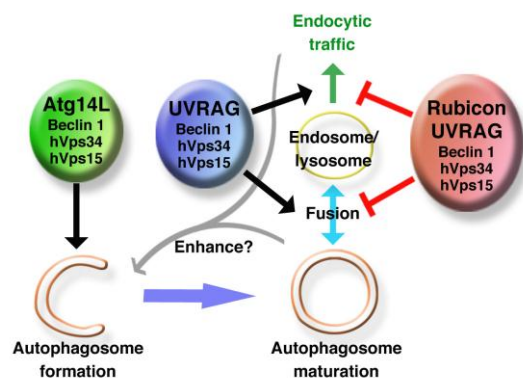
### 3. 研究の方法

オートファゴソーム形成に必要なタンパク質群 Atg や、新たに発見したエンドサイトーシス経路の制御因子を中心に、哺乳類培養細胞を材料として分子解剖を実施した。複雑な膜動態を伴う2つの輸送経路を解析するために、分子生物学、生化学、細胞工学、光顕・電顕によるイメージング等を駆使し多面的なアプローチを行った。薬剤探索は、理研との共同研究により、理研の低分子化合物ライブラリーについて独自に開発したオートファジーのアッセイ系や、化合物アレイを組み合わせたスクリーニングにより実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) がんとオートファジー

発がん抑制能を持つオートファジー関連タンパク質 Beclin1 に結合する新規タンパク質 Atg14L と Rubicon を同定した。そして、Beclin1 を含む PI3 キナーゼ複合体には、Atg14L を含むもの、UVRAG を含むもの、UVRAG と Rubicon を含むものの3種類があり、前者はオートファゴソームの形成に必要である一方、後者の Rubicon を含む複合体はオートファジーの後期過程とエンドサイトーシス経路の後期過程をそれぞれ抑制的に制御していることを明らかにした (Nat Cell Biol, 2009a)。オートファジーとエンドサイトーシスの両経路を同時多段階に制御する複雑なシステムの存在により、発がんが抑制されている可能性が示唆された。



#### (2) 感染症とオートファジー

A 群連鎖球菌を捕獲する巨大オートファゴソームの形成に、通常のオートファゴソーム形成には関与しないロジスティクス制御因子 rab7 が必須であることを示した (PLoS Pathog, 2009)。また、サルモネラに対するオートファジーでは、通常のオートファジーの場合とは異なり Atg タンパク質群が3つのグループに分かれ、各々独立にサルモネラの周囲にリクルートされるという機構を新たに発見した (Mol Biol Cell, 2011)。これらの発見から、病原細菌の排除に特化した分子機構を持つオートファジーが進化の過程で現れてきたことが明らかとなった。

#### (3) 大理石病とエンドサイトーシス経路

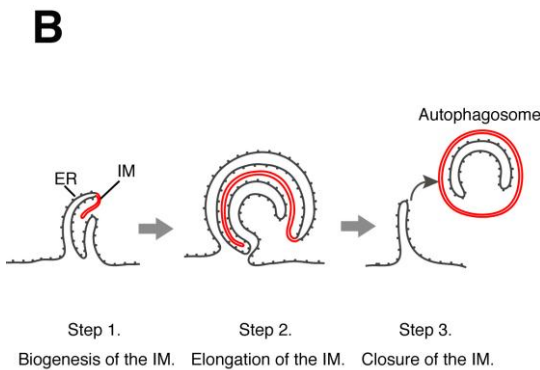
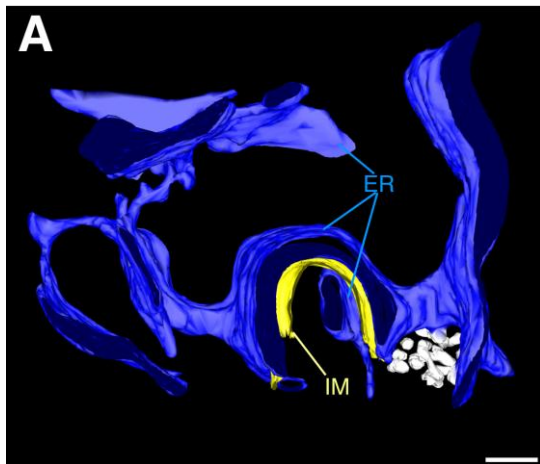
先に述べた Rubicon の機能解析を行い、Rubicon が PI3 キナーゼ複合体と rab7 に同時に結合することで、オートファジーとエンドサイトーシス経路を負に調節することを見出した (Mol Biol Cell, 2010)。さらに Rubicon とファミリーを形成するタンパク質 PLEKHM1 が、rab7 エフェクターとしてエンドサイトーシス経路を抑制的に制御していることを示した (同論文)。オートファジー経路には影響しない。PLEKHM1 は破骨細胞の機能が損なわれて生じる大理石病の原因遺伝子であり、今回の発見によりエンドサイトーシス経路の調節不全が破骨細胞による骨吸収を低下させ大理石病が発症することが判明した。

#### (4) オートファゴソームの起源

オートファゴソームは必要に応じてその都度形成されるため、どこでどのように産まれるのかが長年論争的となってきた。我々はまず、電子線トモグラフィーによる詳細な超微細形態観察により、小胞体の一部が変形しオートファゴソーム形成の場となっていることと小胞体と形成途上のオートファゴソームの一部が繋がっていることを明らかにした (Nat Cell Biol, 2009b)。さらに Atg14L が小胞体に局在し、その局在がオートファゴソーム形成に必要であることも示した (J Cell Biol, 2010)。これらの結果は、小胞体がオートファゴソーム形成のプラットフォームであることを強く示唆している。

#### (5) オートファジーを制御する薬剤

オートファジーの進行を2つの蛍光でモニターする独自のアッセイ系と、理研で開発された化合物アレイ (化合物と目的タンパク質の結合を検出) を組み合わせて、オートファジーを促進する低分子化合物と阻害する低分子化合物をそれぞれ複数同定した (未発表)。今後解析を進め、研究用試薬や臨床薬の開発を目指す。



上の図 A は、電子線トモグラムから構成した 3次元イメージ。青が小胞体で、黄色が形成中のオートファゴソームである。図 B は、観察を元に描いたオートファゴソーム形成のモデル。小胞体の一部が変形してできた鋳型の中でオートファゴソームが成長する。(Nat Cell Biol, 2009b より)。

#### 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 42 件)

1. Murase D, Hachiya A, Takano K, Hicks R, Visscher MO, Kitahara T, Hase T, Takema Y, Yoshimori T. Autophagy Plays a Significant Role in Determining Skin Color by Regulating Melanosome Degradation in Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2013 in press 査読有
2. Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia.

*Autophagy*. 9, 303-316. (2013) 査読有

3. Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A\*. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol*. 18, 1042-1052. (2011) 査読有
4. Kageyama S, Omori H, Saitoh T, Sone T, Guan JL, Akira S, Imamoto F, Noda T, Yoshimori T\*. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against *Salmonella*. *Mol Biol Cell*. 22, 2290-2300. (2011) 査読有
5. Tabata K, Matsunaga K, Sakane A, Sasaki T, Noda T, Yoshimori T\*. Rubicon and PLEKHMI Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain. *Mol Biol Cell*. 21, 4162-4172. (2010) 査読有
6. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T\*, Yoshimori T\*. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol*. 190, 511-521. (2010) 査読有
7. Furuta N, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Amano A\*. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vtilb mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol Biol Cell*. 21, 1001-1010. (2010) 査読有
8. Taguchi-Atarashi N, Hamasaki M, Matsunaga K, Omori H, Ktistakis NT, Yoshimori T, Noda T\*. Modulation of Local PtdIns3P Levels by the PI Phosphatase MTMR3 Regulates Constitutive Autophagy. *Traffic*. 11, 468-478. (2010) 査読有
9. Yamaguchi H, Nakagawa I, Yamamoto A, Amano A, Noda T, Yoshimori T\*. An

- initial step of GAS-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7. *PLoS Pathog.* 5: e1000670. (2009) 査読有
10. Saitoh T§, Fujita N§, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S\*. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 20842–20846. (2009) 査読有
  11. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T\*, Yamamoto A\*. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 11, 1433–1437. (2009) 査読有
  12. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T\*. Differential involvement of ATG16L1 in Crohn's disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the ATG16L1 complex in fibroblasts. *J Biol Chem.* 284, 32602–32609. (2009) 査読有
  13. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda, K, Ichimura I, Isobe T, Akira S, Noda T, Yoshimori T\*. Two Beclin-1 binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biol.*, 11, 385–396. (2009) 査読有
  14. Saitoh T§, Fujita N§, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S\*. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 456, 264–268. (2008) 査読有
  15. Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A\*. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1875–1886. (2008) 査読有
  16. Fujita N, Hayashi M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T\*. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol Biol Cell.* 19, 4651–4659. (2008) 査読有
  17. Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, Takada H, Goldman WE, Fukase K, Silverman N, Yoshimori T, Kurata S\*. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol.* 9, 908–916. (2008) 査読有
- [学会発表] (計 58 件)
1. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic Insights into Autophagy against Bacteria Invading Host Cells, Cambridge Immunology Forum 2012, Cambridge, UK (2012.9.20) (Roche Distinguished Lecturer)
  2. Tamotsu Yoshimori, Insights into Membrane Dynamics in Autophagy, EMBO Conference on Autophagy in Health and Disease in Tel Aviv, Israel (2011.10.31)
  3. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic Insight into Membrane Dynamics in Mammalian Autophagy, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Autophagy (D1)”, Whistler, Canada (2011. 3. 28)
  4. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic insight into membrane dynamics of mammalian autophagy, Gordon Research Conference “Autophagy In Stress, Development And Disease” in Lucca, Italy (2010. 4. 27)
  5. Tamotsu Yoshimori, Binding Rubicon to Cross the Rubicon, EMBO Conference Series on Autophagy: Cell

Biology, Physiology & Pathology in  
Ascona, Switzerland (2009. 10. 19)

6. Tamotsu Yoshimori, Mechanistic  
Insight into Membrane Dynamics in  
Mammalian Autophagy, Gordon  
Research Conference “Molecular  
Membrane Biology” in Andover, NH,  
USA (2009. 7. 9)

[図書] (計 5 件)

1. 吉森 保, Q&A / 哺乳類におけるオ  
ートファジー関連因子  
オートファジー 生命をささえる  
細胞の自己分解システム  
水島昇・吉森保 編、化学同人  
C1-10 / 48-66 (2012)
2. Yoshimori T, Amano A. Group a  
streptococcus: a loser in the  
battle with autophagy. Beth  
Levine・Tamotsu Yoshimori・Vojo  
Deretic Editors, Curr Top  
Microbiol Immunol. 335, 217-226.  
(2009)Springer
3. Kimura S, Fujita N, Noda T,  
Yoshimori T. Monitoring autophagy  
in mammalian cultured cells  
through the dynamics of LC3.  
Methods Enzymol. 452, 1-12. (2009)  
Academic Press, Inc.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/jp/achievement/010/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉森 保 (YOSHIMORI TAMOTSU)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
研究者番号 : 60191649