

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657089

研究課題名(和文)オートファジー活性の定量化を可能にするTRAP法の開発

研究課題名(英文)Development of Novel monitoring method of autophagy

研究代表者

野田 健司(Noda, Takeshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00290908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞が自らの一部分を分解しその分解産物を自己の構成成分として再利用するプロセスである。オートファジーは栄養飢餓などにより誘導され漸次的に進行し最終的に停止する。この過程の進行度合いを検出するための方法として、私は以前酵母細胞においてALP法を開発し、それは現在広く用いられている。今回哺乳類細胞でもALP法に相当する定量的なオートファジー解析法を開発を試みた。酸性ホスファターゼの構造を改変しオートファジーの誘導に連動して、活性が現れるものを作るべく多くの試みを行ったが、最終的に成功例が得られなかった。一方で、その間ALP法をゲノムワイドに展開する方法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a process that the cell degrades its own components and reutilize the m. Several environmental stress such as starvation induces autophagy and proceeds gradually and finally it is terminated. As the method for monitoring autophagy, I previously developed ALP assay in the yeast and the methods is still widely used. ALP assay enables quantitative measurement of autophagy based on the enzymatic activity of alkaline phosphatase. This time, I tried to developed similar method to ALP assay in mammalian cells. I generated various version of acid phosphatase to test if their activity is correlated with the progression of autophagy, but finally successful one could not be obtained. On the other hand, we succeeded in the development of genome wide ALP assay.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞が自らの一部分を分解しその分解産物を自己の構成成分として再利用するプロセスである。オートファジーは栄養飢餓などにより誘導され漸次的に進行し最終的に停止する。この過程の進行度合いを検出するための方法として、私は以前酵母細胞において ALP 法を開発し、それは現在広く用いられている。

## 2. 研究の目的

一方哺乳類細胞において、オートファジーを定性的や半定量的にその活性を検出する軽は存在するが、定量的に簡便に検出する軽は未だ存在しない。そこで今回哺乳類細胞でも ALP 法に相当する定量的なオートファジー解析法を開発を試みた。また ALP 法をゲノムワイドで展開する方法の開発も試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 酸性ホスファターゼ遺伝子に改変を施した。特に細胞質で安定して発現するため、シグナルシーケンスを切断することや、GFP タグを付加することなど様々な改変を施した。それらを HeLa 細胞や A293 細胞等様々な法入類培養細胞へ導入し、発現を確認した。飢餓やラパマイシン処理などでオートファジーを誘導し、細胞を破碎し酸性ホスファターゼの酵素活性を測定した。バフィロマイシンやロイペプチン等のオートファジーの阻害剤処理を行い、その活性を比較した。

(2) ALP 法はこれまで、個別の細胞株を液体で培養し、それぞれの ALP 活性を測定するという方式で行われていたのを、大規模変異株コレクションに対応させるため、固形培地の上で培養し、それをタイタープレート中で飢餓処理などをし、さらに ALP 活性もタイ

タープレート中で測定する方法を考案した。

## 4. 研究成果

(1) 様々な酸性ホスファターゼを構築し、HeLa 細胞や A293 細胞等様々な法入類培養細胞へ導入した。しかしながら飢餓やラパマイシン処理などでオートファジーを誘導し、細胞を破碎し酸性ホスファターゼの酵素活性を測定したところ、バフィロマイシンやロイペプチン等のオートファジーの阻害剤処理で、オートファジー依存に活性上昇が得られるものをは得られなかった。

(2) 酵母ゲノムワイド非必須遺伝子破壊株ライブラリーや必須遺伝子発現低下ライブラリーへ、ALP 法のマーカー遺伝子である PHO 8 D60 遺伝子を導入するため、SGA 法を応用した。SGA 法はさまざまな栄養要求性マーカーを用いることにより、目的変異株のゲノム中へ目的の遺伝子を組み込ませることが出来る方法である。このことにより ALP 法を行うことができる株のゲノムワイドコレクションを作成することに成功した。このコレクションを YPD プレート上で培養し、窒素源飢餓の液体培地を含むマイクロタイタープレート中で培養した。細胞を遠心により分離し、破碎バッファーと粉末ジルコニウムを加え、攪拌することで細胞を破碎した。遠心した上清を ALP アッセイとタンパク質量へと用いた。その結果、既知のオートファジー欠損変異株 ATG 変異株が、5000 種の変異株の中でもほぼ全てが上位 50 位以内の低いオートファジー活性を示すことが明らかとなり、ゲノムワイド ALP 法の確立に成功した。

この方法を用いて、オートファジー活性が低下した変異株について解析をおこなったところ、TRAPP1 III の変異株ではオートファジー活性が低下しており、その原因として、それがメンブレントラフィックに機能してお

り、オートファジーに必要なタンパク質 Atg 9 の輸送が出来なくなるためであることを明らかにした。

#### 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 3 件 )

TRAPPIII is responsible for the vesicular transport from early endosomes to the Golgi apparatus that facilitates Atg9 cycling in autophagy.

Shirahama-Noda K, Kira S, Yoshimori T, Noda T

Journal of Cell Science 126 4963-4973

Fujita N, Morita E, (equally contributed) Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T\*, Yoshimori T\* Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. The Journal of Cell Biology 203(1) 115-128. 2013

Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T\* Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. EMBO journal 2336-2347, 2013

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

TRAPPIII is responsible for the vesicular transport from early endosomes to the Golgi apparatus that facilitates Atg9

cycling in autophagy.

Shirahama-Noda K, Kira S, Yoshimori T, Noda T

Gordon research conference molecular membrane biology 2013 7月

アメリカ ニューハンプシャー Proctor Academy Andover,

T NODA Regulatory Mechanism of Autophagy in yeast 3rd China-Japan symposium on autophagy Oct 14-18 2013 Dunhuang China

野口雅史、吉良新太郎、吉森保、野田健司 : 長時間飢餓条件下におけるオートファジー停止機構の研究 第 36 回 日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸

野田健司 : TRAPPIII is responsible for vesicular transport from early endosomes to Golgi, facilitating Atg9 cycling in autophagy 第 7 回オートファジー研究会 Dec 19-21 2013 掛川

吉良新太郎、田端桂介、吉森保、野田健司 : オートファジーと TORC1 キナーゼの制御機構における Npr2 の役割 第 65 回 日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19 日、名古屋

T NODA: Critical role of PtdIns3P turn over in autophagy regulation The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan March 29<sup>th</sup>, 2013 , Tower Hall Funahori, Tokyo

[ その他 ]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~cfos/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

野田健司 (Noda Takeshi )

大阪大学 大学院歯学研究科 教授

研究者番号 :

00290908