

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460063

研究課題名(和文) 脱リン酸化を介したオートファジーアテニュエーションシステムの統合的理解

研究課題名(英文) Elucidation of attenuation system for autophagy by phosphatases

## 研究代表者

荒木 保弘 (Araki, Yasuhiro)

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：60345254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは真核生物に備わる分解系で、飢餓時に細胞質成分を液胞やリソソームに輸送し分解する。オートファジーによる分解は非特異的かつバルクであることから、その活性は厳密に制御される。オートファジー活性にリン酸化酵素が参画していることが知られているが、どの脱リン酸化酵素が、どのように関与するか、は全く不明である。本研究では、PP2AとカルシニューリンがAtg13を基質としてオートファジーの開始に、Msg5とSdp1がSlt2を基質として負の制御に寄与することを見出した。また、オートファジーに必須な、新規PI3キナーゼ構成因子Atg38が複合体形成に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a conserved eukaryotic process of vacuolar/lysosomal-mediated degradation targeting proteins and organelles. Autophagy has to be tightly regulated in order to prevent its occurring at insufficient or excess levels, both of which are harmful for cells. So far, the regulation of autophagy by phosphorylation catalyzed by kinases have been primarily investigated; however, the importance of its reverse reaction, catalyzed by phosphatases, needs to be elucidated. In this study, I demonstrate that two phosphatases, PP2A and calcineurin, are required for dephosphorylation of Atg13 upon autophagy induction and that Msg5 and Sdp1 dephosphorylate Slt2 kinase to suppress autophagy. In addition, I identified a novel component of the PI3 kinase complex, Atg38. Atg38 functions as a physical linkage between the Vps15-Vps34 and Atg14-Vps30 sub-complexes to facilitate complex I formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー リン酸化 キナーゼ ホスファターゼ 蛋白質分解 酵母

## 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大規模生体分子分解系で、二重膜構造の形成を伴う、アтипカルな膜動態から成り立っている。出芽酵母では飢餓によってオートファジーが誘導されると、細胞質に扁平な膜構造(隔離膜)が登場し、この膜が伸展・成長するにともない細胞質やオルガネラを取り込んだ後、液胞に輸送され、内容物が分解される。これまでのオートファジー研究は、その誘導機構、オートファジーに伴う二重膜構造体(オートファゴソーム)形成機構の理解を主とし、多大な努力がなされてきた。一方、オートファジーによる分解は非特異的かつバルクであることから、その制御の破綻から生じる過剰なオートファジーの亢進は死に至ることもありうる、生物にとって由々しき問題である。従って、生物はオートファジーを適度に維持する機構、栄養素の再添加時にはオートファジーを迅速に終息させる機構(オートファジーアテニュエーションシステム)を備えているに違いないが、これらに関する知見、特に分子的基盤を明らかにする研究はほぼ皆無である。

## 2. 研究の目的

オートファゴソームの形成に必須な 18 の因子(ATG 遺伝子)が同定されており、遺伝子産物の Atg タンパク質のうち 2 つがリン酸化酵素である。すなわち Atg1 キナーゼ複合体と生体膜リン脂質の一種、ホスファチジルイノシトール3リン酸(PI3P)を産出する PI3 キナーゼ I 型複合体である。PI3 キナーゼはホスファチジルイノシトールを基質とし、産物である PI3P は下流のエフェクターである Atg2 を、PI3P との結合能を有する Atg18 との複合体としてリクルートすることでオートファゴソーム形成に正に寄与する。リン酸化は可逆的であり、生化学的反応を司る重要な調節機構である。この過程は、キナーゼ(リン酸化)とホスファターゼ(脱リン酸化)によって制御されている。上記キナーゼのリン酸化酵素活性はオートファゴソーム形成の誘導に必須である。従って、拮抗するホスファターゼが、キナーゼに相反する抑制性機能を担ってオートファジーに参画しているであろうことは容易に想像されるが、どのホスファターゼが、どのように関与するか、は全く不明である。本研究では、上記オートファジー関連キナーゼに拮抗するホスファターゼの単離・同定、それらの活性制御を解明することで、オートファジーに対して、負に機能する制御機構(オートファジーアテニュエーションシステム)の理解を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Atg1 キナーゼに拮抗するホスファターゼの同定

長い間 Atg1 キナーゼの基質は未同定であったが、最近、申請者は PI3 キナーゼの活性触媒サブユニットである Vps34 が生体内に於ける Atg1 キナーゼの基質の一つであり、リン酸化がオートファゴソーム形成に必須であること、さらに栄養再添加によるオートファジー終息時に Vps34 は脱リン酸化されることを見出した。従って Vps34 の脱リン酸化に寄与するホスファターゼがオートファジーアテニュエーションシステムの中心として機能する可能性が示唆される。出芽酵母のホスファターゼ 38 すべてについて欠失株、条件致死株を取得し、飢餓状態で Vps34 のリン酸化が亢進する、または富栄養条件下でリン酸化が持続する変異体を同定する。同定したホスファターゼの変異株を用いて、オートファジー活性への影響を検証し、オートファジー終結における脱リン酸化の意義を検証する。

### (2) 機能亢進によりオートファジーを抑圧するホスファターゼの探索

細胞内で発現量を増大する“強制発現”によって機能亢進を試みる。“強制発現”系として、ごく最近構築されたヒトホルモンを誘導剤とした強制発現誘導系(Z4EV システム)を用いる。Z4EV システムでは内在に存在しない人工的転写活性化因子を採用しているため、オフターゲットが皆無で、特異性が大変高い。出芽酵母の全てのホスファターゼについて Z4EV システムを構築し、Vps34 のリン酸化状態、オートファジーマーカーである GFP-Atg8 とカーゴである Pgc1-mCherry 由来の蛍光の液胞への局在・蛍光強度と液胞内分解酵素に依る分解産物である GFP、mCherry といった蛍光タンパク質の出現を指標に、飢餓条件下で強制発現によりオートファジーを不活性化する因子を探索する。

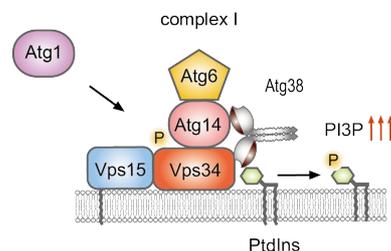
## 4. 研究成果

(1) ホスファターゼ欠失酵母株を多数探索したが、Vps34 のリン酸化に異常を示す変異体を同定するに至らなかった。各ホスファターゼの基質・機能が重複していることが知られており、このため破壊株を用いる機能喪失から必要性を検証するアプローチでは同定できなかったと考える。しかし、同様のアプローチから Atg13 のホスファターゼ候補として PP2A とカルシニューリンを見出した。Atg13 はオートファジー活性のスイッチ蛋白質であり、富栄養条件下で Tor キナーゼにより高度にリン酸化され、オートファジー活性の抑制に寄与する。飢餓に呼応して Atg13 が脱リ

ン酸化されることで抑制が解除されオートファジーが誘導されるが、この脱リン酸化を担うホスファターゼは未同定であった。カルシニューリンはカルシウムイオンにより活性制御されることから、オートファジーの開始にカルシウムシグナル伝達系の関与が示唆される。

(2)機能亢進によりオートファジーを抑圧するホスファターゼの探索により、飢餓条件下においてオートファジー活性を抑制する二つのホスファターゼ Msg5 と Sdp1 を見出した。Msg5 と Sdp1 はともにキナーゼである Slit2 を負に制御していることが知られている。Slit2 欠損株が、二つのホスファターゼの強制発現で観察された表現型、即ちオートファジー活性の低下、Atg8 の発現量の低下、Atg13 の脱リン酸化の亢進、を示した。Slit2 のキナーゼ活性は飢餓後早い時間で活性化されることを鑑みると、Slit2 はオートファジーの誘導を正に制御するのに対して、ホスファターゼである Msg5 と Sdp1 はこれに拮抗していると考えられる。本研究により、これまでのオートファジー研究に適用されていなかった強制発現による“機能亢進”を用いた網羅的検索により、これまで看過されたオートファジー関連新奇因子が同定され、分子機構に新たな一面を明らかにした。

(3) ホスファターゼによる Vps34 のリン酸化を解析する過程において、質量分析解析により機能未知因子を Vps34 と相互作用因子として同定し、Atg38 と名付けた。このタンパク質はオートファジーに寄与する complex I と共沈されるが、液胞酵素の輸送に寄与する complex II とは結合しないこと、飢餓に応答して、オートファゴソーム形成の場である PAS に局在することから、Atg38 は complex I 特異的構成因子であることが明らかとなった。Atg38 欠失株ではオートファジー活性が低下し、Vps34 複合体が Atg14/Atg6 と Vps34/Vps15 の二つのサブコンプレックスに分離した。Atg38 は Atg14 と Vps34/Vps15 の両者にその N 末側領域を介して相互作用する。更なる生化学的解析により Atg38 は C 末側領域でホモ 2 量体化すること、この 2 量体形成が complex I 形成に必須であることが判明した。これらの結果は Atg38 の 2 量体が Atg14/Atg6 と Vps34/Vps15 の間を繋ぎ止める役割を果たしていることを示唆する。この研究成果は沖縄でのオートファジー国際学会でポスター賞を受賞し、またこれを報じた論文(JCB 2013)は F1000Prime の推薦論文に選ばれた。



## 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 1 件)

Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity., Araki, Y., Ku WC., Akioka, M., May, Al., Hayashi, Y., Arisaka, F., Ishihama, Y. and Ohsumi Y., *J Cell Biol.* 203:299-313 (2013) (査読有) doi/10.1083/jcb.201304123

[学会発表] (計 7 件)

荒木 保弘, Atg38 はオートファジー特異的 PI3 キナーゼ複合体の構成因子である  
酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会  
2013 年 9 月 10 日、東北学院大学、宮城県

荒木 保弘, A NOVEL COMPONENT OF AUTOPHAGY-SPECIFIC PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE COMPLEX, 第 37 回(2014 年)日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際展示場、兵庫県

荒木 保弘, Atg38 はオートファジー特異的 PI3 キナーゼ複合体の構成因子である、第 7 回オートファジー研究会、2013 年 12 月 19 日、ヤマハリゾートつま恋、静岡県

荒木 保弘, PI3 キナーゼ複合体のオートファジー特異的リン酸化制御、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014 年 9 月 1 日-9 月 3 日、東京大学弥生講堂、東京都

荒木 保弘, オートファジーに必須な Atg1 キナーゼの基質同定、第 8 回オートファジー研究会、2014 年 11 月 9 日-11 月 12 日、シャトレゼ キングダムサッポロ、北海道

荒木 保弘, PI3 キナーゼの複合体特異的機能、構成因子と制御、第 37 回(2014 年)日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-11 月 27 日、パシフィコ横浜 神奈川県

Yashiro Araki, Phosphorylation of Vps34 by Atg1 is required for autophagy、The 7<sup>th</sup> International Symposium on autophagy 2015、2015 年 3 月 19 日-3 月 23 日、The smoky Willow Resort, Hangshan, Anhui, China

[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

荒木 保弘 (ARAKI YASUHIRO)

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:60345254

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: