

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23657129  
 研究課題名（和文） オートファジーの「定説」への挑戦

研究課題名（英文） Challenge to dogma in autophagy

## 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）：

細胞の自己成分大規模分解機構であるオートファジーは近年急速に理解が進んだが、念入りな検証が行われないうまま流布している「定説」もある。本研究では、現在広く信じられている選択的オートファジーにおける標的認識モデルについて詳細な検討を行い、いわゆるアダプタータンパク質と LC3 の結合だけでは認識は説明できないことや、標的自身が認識対象で無い場合もあることを示した。

## 研究成果の概要（英文）：

Autophagy is intracellular bulk degradation system. While recent progress in autophagy field has expanded our knowledge of the process, there are some dogma, which are widely believed but examined well. Here, we analyzed carefully one of them, a believed model for target recognition in selective autophagy. We showed that interaction between adapter proteins and LC3 is not enough to explain the recognition and there is a case that target itself is not recognized.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

## 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、標的認識、Atg

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは全真核生物に普遍的に存在するメンブレントラフィック経路の一つで、細胞質の分子やオルガネラをオートファゴソームと呼ばれる一過性に現れるオルガネラが包み込んだ後、リソソームと融合し分解するシステムである。近年の爆発的な研究進展により、元々知られていた自己成分分解による飢餓時の栄養源確保以外に、発がん・神経変性・炎症・心不全・糖尿病等の抑制、病原体排除、抗原提示などの免疫、発生・分化、寿命延長、など予想外の機能が次々と判明し、各分野から大きな注目を集めている。

急速な分野発展のなかで、研究者の間には着実さより目新しさを求めて先走る傾向が一部に出ているが、実は既成の事実とされている説の中には真偽の不確かなものがある。

## 2. 研究の目的

念入りな検証が行われないうまま流布している「定説」の真偽を確認しないまま前進した場合、オートファジー理解の全体像の足下がすくわれる恐れもある。本研究では、現在広く信じられている 1) 選択的オートファジーにおける標的認識モデルと 2) オートファジー細胞死説について、徹底的な再検討を行

い、これらの説が曖昧な根拠を元に成立しているにもかかわらず研究の流れに大きな影響を与えている状況に挑戦することを目標とした。その成果は、当該分野にとどまらず関連する感染症、癌その他の疾患研究にも大きなインパクトを与えると考えられるからである。

#### (1) 標的認識

本来非選択的と考えられていたオートファジーも、病原細菌、ミトコンドリア、タンパク質凝集物などに対しては選択的な包み込みを行うことが分かってきた。そしてオートファゴソーム膜結合タンパク質である LC3 (哺乳類 Atg8 ホモログ) とこれらの標的にしばしば結合しているユビキチンの双方に結合するタンパク質 p62 が見つか、p62 を中心とした認識モデルが広く信じられている。すなわち、標的がユビキチン化され、それに p62 (あるいは類似の結合能を持つタンパク質) が結合し、さらに LC3 が結合することでオートファゴソーム膜が標的周囲にリクルートされるというものである。しかしこのモデルが真であることを直接示す証拠は無い。

#### (2) 細胞死

オートファジーは基本的に細胞の生存維持に働く pro-survival な機能であるが、細胞死の研究分野では古くから細胞死のひとつと認識されてきた。今でもオートファジー=細胞死と考える研究者が数多くいる。その理由は、カスパーゼ非依存性でアポトーシスとは異なる様相を示す細胞死で、顕著なオートファジー亢進を伴うものがしばしば観察されてきたからで、2 型細胞死あるいはオートファジー細胞死と呼ばれている。しかしその場合オートファジーが細胞死の原因なのか、死にかけている細胞を救おうと亢進しているのか、あるいは死ぬ前の整理事業として誘導されているのかは不明であった。遺伝子破壊等の実験からオートファジー関連タンパク質が細胞死に必要であるケースが種々報告されるようになり、オートファジーによって細胞死が起こることは間違い無いとされているが、それらの報告は全てアポトーシスの阻害など非生理的な条件下で行われており、生理的条件、特に生体内で実際にオートファジー細胞死が起こっていてそれが意味を持つという例は報告されていない。またオートファジー細胞死は、オートファジーが過剰に起こってそのために細胞成分の分解が限界を超えて起こるとまことしやかに言われているが、どこに限界があるのか、何故普段は限界を越えないのかなど疑問点が多い。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標的認識

①LC3 は選択的オートファジーの鍵を握る

のか？

LC3 より先にサルモネラの周囲に別の Atg が来るという予備的知見を得ているので、さらに解析を進め LC3 が選択的オートファジーにおける認識に中心的役割を果たしていないことを示しかつそれに代わるモデルを提示する。実験系には人工ビーズの系 (Kobayashi et al., *Autophagy*, 6, 1-10, 2010) を用いた。ポリスチレンビーズにトランスフェクション試薬をまぶし培養細胞に加えると、細胞に取り込まれた後オートファゴソームに選択的に包まれることが知られている。

②標的がユビキチン化されているのか？

病原体の場合、それ自身が標的としてユビキチン化されているのではなく、病原体を含むエンドソームの損傷が認識されているという仮説を立てた。エンドソームの薬剤による損傷や、エンドソームタンパク質のユビキチン化などを調べる。

#### (2) 細胞死

オートファジーの過剰による細胞死が起こらないようにそれを制限する機構が存在すると仮定し、酵母と哺乳類細胞でそれを担う遺伝子のスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

(1) LC3 は選択的オートファジーの鍵を握るのか？

まず Atg5-K0 や Atg7-K0 細胞など標的に LC3 がリクルートされない細胞でも、他の Atg タンパク質は全てリクルートされオートファゴソーム膜がビーズ周囲にできることを明らかにした (ただし、完全に閉じたオートファゴソームはできない)。次に主な Atg タンパク質についてビーズにリクルートされる順序をビデオ顕微鏡で検討し、LC3 のリクルートが一番最後であることを示した。最も早く現れるのは Atg5 複合体であった。Atg5 複合体のリクルートがユビキチンに依存していることを、E1 酵素阻害剤で確認した。さらに Atg 複合体がどのようにしてユビキチンを認識するのか、その分子メカニズムを明らかにした。

LC3 がリクルートされなくても他の Atg タンパク質がリクルートされ、かつオートファゴソーム膜の形成が開始されること、LC3 より先に他の Atg タンパク質がリクルートされることを明らかにしたことで LC3 が選択的オートファジーの最重要因子であるという従来の定説を完全に覆した。さらに、Atg5 複合体が最初にユビキチンを認識することや認識のメカニズムを解明し、従来説に代わって選択性を説明するモデルを提示した。

(2) 標的がユビキチン化されているのか？

人工ビーズがオートファゴソームで包まれた後、細胞を破碎しビーズを細胞分画法に

て精製したところ、LC3 などと共に多数のユビキチン化タンパク質が検出された。ビーズはサルモネラのように自己のタンパク質を持たないので、これらは宿主細胞由来のタンパク質と考えられる。実際、ビーズを包むエンドソーム膜に存在するトランスフェリン受容体を調べると、通常は起こらないユビキチン化が観察された。また、LLOMe などによってリソソームを傷つけてもユビキチン化が起こり、ユビキチン化されたリソソームのみがオートファジーの標的となった。従って、選択性を規定するユビキチン化はこれまで考えられていたように病原体で起こる必要は無く、むしろ病原体を包むエンドソーム膜が傷ついたときにそこで起こることを示した。

### (3) 細胞死

過剰なオートファジーが起こる遺伝子変異スクリーニングを酵母で行ったが、それによって死に至るような変異は見いだせなかった。哺乳類で我々が同定したオートファジーの負の制御因子 Rubicon の KO 細胞を作成した。オートファジーが常に亢進している状態になったが、細胞の生存には影響しなかった。現在 KO マウスを作成し、in vivo での影響を検討している。

### 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. 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. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A\*, Yoshimori T\*. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 495(7441), 389-393. (2013) 査読有
3. 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(3), 303-316. (2013) 査読有
4. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y, Murakami Y, Maeda Y, Yoshimori T, Matsumoto S, Kobayashi K, Kinoshita T, Morita YS. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio*. 4(1):e00472-12. (2013) 査読有
5. Kim HJ, Zhong Q, Sheng ZH, Yoshimori T, Liang C, Jung JU. Beclin-1-interacting autophagy protein Atg14L targets the SNARE-associated protein Snapin to coordinate endocytic trafficking. *J Cell Sci*. 125(Pt 20), 4740-4750. (2012) 査読有
6. Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. *PLoS One*. 7(10):e47126. (2012) 査読有
7. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 131(3), 548-557. (2012) 査読有
8. Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmle M, Tomonaga K. Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe*. 11(5), 492-503. (2012) 査読有
9. Kim JJ, Lee HM, Shin DM, Kim W, Yuk JM, Jin HS, Lee SH, Cha GH, Kim JM, Lee ZW, Shin SJ, Yoo H, Park YK, Park JB, Chung J, Yoshimori T, Jo EK. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell Host Microbe*. 11(5), 457-468. (2012) 査読有

10. Raju D, Hussey S, Ang M, Terebiznik MR, Sibony M, Galindo-Mata E, Gupta V, Blanke SR, Delgado A, Romero-Gallo J, Ramjeet MS, Mascarenhas H, Peek RM, Correa P, Streutker C, Hold G, Kunstmann E, Yoshimori T, Silverberg MS, Girardin SE, Philpott DJ, El Omar E, Jones NL. Vacuolating Cytotoxin and Variants in Atg16L1 That Disrupt Autophagy Promote Helicobacter pylori Infection in Humans. *Gastroenterology*. 142(5), 1160-1171. (2012) 査読有
11. Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H\*, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y\*, Rakugi H. Autophagy guards against Cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol*. 180(2), 517-525. (2012) 査読有
12. Ishibashi K, Fujita N, Kanno E, Omori H, Yoshimori T, Itoh T, Fukuda M\*. Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy*. 7(12), 1500-1513. (2011) 査読有
13. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y\*. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol*. 85(24), 13185-13194. (2011) 査読有
14. 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(8), 1042-1052. (2011) 査読有
15. 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
16. Tachiyama R, Ishikawa D, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M, Tanaka Y, Fujita H\*. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells*. 16, 448-466. (2011) 査読有
- [学会発表] (計 25 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)
- [図書] (計 2 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)
- [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) 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