

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770182

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるオートファジー膜動態の分子機構

研究課題名(英文) Proteomic analyses of autophagy-related structures in yeast

研究代表者

山本 林 (YAMAMOTO, Hayashi)

東京工業大学・フロンティア研究機構・特任助教

研究者番号：80551283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは真核生物が備えるタンパク質分解機構の1つであり、オートファゴソームの新生を伴う動的な膜動態から成り立っている。本研究では、オートファゴソーム膜およびオートファジー関連膜構造体Atg9ベシクルの単離・精製を行い、それぞれの膜に含まれるタンパク質群のプロテオーム解析を行った。その結果、Atg9ベシクル・オートファゴソーム膜の両者にゴルジ体由来の膜繫留装置であるTRAPPIII複合体および下流因子Ypt1が含まれることを見出した。また、オートファゴソーム膜特異的因子として小胞体・ゴルジ体由来の因子が複数同定され、これらのオルガネラのオートファゴソーム形成への寄与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a conserved degradation process, wherein autophagosomes are generated by cooperative actions of multiple autophagy-related (Atg) proteins. Previous studies using yeast *Saccharomyces cerevisiae* have provided various insights into the molecular basis of autophagy, however, the most intriguing issues in autophagy, namely, the origin of the autophagosomal membranes, remain to be elucidated. In this study, we succeeded to purify the autophagosomal membranes and the Atg9 vesicles, one of the autophagy-related membranes, and subjected them to proteomic analyses. These analyses showed that both the Atg9 vesicles and the autophagosomal membranes contain the TRAPPIII complex and its downstream factor Ypt1. Furthermore, we found that the Atg9 vesicles become part of the autophagosomal membranes, thereby recruiting the TRAPPIII complex and Ypt1 onto the autophagosomal membranes.

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 オートファゴソーム 出芽酵母 膜動態 膜小胞 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物が普遍的に備えるタンパク質分解機構の1つであり、特異な二重膜構造体「オートファゴソーム」の新生を伴う非常にダイナミックな膜動態から成り立っている。オートファジーの研究は出芽酵母を用いたオートファジー不能変異株の解析を機に大きく進展し、多くのオートファジー関連因子 Atg (autophagy-related) の同定および機能解析が進められてきた。Atg タンパク質群は飢餓シグナルにตอบสนองして液胞近傍に局在し、PAS (pre-autophagosomal structure) と呼ばれる「オートファゴソーム形成の足場」を構築する。Atg タンパク質群の PAS への局在には階層性があり、細胞が飢餓を感じると、まず最初に PAS の基盤となる Atg1 キナーゼ複合体が形成され、次いで機能未知の膜タンパク質 Atg9 が集積する。さらに、Atg14 を含む PI 3-kinase 複合体、Atg18-Atg2 複合体、Atg12-Atg5 複合体、Atg8 などが集積し、これらが時空間的に協調的に働くことでオートファゴソームを形成する。このように個々の因子の部分的な機能や、PAS への局在機構が明らかとなる一方で、オートファゴソーム膜を構成する脂質分子の供給経路や膜融合の分子機構など、膜動態に直接迫るような知見はほとんど報告されていない。必須 Atg タンパク質の中で唯一の膜タンパク質である Atg9 は、その大部分が細胞質に点在するドット状の構造として局在することが報告されており、オートファゴソーム形成時における脂質供給源の1つと期待されているが、実験的な証拠は全く得られておらず、Atg9 ドット構造体の大きさやタンパク質組成なども不明のままである。また、我々は、Atg9 が Atg1 によって飢餓依存的にリン酸化されることを見出している。Atg1 のキナーゼ活性欠損株では、Atg9 ベシクルの PAS への集積は観察されるが、PAS における膜融合反応が起こらないことから、Atg1 による Atg9 のリン酸化がオートファゴソーム膜の融合・伸張過程に直接関わる可能性が強く示唆される。オートファジーの膜動態解明には Atg9 ドット構造体の実体解明が不可欠であり、その機能解析およびオートファゴソーム膜との関係性の解明が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、オートファゴソーム膜の融合・伸長反応に必須の役割を果たしている Atg9 ドット構造体 (以下、Atg9 ベシクル) の実体を明らかにするため、Atg9 ベシクルの形態学的観察を進めると共に、Atg9 ベシクルを生化学的に単離・精製し、プロテオーム・リビドーム解析によりタンパク質・脂質の組成を明らかにする。同様に、オートファゴソーム膜 (実際には伸長途中の隔離膜) の単離・精製およびプロテオーム解析を行い、Atg9 ベシクルの組成とオートファゴソーム膜の組成を比較することで、Atg9 ベシクル以外のタンパ

ク質・脂質供給源について考察する。また、Atg9 のリン酸化部位の同定を行い、変異導入による表現型の解析から、Atg9 のリン酸化の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

オートファジーの膜動態を理解するためには、Atg9 ベシクルの実体解明が不可欠である。本研究ではまず最初に、蛍光顕微鏡観察や電子顕微鏡観察などの形態学的解析から Atg9 ベシクルの細胞内動態について解析を行った。次に、Atg9 ベシクルの単離・精製を行い、共在タンパク質について情報を取得した。また、オートファゴソーム膜の単離・精製も同様の方法で行い、Atg9 ベシクルと組成比較を行い、オートファゴソーム膜特異的な因子を同定した。最後に、Atg9 のリン酸化部位を同定し、これらの部位に変異を導入することで、Atg9 ベシクルの膜融合反応の成否について解析を行った。

(1) Atg9 ベシクルの形態学的解析

高感度蛍光顕微鏡解析により Atg9 ベシクル (Atg9-2xGFP) の細胞内動態について1粒子軌道解析を行い、市販の蛍光ビーズの拡散係数と比較することで大きさの見積もりを行った。また、Atg9-6xFLAG 株を用いて Atg9 ベシクルを単離・精製し、電子顕微鏡観察および動的散乱解析で形態解析を行った。同時に、生化学的手法を用いて Atg9 の挙動変化を追跡し、オートファゴソームが蓄積する変異株 *ypt7* およびオートファゴソームが形成されない変異株 *atg11 atg17* を比較することで、Atg9 ベシクルとオートファゴソーム膜の相互作用について解析を行った。

(2) Atg9 ベシクルのプロテオーム解析・リビドーム解析

Atg9 ベシクルの単離・精製は、Atg9-6xFLAG と Atg9-3xBAP (biotinylated-tag) の共発現株を用いた二段階精製で行った。このとき、オートファゴソーム形成が進行しない条件として *atg11 atg17* 変異株を用いた。一段階目は anti-FLAG magnetic beads を用いて Atg9-6xFLAG を介した精製を行い、3xFLAG peptide で溶出後、streptavidin-Dynabeads で二段階目の精製を行った。精製後の溶出は 1% Triton X-100 での可溶化と、SDS-PAGE sample buffer での変性溶出の二種類で行い、それぞれ高感度質量分析に供して共在タンパク質の解析を行った。得られた候補の中から、膜繫留・膜融合に関係する因子を選択し、自身の PAS 局在や Atg9 ベシクルの PAS 局在について解析を行った。また、下流因子の集積状況を観察することで、オートファゴソーム形成への関与について解析を行った。

(3) オートファゴソーム膜のプロテオーム解析・リビドーム解析

オートファゴソーム膜の単離・精製は、Atg9-6xFLAG と 3xBAP-Atg8 の共発現株を用いた二段階精製で行った。このとき、オートファゴソーム膜が有意に蓄積する条件として

APE1 過剰発現株を用いた。一段階目は anti-FLAG magnetic beads を用いて Atg9-6xFLAG を介した精製を行い、3xFLAG peptide で溶出後、streptavidin-Dynabeads で二段階目の精製を行った。精製後の溶出は 1% Triton X-100 での可溶化と、SDS-PAGE sample buffer での変性溶出の二種類で行い、それぞれ高感度質量分析に供して共在タンパク質の解析を行った。得られた候補の中について、Atg9 ベシクル由来の因子と由来未知の因子に分けて機能解析を行った。

(4) Atg9 のリン酸化部位の同定と変異解析
Atg9 のリン酸化部位を同定するため、高濃度の phosphatase 阻害剤存在下、Triton X-100 で Atg9-3xStrep を可溶化し、StrepTactin beads を用いて精製を行った。このとき、Atg1 不活性変異体をコントロールとして用いた。得られた精製標品について Orbitrap フーリエ変換質量分析計を用いてリン酸化解析を行った。同定されたリン酸化部位に変異を導入し、Atg9 ベシクルの PAS への局在化やオートファゴソーム膜の伸長反応について蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、動的光散乱、生化学的手法で解析を行った。

4. 研究成果

(1) Atg9 ベシクルの形態学的解析
Atg9-2xGFP の蛍光顕微鏡観察の結果から、出芽酵母細胞には 50 個程度の Atg9 ベシクルが存在し、それらが細胞質中をブラウン運動していること、飢餓誘導によってその数が増加すること、ゴルジ体由来の構造体であることなどを見出した。また、1 粒子軌道解析から細胞質中での拡散係数の見積もりを行い、Atg9 ベシクルの大きさが 50 nm 程度であることを見出した。形態観察をさらに進めるため、Atg9 ベシクルを単離・精製し、動的光散乱解析を行ったところ、1 粒子軌道解析と同様に 50 nm 程度の大きさで見積もられた。また、電子顕微鏡観察において、Atg9 ベシクルが直径 50 nm 程度の単膜ベシクルとして捉えられ、これらの結果を合わせて「Atg9 ベシクルは直径 50 nm 程度のゴルジ体由来単膜ベシクルである」と結論づけた。さらに、蛍光顕微鏡観察により、Atg9 ベシクルが飢餓に応じて PAS に集積し、最終的にオートファゴソーム膜と共局在することを見出した。これらの結果について生化学的手法を用いて詳細に解析するため、飢餓誘導後の酵母細胞を破碎し、オートファゴソームを単離・精製したところ、Atg9 がオートファゴソーム膜にアンカーしていることが見出され、これらの結果から、「オートファゴソーム形成過程において、PAS に集積した Atg9 ベシクル自身が融合することでオートファゴソーム膜の一部になる」と結論づけた。このことは、Atg9 ベシクルがオートファゴソーム形成に必要な脂質供給源の 1 つであることを示している。また、蛍光観察時の FRAP 解析の結果から、Atg9 ベシクルがオートファゴソーム形成の初期ステップで機能していることが見出され、さら

に、Atg9 ベシクルによる脂質供給だけではオートファゴソーム形成に必要な脂質量に満たないこと、つまり、Atg9 ベシクル以外にも脂質供給源が存在することを示唆する重要な知見が得られた。以上の解析により、Atg9 ベシクルはオートファジーの誘導（栄養飢餓）に伴って液胞近傍の PAS に集積し、最終的にオートファゴソーム膜の一部になることが明らかとなり、これらの成果については、*J. Cell Biol.* 誌に報告掲載された (*J. Cell Biol.*, 198, 219-233, 2012)。

(2) Atg9 ベシクルのプロテオーム解析・リピドーム解析

単離・精製した Atg9 ベシクルのプロテオーム解析の結果、Atg9 ベシクルにはゴルジ体由来の他の分泌ベシクルに見られるようなタンパク質群がほとんど見られず、Atg9 および Atg27 が主要構成因子であることが明らかとなった。このことは Atg9 ベシクルが他の分泌ベシクルと異なり、オートファゴソーム形成に特化した機能を持つことを示唆している。さらに、Atg9 ベシクル特異的な構成因子として Trs85 および Ypt1 の同定に成功した。Trs85 は膜繫留に關与する TRAPPII 複合体の構成因子、Ypt1 はその下流因子として機能する Rab タンパク質であり、これらの因子がオートファゴソーム形成の後期ステップに關与し、下流の PI 3-kinase 複合体の PAS への集積過程に關与することを明らかにした。これらの成果については、*J. Biol. Chem.* 誌に報告掲載された (*J. Biol. Chem.*, 287, 44261-44269, 2012)、Atg9 ベシクルのリピドーム解析からは、その由来を特定するような特徴的な脂質組成は得られなかった。

(3) オートファゴソーム膜のプロテオーム解析・リピドーム解析

単離・精製したオートファゴソーム膜のプロテオーム解析の結果、Atg9 ベシクルと同様、Trs85 および Ypt1 が共在タンパク質として同定された。Trs85 および Ypt1 の変異体ではオートファゴソーム形成能が著しく下がることから、これらの因子を介した膜繫留・膜融合がオートファゴソーム形成に關与すること可能性が強く示唆され、Atg9 ベシクル経由でのリクルートがこれらの反応に必須であると考えられる。さらに、Trs85 および Ypt1 以外に、オートファゴソーム膜特異的な因子を複数同定することに成功している。これらの多くは小胞体およびゴルジ体由来のタンパク質（一部は細胞質タンパク質）であり、膜輸送に關連する機能を持っていることが見出された。それぞれの因子がオートファゴソーム形成のどのステップに關与するのか蛍光顕微鏡観察および生化学的解析を行い、その結果、これらの因子が各機能ごとに相互作用することでオートファゴソーム形成に關与することが明らかとなった。これらの成果については現在投稿準備中である。

(4) Atg9 のリン酸化部位の同定と変異解析
Atg9-3xStrep を飢餓誘導した細胞から精製

し、リン酸化部位の同定を行ったところ、Atg9のN末端領域およびC末端領域にリン酸化部位が集中的に検出された。また、これらのリン酸化の多くがAtg1のキナーゼ活性およびPAS形成に依存することを見出した。これらの結果は、Atg9がAtg1によって直接リン酸化されることを強く示唆している。Atg9のリン酸化部位については、本研究の解析中に海外グループから報告があったが、我々の解析では、これら既知のリン酸化部位以外に新規のリン酸化部位が複数同定されたため（海外グループの解析では、phosphatase阻害剤の濃度が低いという問題があった）、各ドメインごとにリン酸化変異体（AlaおよびAsp）を作製し、オートファゴソーム形成のどのステップが阻害されるか解析を行った。その結果、Atg9のN末端領域はAtg9ベシクルのPASへの集積過程に部分的に関与し、一方、C末端領域はAtg9の下流因子の集積過程に関与することが明らかとなった。また、これらのリン酸化がAtg9ベシクル自身の融合反応に関与することを示唆するような結果は、*in vitro*での膜融合過程の解析からは見出されなかったことから、Atg9のリン酸化は主に下流因子のPASへのリクルートに関与すると考えられる。これらの結果は、上記のオートファゴソーム膜のプロテオーム解析の結果と緊密に関係する内容であったため、これらと合わせて論文にまとめており、現在投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Fujioka, Y.* , Suzuki, S.W.* , Yamamoto, H.*, Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. *These authors contributed equally to this work. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 査読有, in press, 2014, DOI: 10.1038/nsmb.2822

Fujimoto T., Yamamoto, H., and Ohsumi Y. Different phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries in yeast and mammalian autophagosomes revealed by a new electron microscopic technique. *Autophagy*, 査読無, Vol.10, 933-935, 2014, DOI: 10.1038/ncomms4207

Cheng, J., Fujita, A., Yamamoto, H., Tatematsu, T., Kakuta, S., Obara, K., Ohsumi, Y., and Fujimoto, T. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat. Commun.*, 査読有, Vol.5, 3207 (1-10), 2014, DOI: 10.1038/ncomms4207

Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., and Ohsumi, Y. Fine

mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 査読有, Vol.126, 2534-2544, 2013, DOI: 10.1242/jcs.122960

Kakuta, S., Yamamoto, H., Negishi, L., Kondo-Kakuta, C., Hayashi, N., and Ohsumi, Y. Atg9 vesicles recruit vesicle-tethering proteins Trs85 and Ypt1 to the autophagosome formation site. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol.287, 44261-44269, 2012, DOI: 10.1074/jbc.M112.411454

Yamaguchi, M., Matoba, K., Sawada, R., Fujioka, Y., Nakatogawa, H., Yamamoto, H., Kobashigawa, Y., Hoshida, H., Akada, R., Ohsumi, Y., Noda, N.N., and Inagaki, F. Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 査読有, Vol.19, 1250-1256, 2012, DOI: 10.1038/nsmb.2451

Obara, K., Yamamoto, H., and Kihara, A. Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol.287, 38473-38481, 2012, DOI: 10.1074/jbc.M112.394205

Watanabe, Y., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Hoshida, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol.287, 31681-31690, 2012, DOI: 10.1074/jbc.M112.397570

Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., Sakoh-Nakatogawa, M., Kakuta, S., Suzuki, S.W., Kirisako, H., Kondo-Kakuta, C., Noda, N.N., Yamamoto, H., and Ohsumi, Y. The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol.287, 28503-28507, 2012, DOI: 10.1074/jbc.C112.387514

Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., and Ohsumi, Y. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.*, 査読有, Vol.198, 219-233, 2012, DOI: 10.1083/jcb.201202061

Yamaguchi, M., Noda, N.N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., Akada, R., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure*, 査読有, Vol.20, 1244-1254, 2012, DOI: 10.1016/j.str.2012.04.018

〔学会発表〕(計 2 件)

山本 林、大隅 良典、Characterization and proteomic analysis of Atg9-containing structures in yeast、6th International Symposium on Autophagy、2012 年 10 月 28 日 - 11 月 1 日、沖縄

山本 林、角田 宗一郎、渡邊 朋信、北村 朗、大隅 良典、オートファゴソーム形成に関わる Atg9 ベシクルの細胞内動態とプロテオーム解析、第 23 回 日本生体防御学会学術総会、2012 年 7 月 9 日 - 7 月 11 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ohsumilab.aro.iri.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 林 (YAMAMOTO, Hayashi)

東京工業大学・フロンティア研究機構・

特任助教

研究者番号：80551283