

令和 2 年 4 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18539

研究課題名（和文）長時間飢餓におけるオートファジー停止機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of termination mechanism on autophagy

研究代表者

吉良 新太郎（Shintaro, Kira）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10711583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーはヒトをはじめとした真核生物に見られる細胞内分解機構である。オートファジーは短時間の栄養飢餓で活発に起こるが、我々はオートファジーが長期の飢餓では停止することを見出した。オートファジー停止に関与する遺伝子の探索を行い、新規因子Tag1を同定した。Tag1の機能解析の結果、Tag1はAtg1プロテインキナーゼを介したAtg13タンパク質のリン酸化により、オートファジーを終結させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、オートファジーを薬剤により誘導させることで、関連疾患の治療が試みられている。しかし、オートファジー特異的な誘導薬はまだ存在せず、その開発が期待されている。本研究において、オートファジー停止を阻害することで、過剰なオートファジーを起こすことに成功した。このため、「オートファジー停止を阻害する」という、オートファジー誘導のための新たな作用点を見出した。また、オートファジーの後期過程の分子機構は知見が乏しいため、その点を明らかにした本研究は、基礎研究の観点から見ても新規性は大きなものである。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is bulk degradative pathway conserved in eukaryotic cell. Under starvation condition, cells degrade their own components by autophagy to supply nutritional sources for their survival. Although mechanisms of autophagosome formation had been extensively studied, termination mechanism of autophagy is poorly understood. In this study, we confirmed that autophagy is terminated in prolonged starvation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. By genetic screening, we identified responsible gene for the autophagic termination and named it Tag1. The serine residue of Atg13 which phosphorylation has a role in regulation of autophagy is re-phosphorylated in prolonged starvation, however, this process is defected in tag1 deleted mutant. We also identified Atg13 re-phosphorylation is mediated by Atg1 kinase. Thus, Tag1 terminates autophagy through Atg13 re-phosphorylation via Atg1 in prolonged starvation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に普遍的に見られる細胞内分解・リサイクルのための仕組みである。オートファジーが誘導されると、細胞内において、オートファゴソームと呼ばれる膜構造が、その形成とともに細胞内成分を包み込んで隔離する。その後オートファゴソームが消化酵素を含むオルガネラであるリソソームと融合することで細胞内成分が分解される。さらに、リソソームでの分解産物であるアミノ酸などは再利用される。

オートファジーの基礎研究は、オートファゴソームの形成に関わる遺伝子が発見されて以降、オートファゴソーム形成の仕組み、つまりオートファジーの初期過程に焦点を当てた研究が盛んに行われてきた。一方、オートファジーは分解の仕組みであるため、過剰なオートファジーによる細胞内成分の分解は、細胞にとって有害になると想定された。このため我々は、細胞には過剰なオートファジーを防ぐ制御システムがあるのではないかと考えた。

このことを調べるために、オートファジーの誘導される栄養飢餓条件において、オートファジーの活性を経時的に調べた。その結果、およそ 10 時間ほどの栄養飢餓において、オートファジーが停止した。このことから、細胞は長期の飢餓でオートファジーを停止する仕組みを備えていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

長時間飢餓におけるオートファジー終結の仕組みを明らかにすることを目的とした。そのために、この仕組みに関与する遺伝子をまず単離することを目指した。遺伝子の単離後は、その機能解析を行うことで、オートファジー終結の仕組みを調べた。

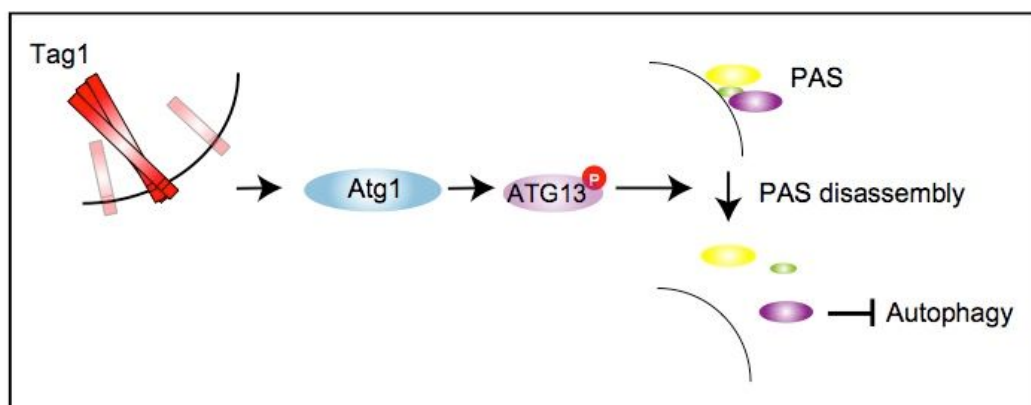
3. 研究の方法

我々はオートファジー研究で汎用される出芽酵母を用いて本研究を行った。オートファジー終結に関与する遺伝子を単離するために、酵母の遺伝子 6000 のうち、約 5000 の非必須遺伝子の破壊株ライブラリーを用い、長期飢餓におけるオートファジー活性を網羅的に調べた。その結果、オートファジーの終結に異常を示す変異体を単離することに成功した。この因子は機能未知であったため、我々は Tag1(Termination of Autophagy)と名付け解析を行った。

4. 研究成果

- (1) Tag1 は液胞膜に局在する一回膜貫通タンパク質であった。Tag1 のどのドメインがオートファジー停止に関与するか調べたところ、液胞内腔側ドメインが重要であることがわかった。
- (2) Tag1 の細胞内の発現量は栄養飢餓時に一定であるが、タンパク質合成を止めると Tag1 の発現量が減った。このことから、飢餓時における Tag1 の一定のタンパク質発現量は、合成と分解のつりあいによりもたらされていると考えられた。Tag1 を過剰発現するとオートファジーの停止が阻害されることから、Tag1 のタンパク質発現量が維持されることが、オートファジーの停止に重要であることがわかった。
- (3) オートファジーは、TORC1 プロテインキナーゼによりリン酸化された Atg13 タンパク質により抑制される。一方、TORC1 が不活性化すると、Atg13 は脱リン酸化され、これが引き金となり PAS (Pre-Autophagosomal Structure) と呼ばれる、Atg タンパク質の集積したオートファゴソーム形成の場が形成され、オートファジーが誘導される。長期飢餓において、TORC1 は一過的に不活性化した後再度活性化した。Tag1 が TORC1 の再活性化に関与するか検討したが、影響は見られなかった。次に、長期飢餓における Atg13 タンパク質のリン酸化を調べたところ、一過的な脱リン酸化の後に再リン酸化が起こった。TAG1 欠損株において、Atg13 タンパク質の再リン酸化が顕著に減少したことから、Tag1 は Atg13 の再リン酸化を担うことが分かった。PAS 形成は Atg13 のリン酸化により制御されていることが知られている。長期飢餓時に、野生株では PAS は脱凝集しているが、TAG1 欠損株においては PAS は残ったままになっていた。前述の通り Atg13 のリン酸化状態はオートファジー誘導の鍵になることから、Tag1 は Atg13 の再リン酸化を介した PAS の脱凝集によりオートファジー停止を担うと考えられた。

- (4) 次に、長期飢餓時に Atg13 の再リン酸化を担うプロテインキナーゼの同定を試みた。TORC1 は Atg13 をリン酸化することが既知であるため、候補として検討した。長期飢餓時において、TORC1 阻害剤であるラパマイシンを添加しても Atg13 の再リン酸化が見られたため、Atg13 の再リン酸化を担うのは TORC1 ではないことが示唆された。
- 次に Atg13 と物理的な相互作用が知られている Atg1 プロテインキナーゼについて検討した。ATG1 欠損株において、Atg13 の再リン酸化が見られなくなったことから、Atg1 が Atg13 の再リン酸化を担う可能性が強く示唆された。しかし、ATG1 欠損株はオートファジーが欠損するため、オートファジーの欠損が Atg13 の再リン酸化に影響した可能性が残された。この可能性を排除するため、オートファジーが起こらなくなる ATG2 欠損株を用いると、この株でも Atg13 の再リン酸化は見られたことから、ATG1 欠損株で Atg13 の再リン酸化が起こらなくなったのは、オートファジーの欠失によるものではないことが分かった。
- さらに、*in vitro* キナーゼアッセイにより Atg1 が Atg13 をリン酸化する結果が得られた。このことから、長期飢餓時に Atg13 の再リン酸化を担うのは Atg1 であることが示された。
- 以上の結果から、Tag1 は Atg1 を介した Atg13 の再リン酸化を介してオートファジーを停止していることが明らかとなった。(図)



5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

Kira S, The analysis on termination mechanism of autophagy.

18th yeast genetics meeting, 2018

吉良新太郎, オートファジー終結因子 Tag1 の解析 第 51 回酵母遺伝学フォーラム 2018 年

吉良新太郎, 長時間飢餓におけるオートファジー終結機構の解析

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年

Kira S, Analysis of termination mechanism of autophagy in yeast

8th international symposium on autophagy, 2017

吉良新太郎, 長時間飢餓時におけるオートファジー終結機構の解析

第 68 回細胞生物学会大会 2016 年

吉良新太郎, オートファジー終結因子 Tag1 の解析

第 10 回オートファジー研究会・第 4 回新学術「オートファジー」班会議、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。