

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580099

研究課題名(和文) 出芽酵母オートファジーにおける小胞輸送ネットワークおよび膜融合機構の役割

研究課題名(英文) Roles of a vesicular transport network and a membrane fusion in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

新谷 尚弘 (SHINTANI, Takahiro)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70374973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のタンパク質分泌経路を人為的に遮断すると、オートファジーが阻害されることが分かった。このことから、オートファジーに必要なオートファゴソームと呼ばれる膜構造体の形成にタンパク質分泌経路を介した膜脂質の供給が重要であることが示唆された。一方、タンパク質分泌経路に必要な複数の膜融合因子(SNARE)がオートファゴソーム形成に特異的にはたらくタンパク質Atg9と相互作用することを示し、これらの因子がオートファゴソーム形成のマシナリーとして機能している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We found that autophagy was inhibited when the secretory pathway was blocked in several SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) mutants, suggesting that a supply of membrane lipid from the secretory pathway might be important for autophagosome formation. We also showed that some SNARE proteins directly associated with Atg9, which plays roles in autophagosome formation, at preautophagosomal structure, suggesting that these proteins might function as machinery of autophagosome formation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：オートファジー SNARE 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、栄養飢餓に応答して細胞質成分を非選択的にオートファゴソーム (AP) と呼ばれる二重膜構造体が囲い込み、リソソーム・液胞へ送り分解・再利用するカタボリックな機構であり、栄養飢餓に対する生存戦略の一つである。また、細胞成分のダイナミックな再構成が必要な発生や分化にもオートファジーが必要であることが知られている。さらに、近年細胞内に蓄積した凝集体や外部より侵入した細菌などの選択的な除去にもオートファジーが必要であることが示され、神経変性疾患や感染症との関わりも指摘されている。

オートファジーの過程は(1)シグナルの感知あるいは基質の認識、(2)隔離膜の出現と伸長、(3)伸長した隔離膜の先端同士との融合による AP の形成、(4)AP のリソソーム・液胞膜との融合による内膜の放出、(5)内膜と内容物の分解というダイナミックな膜動態を伴う。現在までに、オートファジーに必須な Atg タンパク質群が多数同定されており、それらの多くは pre-autophagosomal structure (PAS) と呼ばれる前駆構造体に局在し、AP 形成に直接的に関与すると結論付けられている。しかし、AP 形成の詳細な機構は明らかではなかった。その原因として、*de novo* に形成される隔離膜・AP への膜脂質の供給源が明らかでないこと、Atg タンパク質以外のタンパク質が必要である可能性があることが挙げられた。ATG 遺伝子群は出芽酵母の遺伝学的解析により初めて同定され、後にそれらのホモログが他の真核生物から単離されて来たという背景がある。オートファジーは出芽酵母の栄養増殖には必須ではないため、その不能変異株は「飢餓条件における生存」を指標に分離された。その結果得られた *atg* 変異株は「栄養増殖は正常だが、オートファジーが 100%阻害される」という極めてクリアなオートファジー特異的な表現型を示した。このことは変異株取得戦略がいかに的確であったかを如実に表していたが、必須遺伝子変異株や弱い表現型を示す変異株を意図せず除外する結果となった。そのために、周辺膜系とオートファジーとの関連性を見出すことが困難であった。私たちは conserved oligomeric Golgi (COG) tethering complex という複合体が直接的に AP 形成に関与していることを見出した。COG 複合体はゴルジ体層板間の小胞輸送に関わる小胞繫留因子であり、ゴルジ体から生じた小胞が PAS に輸送されることを示唆している。その後、他のグループから相次いでこの結果を支持する論文が報告された。Nakatogawa らはオートファジーに必須な Atg8 がアンカーされた人工膜小胞同士が *in vitro* でドッキングすることを示し、膜小胞が融合することにより隔離膜が伸長し、最終的に二重膜構造体が出来ると推測した。さらに COG 複合体や Lynch-Day らによって発見されたオートファジー特異的

な小胞繫留因子 TRAPP III 複合体は小胞と隔離膜の融合に先立ち機能すると考えられ、AP 形成に膜融合過程が関与することが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

AP と既知の内膜系との関連性は長く不明であったが、最近になって AP はタンパク質分泌経路やエンドソーム、液胞を含む小胞輸送ネットワークの一部として形成される一過的なオルガネラであることが示唆されている。これらの内膜系は小胞輸送によって連繫されており、その連繫は小胞の出芽と膜融合を介して行われる。その延長線上にあると考えられる AP も膜融合プロセスを介して行われることが予想された。

小胞輸送における膜融合の実行分子は SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) と呼ばれる ヘリックスを含む膜タンパク質群であり、小胞上にある v-SNARE とターゲット膜上の t-SNARE の計 4 種の SNARE が ヘリックスのバンドルを形成することにより膜融合が起こる。出芽酵母には 24 種の SNARE があり、それらと Rab と呼ばれる低分子量 GTPase および小胞繫留因子の組み合わせで小胞の行き先が決定される。現在まで、AP 膜と液胞膜の融合過程には SNARE が関与していることが知られているが、AP 形成そのものに SNARE タンパク質が関わっていることは報告されていない。本研究では、(1)SNARE がオートファジーに関わっているか、(2)関わっているとすれば、どの SNARE が AP 形成のどのステップで機能しているか、(3)それらと Atg タンパク質群がどのように関連するか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)SNARE 変異株におけるオートファジーの測定

出芽酵母に存在する 24 の SNARE (Table 1) のうち、18 の SNARE の機能不全変異株を用い

Table 1. Classification of the complete set of SNARE proteins of *Saccharomyces cerevisiae*.

	Qa	Qb	Qc	R
1. Endoplasmic reticulum (ER)	Ufe1	Sce20	Use1	Sec22
2. Golgi apparatus				
ER-Golgi		Bos1	Bet1	
Intra-Golgi	Sed5	Gos1	Sft1	Ykt6
3a. trans-Golgi network	Tlg2			
3b. Endosomal compartments				
Early	Pep12		Tlg1	
Late (Vacuole)	Vam3	Vti1	Vam7	Nyv1
			Syn8	
4. Secretion	Sso1	Sec9		Snc1
	Sso2	Spo20		Snc2

て、窒素飢餓条件におけるオートファジー活性を測定した。オートファジー活性の測定には液胞への輸送シグナルを欠いたアルカリホスファターゼ Pho8 Δ 60 を用いた。使用した変異株は *ufe1-1*, *sec20-1*, *use1*, *sec22-3*, *sed5-1*, *bos1-1*, *bet1-1*, *sft1-15*, *ykt6-13*, *vti1-11*, *sec9-4* (以上は温度感受性変異株), *gos1 Δ* , *tlg2 Δ* , *pep12 Δ* , *syn8 Δ* , *nyv1 Δ* , *ssol Δ* , *sso2 Δ* (以上は遺伝子破壊株) である。

(2) SNARE の PAS への局在の生化学的解析

オートファゴソームの前駆膜構造体である PAS を単離し、それに含まれる SNARE を解析した。*atg1 Δ* 株では、Atg9 が PAS に集積することを利用して、3xHA エピトープタグを付した Atg9 を発現する *atg1 Δ* 株に GFP を融合した SNARE を個別に導入し、細胞抽出液から抗 HA 抗体でコーティングした磁気ビーズを用いて 3xHA-Atg9 を含む膜構造体を分離した。対象実験として、エピトープタグを融合していない Atg9 を発現する細胞を用いて同様の実験を行った。分離した膜構造体から、非イオン性界面活性剤 (Triton X-100)、イオン性界面活性剤 (SDS) を用いて順次タンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質をウェスタンブロット法によって解析した。

(3) SNARE と Atg9 の相互作用解析

二分子蛍光相補性試験 (BiFC)

蛍光タンパク質 Venus の N 末端領域を Atg9 に、C 末端領域を SNARE に融合し、*atg1 Δ* 株、*atg11 Δ atg17 Δ* 株に導入した。会合した Venus 断片が発する蛍光を指標とし、蛍光顕微鏡を用いて Atg9 と SNARE の相互作用およびその場所を検出した。

split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system

膜タンパク質である Atg9 と SNARE の相互作用を評価するために、MYTH システムを用いた。この方法は N 末端領域と C 末端領域に断片化したユビキチンの会合を指標としている。ユビキチン N 末端領域 (Nub) を融合した Nub-SNARE と、ユビキチン C 末端領域 (Cub) に人工転写活性化因子 PLV が融合したタンパク質 (Cub-PLV) を融合した Atg9-Cub-PLV をテスト酵母株で共発現させ、SNARE と Atg9 の間に相互作用がある場合には PLV 制御下の遺伝子が活性化される。

4 . 研究成果

(1) SNARE 変異株におけるオートファジー活性

Pho8 Δ 60 の活性化を指標としてオートファジー活性を測定したところ、*ufe1-1*以外のすべての温度感受性変異株でオートファジーに欠損があることが示された。これらの遺伝子産物の大半は初期分泌経路 (小胞体、ゴルジ体) に関わっており、生育に必須な因子であることから、膜脂質供給源としての分泌経路のインテグリティの維持がオートファジーに必要であることが考えられた。また、これらの因子のうち、オートファゴソーム形

成のマシナリーとして働いているものもあるかもしれない。SNARE 遺伝子の破壊株のオートファジー活性は維持されていたが、*gos1 Δ* , *tlg2 Δ* 株では野生株の 2/3 程度に減少していた。

(2) SNARE の PAS への局在の生化学的解析

PAS はオートファゴソームの前駆膜構造体である。従って、PAS に局在する SNARE が存在するとすれば、それはオートファジーのプロセスにおいて何らかの機能を果たしている可能性が高い。そこで、オートファジーに関わる SNARE を探索するため、PAS に局在する SNARE の生化学的手法を用いた解析を行ったところ、小胞体に局在する Ufe1、Sec20、Use1、Sec22、および膜貫通ドメインを持たない Vam7 以外は PAS 画分に検出された。さらに興味深いことに Bet1、Vti1、Tlg2、Pep12 は Atg9 と直接相互作用していることが示された。

(3) SNARE と Atg9 の相互作用解析

MYTH システムを用いて、Atg9 とゴルジ体 SNARE (Vti1、Tlg1、Tlg2) との相互作用を解析したところ、いずれの SNARE も Atg9 と相互作用していることが示唆された。これらの相互作用は BiFC 法を用いても検出された。Atg9 が PAS に集積する *atg1 Δ* 株では、上記 SNARE と Atg9 の相互作用は PAS 上で検出された。一方、PAS が形成されない *atg11 Δ atg17 Δ* 株では、これらの相互作用は trans-Golgi network で検出された。

atg1 Δ 株で Atg9 を過剰発現させると、蛍光タンパク質 Venus を融合した Vti1、Tlg1、Tlg2 の PAS への局在率が上昇した。これらの結果から、Atg9 との相互作用を介してゴルジ体 SNARE が PAS へリクルートされている可能性が示された。

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)

Kengo Suyama, Mizue Hori, Katsuya Gomi, and Takahiro Shintani, Fusion of an intact secretory protein permits a misfolded protein to exit from the endoplasmic reticulum in yeast, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014 年, 印刷中, 査読有

Wei-Pang Huang, Takahiro Shintani, and Zhiping Xie, Assays for Autophagy I: The Cvt Pathway and Nonselective Autophagy, *Methods in Molecular Biology*, 1163, 2014 年, 印刷中, 査読有

袖賀正樹、新谷尚弘、出芽酵母における選択オートファジーの新規輸送基質の発見 一粒で二度おいしい酵素たちの話、化学と生物、50 巻、2012 年、771-772、査読有

Masaki Yuga, Katsuya Gomi, Daniel J. Klionsky, and Takahiro Shintani, Aspartyl

Aminopeptidase Is Imported from the Cytoplasm to the Vacuole by Selective Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 286, 2011年, 13704-13713, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M110.173906

〔学会発表〕(計 6 件)

横田浩人、五味勝也、新谷尚弘、出芽酵母におけるリン酸飢餓誘導性オートファジーの解析、酵母遺伝学フォーラム 第 46 回研究報告会、2013年9月8-10日、仙台

横田浩人、五味勝也、新谷尚弘、出芽酵母におけるリン酸飢餓誘導性オートファジーの解析：液胞内リン酸プールとオートファジー誘導の関係、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013年3月24-27日、仙台

横田浩人、五味勝也、新谷尚弘、出芽酵母におけるリン酸代謝とオートファジーの関係性、酵母遺伝学フォーラム 第 45 回研究報告会、2012年9月4-6日、京都市

一迫直也、松浦優佳、五味勝也、新谷尚弘、ESCRT 変異によるオートファジー非依存的な液胞分解経路の活性化、酵母遺伝学フォーラム 第 45 回研究報告会、2012年9月4-6日、京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 尚弘 (TAKAHIRO, SHINTANI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70374973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

五味 勝也 (KATSUYA, GOMI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60302197