

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 4月 1日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770216

研究課題名（和文） オートファジーに関与する新たな膜輸送経路の探索

研究課題名（英文） Search for novel membrane trafficking pathway involved in autophagy

研究代表者

伊藤 敬 (Takashi Itoh)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：50373270

研究成果の概要（和文）：

細胞内自食作用であるオートファジーは、オートファゴソームという特殊なオルガネラを形成するダイナミックな膜の動態を示すが、その膜動態の制御メカニズムの詳細はまだ明らかになっていない部分が多い。本研究課題では、細胞内膜輸送を制御する低分子量 G タンパク質 Rab とその不活性化因子である Rab-GAP に着目することで、オートファジーにおける膜動態制御の分子メカニズムを解明することを目的とした。実際には、オートファゴソームへの局在を指標にした Rab-GAP の網羅的なスクリーニングの結果得られた候補、OATL1/TBC1D25, TBC1D2B, TBC1D11 のオートファジーにおける役割の同定を試みた。3 者ともオートファゴソーム局在タンパク質である LC3 と結合することを見だし、TBC1D2B においては LC3 との結合に必須なアミノ酸を同定した。先行して研究を進めていた OATL1 は過剰発現においてオートファゴソームの成熟過程であるオートファゴソームとリソソームの融合を阻害したため同様の表現型を期待したが、他の Rab-GAP では過剰発現のオートファジーへの影響は見られなかった。現在までの結果は、当初期待していた Rab-GAP のオートファジーへの関与を明らかにするものではなかったが、逆に LC3 ファミリータンパク質が Rab 不活性化因子の膜局在の足場になることで膜輸送に関与するという LC3 ファミリータンパク質のオートファジー以外の機能を明らかにする足がかりになるものだと考えている。

研究成果の概要（英文）：

Macroautophagy (referred to as autophagy hereafter) accompanies dynamic membrane remodeling such as autophagosome formation and fusion between autophagosome and lysosome. However, the regulation of such membrane remodeling is largely unknown. Since I had identified three Rab-GAPs, inactivators of Rab-type small GTPases, as autophagosome resident proteins, here I addressed the function of these Rab-GAPs (OATL1/TBC1D25, TBC1D2B, TBC1D11) in autophagy. They were localized at autophagosomes and bound with LC3, an autophagosome resident protein used as a marker of autophagosome. TBC1D2B and TBC1D25 required the interaction with LC3 for their localization at autophagosomes, since a point mutation that abolished the interaction impaired their localization. Although I previously revealed that overexpression of TBC1D25 inhibits fusion between autophagosomes and lysosomes, overexpression of TBC1D2B nor TBC1D11 did not inhibit any process of autophagy. These results so far did not clarify relationship between these Rab-GAPs and autophagy. However, I suppose that it is possible that LC3 acts as a scaffold for Rab-GAPs and has a role in membrane trafficking in addition to in autophagy.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：タンパク質分解、膜輸送

1. 研究開始当初の背景

オートファジー（細胞内自食作用）は真核生物に広く保存された選択性のない細胞内タンパク質分解メカニズムである。高等真核生物であるほ乳動物においては、オートファジーは発生、抗原提示、細胞死、感染菌の駆除などの、高次機能に関わっていることが示されており、ほ乳動物のオートファジーの分子メカニズムの解明は基礎生物学のみならず医学的にも注目が集まっている。

ほ乳動物におけるオートファジーはオートファゴソームと呼ばれる特徴的なオルガネラの形成が行われるが、オートファゴソーム形成には非常にダイナミックな膜の挙動を伴う（図1）。

初めに隔離膜と呼ばれる膜構造が伸長し、細胞質を包み込んだオートファゴソームと呼

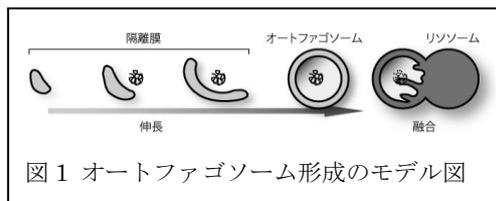


図1 オートファゴソーム形成のモデル図

ばれる二重膜構造を持つ小胞を形成する。オートファゴソーム中に隔離されたタンパク質、オルガネラ等はオートファゴソームとリソソームとの融合により分解され、生体物質のターンオーバーが行なわれる。オートファゴソーム形成は常にある程度のレベルで行なわれているが、アミノ酸飢餓や細菌の感染によって誘導される。オートファジーに必要な遺伝子として、ATG 遺伝子群が同定されているが、Atg タンパク質には既知の膜輸送制御因子（Rab や SNARE など）が含まれておらず、オートファゴソーム形成における膜輸送機構は現在でも多くの部分が未解明である。

2. 研究の目的

Rab 型低分子量 G タンパク質はオルガネラ間の膜輸送におけるスイッチ分子として、小胞の形成、輸送、繫留、融合の過程を制御している。他の低分子量 G タンパク質と同様、活性化因子として GEF (Guanine nucleotide

Exchange Factor)が、不活性化因子として GAP (GTPase Activating Protein)が存在する。申請者は Rab-GAP として機能する TBC ドメインを含むタンパク質 (TBC タンパク質) の網羅的な解析の過程で、いくつかの TBC タンパク質がオートファゴソームもしくは隔離膜に局在する事を見いだした。オートファゴソーム形成における膜輸送メカニズムは未解明な部分が多いため、これら TBC タンパク質の機能解析により、オートファゴソーム形成における膜輸送機構の解明につながる事が考えられた。そこで本申請では、他と比べてより明確なオートファゴソーム/隔離膜局在を示した、TBC1D2B, TBC1D11 のオートファジーへの関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) 局在解析

EGFP を融合した TBC タンパク質を発現するベクターを構築、MEF 細胞に導入した。飢餓処理後、細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、オートファゴソームタンパク質である LC3、隔離膜タンパク質である Atg16L1 への特異的抗体で染色を行なった。そして共焦点顕微鏡にて観察を行ない、Rab-GAP の詳細な局在解析を行なった。

(2) 結合実験

in vitro 結合実験では、GST タグが融合した LC3, GABARAP, GATE-16 を大腸菌に発現、精製したタンパク質と、T7 タグが融合した TBC タンパク質を COS-7 細胞に発現させ、その細胞抽出液を用いた。細胞抽出液と精製タンパク質を混合し、グルタチオンセファロースビーズを用いて GST-LC3, -GABARAP, -GATE-16 を沈降させた際、TBC タンパク質が共沈降するかどうかを調べることで結合を確認した。

(3) オートファジー活性の評価

TBC タンパク質の野生型もしくは変異体 (LC3 との結合不全変異体、GAP 活性不全変異体)を恒常的に過剰発現させた MEF 細胞と、そのコントロール細胞を、飢餓処理もしくは飢餓処理に続いて栄養十分な環境に戻す処理を行った。それらの処理を行なった細胞を、

パラフォルムアルデヒドで固定し、LC3 への特異的抗体で染色を行う。LC3 陽性のオルガネラ（オートファゴソーム）の細胞当たりの数を数える、もしくは破碎し、その細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行なうことで、脂質化された LC3 の量を定量する。といった方法でオートファジー活性を評価した。

(4) in vitro GAP assay

大腸菌用発現ベクターに Rab 遺伝子を導入したベクターを構築。Rab タンパク質を大腸菌から精製して用いた。TBC タンパク質は COS-7 細胞に発現させたものを精製して用いた。Rab タンパク質に放射性ラベルされた GTP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$) を結合させ、その後 TBC タンパク質と反応させた。反応後の GTP/GDP の量比を TLC 展開を行なうことで定量し、GAP 活性の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) 局在化機構の解明

隔離膜局在タンパク質である Atg16L1 と隔離膜、オートファゴソーム局在タンパク質である LC3、それぞれと TBC タンパク質との局在を詳細に比較した。TBC1D2B は LC3 とほぼ全てのドットにおいて共局在を示し、TBC1D2B のドットは Atg16L1 のドットよりも数多く存在した。逆に TBC1D11 は Atg16L1 とはほぼ全てのドットにおいて共局在を示したが、TBC1D11 のドットは LC3 のドットよりも少なく、LC3 陽性ドットの一部のみと共局在を示した。これらのことは、TBC1D2B は隔離膜からオートファゴソームまで局在し、TBC1D11 は隔離膜にのみ局在している事を示していると考えている。

(2) LC3 ファミリータンパク質との結合解析

オートファゴソーム局在を示す TBC タンパク質である OATL1 は LC3, GABARAP, GATE-16 といった酵母 Atg8 のホモログと結合し、その結合依存的にオートファゴソームに局在することを申請者は以前明らかにしている。そこで、TBC1D2B や TBC1D11 が Atg8 ファミリータンパク質と結合を示すかどうか検証したところ、TBC1D2B も TBC1D11 も LC3, GABARAP, GATE-16 のいずれにかは結合するという結果が得られた。また TBC1D2B においては、結合

に必要なアミノ酸を同定し、そのアミノ酸を置換した変異体ではオートファゴソーム局在を示さなくなる事を確認した。つまり TBC1D2B は Atg8 ファミリータンパク質との結合依存的にオートファゴソーム局在を示す事が明らかとなった。TBC1D11 にはその一次配列からは明確な結合モチーフが見つからなかったため、部分欠損変異体を作成し結合領域を同定したところ、TBC1D11 の N 末側が Atg8 ファミリータンパク質との結合に必須である事が明らかになった。現在のところ結合に必須なアミノ酸の同定までには至っていない。

(3) TBC1D2B, TBC1D11 のオートファジーにおける役割

OATL1 は過剰発現においてオートファジーを誘導した際のオートファゴソーム数の増加、またオートファジーの抑制を行なった際のオートファゴソームの消失に遅延が起ることを申請者は明らかにしている。同様の実験によって TBC1D2B, TBC1D11 の効果を調べたが、オートファゴソーム形成、成熟のどの過程にも影響がないようであった。また、TBC ドメインの活性中心に変異を導入し、Rab-GAP 活性を持たないと考えられる変異体の過剰発現においても、顕著な表現型は得られなかった。

残念ながら本課題期間中には、TBC1D2B や TBC1D11 のオートファジーにおける役割を明らかにするまでにはいたらなかった。今後、ノックダウンによる発現抑制を行なった際にオートファジーにどのような影響があるのか、TBC1D11 がどのように隔離膜のみに局在するのか、などを明らかにする事によって、詳細なモデルをたてられると考えている。また、GABARAP, GATE-16 はオートファジーとは関係のない膜輸送制御に関わっている報告もあるため、TBC1D2B や TBC1D11 の Atg8 ファミリータンパク質との結合はオートファジーではなく、他の膜輸送制御で機能を発揮している可能性も視野にいれ、今後の研究を行っていく必要もあると考えている。

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 4 件)

1. Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshihara, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., Oka, T., Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K., and Ishihara, N. Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 126:176-185. 2012. doi: 10.1242/jcs.111211 (査読あり)
2. Ishibashi, K., Fujita, N., Kanno, E., Omori, H., Yoshimori, T., Itoh, T. and Fukuda, M. Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy* 7:1500-1513. 2011. doi: 10.4161/auto.7.12.18025 (査読あり)
3. Matsui, T., Itoh, T., and Fukuda, M. Small GTPase Rab12 regulates constitutive degradation of transferrin receptor. *Traffic* 12:1432-1443. 2011. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01240.x (査読あり)
4. Itoh, T. and Fukuda, M. A possible role of Atg8 homologs as a scaffold for signal transduction. *Autophagy* 7:1080-1081. 2011. doi: 10.1126/science.1214081 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. Itoh, T., Fujita, N., Saitoh, T., Komatsu, M, Akira, S., Yoshimori, T., and Fukuda, M. A possible regulation of Rab33B-dependent membrane trafficking by the Atg12-5/16L1 complex. 第 34 回 日本分子生物学会年会 (福岡) 2012. 12. 13
2. 伊藤 敬 「オートファジーに関わる Rab 不活性化因子の探索」メンブレントラフィックのささやかな集い (東北大加齢研) 2011. 11. 18
3. Itoh, T. Functional Analysis of Rab33B in Autophagy. 3rd UCL-Tohoku Univ. Symposium (London, UK) 2011. 10. 19

[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]
 なし

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 伊藤 敬 (Takashi Itoh)
 東北大学・大学院生命科学研究所・助教
 研究者番号：50373270

(2) 研究分担者
 なし

(3) 連携研究者
 なし