

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25711005

研究課題名（和文）選択的オートファジーにおける分解標的認識制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms that regulate target recognition in selective autophagy

研究代表者

中戸川 仁（Nakatogawa, Hitoshi）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：90414010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の特定の成分を標的とする選択的オートファジーは、種々の疾患との直接的関連からも近年特に注目を集めている。本研究では、モデル生物である出芽酵母を用いて、選択的オートファジーがどのように調節されているのかを解析し、複数の選択的オートファジー関連経路が同一のメカニズムにより制御されていることを明らかにした。また、核および小胞体を標的とした新しい選択的オートファジー経路を発見し、その分子基盤を明らかにした。本研究により得られた成果は、選択的オートファジーの制御を介した疾患治療法の開発のための基盤情報となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Selective types of autophagy, which target and degrade specific components in cells, have recently attracted much attention due to their direct relations to a number of human diseases. In this study, using a budding yeast as a model organism, we analyzed how selective autophagy is controlled, and revealed that multiple selective autophagy pathways are regulated by a uniform mechanism. In addition, we discovered new selective autophagy pathways that target the nucleus and the endoplasmic reticulum, and elucidated their molecular basis. Results obtained in this study will serve as basic information in developing therapeutic methods for related diseases.

研究分野：分子細胞生物学・生化学

キーワード：オートファジー リン酸化酵素 タンパク質間相互作用 細胞内分解 膜輸送

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、酵母からヒトまで、真核生物に高度に保存された細胞内の主要な分解経路である。オートファジーによる分解の対象(標的)は二重膜胞“オートファゴソーム”内に隔離され、分解の場である液胞あるいはリソソームに輸送され、分解される。最近、神経疾患等の原因となり得るタンパク質の凝集体や損傷したミトコンドリア、代謝環境の変動により不要となったペルオキシソーム、また、細胞内に侵入したバクテリアやウイルス等は、オートファゴソームにより選択的に隔離され、排除されることが明らかとなってきた。このような選択的オートファジーは、様々な細胞機能や疾患との直接的関連から特に注目を集めるようになってきたが、そのメカニズムにはまだ多くの不明な点が残されていた。

## 2. 研究の目的

選択的オートファジーにおける標的認識の基本的メカニズムは、酵母からヒトまで共通している。標的はそれぞれに特異的なレセプタータンパク質に認識され、レセプタータンパク質がオートファゴソーム形成を駆動するタンパク質を標的に誘引することで、標的が効率よくオートファゴソームに取り込まれる。本研究では、多機能タンパク質リン酸化酵素 Hrr25/casein kinase 1 (CK1) に着目し、様々な選択的オートファジーに共通する分解標的認識の制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

出芽酵母には、細胞質で合成された酵素をオートファジーを介して液胞へ輸送する Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路、ミトコンドリアおよびペルオキシソームのオートファジーによる選択的分解経路であるマイトファジーおよびペキソファジーなど、複数の選択的オートファジー経路が存在する。これら経路における Hrr25 の重要性を明らかにし、Hrr25 の関与が判明した場合には、その具体的なメカニズムおよびその制御機構の生理的意義を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) Hrr25 による Cvt 経路の制御機構

Cvt 経路は、Ape1 (アミノペプチダーゼ) などの液胞内酵素を標的とし、Atg19 をレセプターとする選択的オートファジー関連経路である。本研究において、Hrr25 が Atg19 をリン酸化し、これが Atg19 と Atg11 との相互作用を強化することを明らかにした。Atg11 はオートファゴソーム形成に必要なタンパク質の集積をトリガーする因子である。このようにして Hrr25 が Cvt 経路を正に制御することを明らかにした。また、Hrr25 による Atg19 のリン酸化は、飽和培養条件や、栄養飢餓により亢進することを示した。これら条

件においては、細胞内での分解の要求性が上昇すると考えられる。Ape1 等の液胞内分解酵素の生合成を促進することに、このような制御機構の意義があると考えられる。以上の成果は、Journal of Cell Biology 誌に発表した (Tanaka et al, 2014)。

### (2) Hrr25 による Ams1 経路の制御機構

Ams1 経路は、Ams1 (-マンノシダーゼ) を標的とし、Atg34 をレセプターとする選択的オートファジー関連経路であり、窒素源飢餓により亢進することが知られていた。上記 Cvt 経路に関する解析結果を踏まえ、Ams1 経路への Hrr25 の関与を調べた結果、Hrr25 は Atg34 をリン酸化し、Atg34 と Atg11 の相互作用を促進することで、この経路を活性化していることが明らかとなった。本成果は、FEBS Letters 誌に発表した (Mochida et al, 2014)。

### (3) Hrr25 によるペキソファジーの制御機構

ペキソファジーは、ペルオキシソームを標的とし、Atg36 をレセプターとする選択的オートファジー経路である。Hrr25 は、上記 2 つの経路と同様に、Atg36 のリン酸化を介して Atg36-Atg11 間相互作用を制御することで、ペキソファジーの開始を調節することを明らかにした。本成果は、上記 Cvt 経路に関する成果と合わせて、Journal of Cell Biology 誌に発表した (Tanaka et al, 2014)。

さらに、Hrr25 による Atg36 のリン酸化がどのように制御されているのかについて解析を進めた。Atg36 は、ペルオキシソーム膜タンパク質 Pex3 を介してペルオキシソームに局在化するが、Pex3 を欠失させると Atg36 のリン酸化が起こらなくなることを見いだした。Hrr25 および Atg36 の精製タンパク質を用いた試験管内リン酸化反応系において、Pex3 を加えると Atg36 のリン酸化が亢進することが明らかとなった。すなわち、Pex3 には Hrr25 による Atg36 を直接促進する効果があることが示された。このようなメカニズムは、ペルオキシソームに局在化した Atg36 の特異的なリン酸化を担保するものと考えられる。

### (4) ペキソファジーとプロテアソームとの関係

ペキソファジーにおけるレセプターである Atg36 の量がペキソファジー誘導条件(窒素飢餓)で大きく減少することを見だし、この減少がプロテアソームの活性に依存することを示した。すなわち、プロテアソームがペキソファジーを負に制御することが示唆された。引き続きこのメカニズムと重要性について研究を進めている。

### (5) Hrr25 による核および小胞体の選択的オートファジーの制御

研究代表者らは、核および小胞体の選択的オートファジーにおいて働くレセプターとし

て、Atg39 および Atg40 を同定し、成果を Nature 誌に報告した (Mochida et al, 2015)。Atg40 については、ヒトの遺伝性感覚神経障害の責任因子に相当することが示唆された。さらに、Hrr25 のノックダウンにより、これら選択的オートファジーに部分的ではあるが欠損が生じること、また、Atg39, Atg40 がおそらくリン酸化であると考えられる翻訳後修飾を受けていることを見いだした)。Hrr25 がこれら新規レセプターのリン酸化を介して、核および小胞体の選択的オートファジーを制御する可能性についてさらに検証を進めている。

#### (6) Hrr25 と拮抗する脱リン酸化酵素に関する解析

Hrr25 によるリン酸化に拮抗する脱リン酸化酵素の候補として、Sit4 を同定した。Sit4 を欠損した細胞においては、Atg19 および Atg36 のリン酸化体の量が増加し、Cvt 経路およびペキソファジーの活性化が認められた。今後さらに、Sit4 による選択的オートファジーの制御機構の詳細および生理的意義を明らかにしていく。

#### 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 13 件)

(原著論文)

Yamasaki A, Watanabe Y, Adachi W, Suzuki K, Matoba K, Kirisako H, Kumeta H, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F, Noda NN (2016) Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep* 16, 19-27.

Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, Okamoto K (2015) Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J* 34, 2703-2719.

Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2015) Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, 522, 359-362.

Mochida K, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2014) Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of  $\alpha$ -mannosidase under nitrogen starvation conditions. *FEBS Lett* 588, 3862-3869.

Tanaka C, Tan LJ, Mochida K, Kirisako H, Koizumi M, Asai E, Sakoh-Nakatogawa M, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2014) Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J Cell Biol* 207, 91-105.

(英文総説)

Nakatogawa H (2016) Eating the ER and the nucleus for survival under starvation conditions. *Mol Cell Oncol* 3, e1073416.

Nakatogawa H, Mochida K (2015) Reticulophagy and nucleophagy: new findings and unsolved issues. *Autophagy* 11, 2377-2378.

Mochida K, Nakatogawa H (2015) Appetite for ER/nucleus destruction. *Cell Cycle* 14, 3209-3210.

Nakatogawa H (2015) Hrr25: An emerging major player in selective autophagy regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 11, 432-433.

(和文総説)

持田 啓佑, 中戸川 仁 (2017) ER ファジーとヌクレオファジー オートファジーによる小胞体と核の分解 **化学と生物** 55, 86-87.

中戸川 仁, 持田 啓佑 (2015) オートファジーによる小胞体と核の分解 **実験医学** 33, 2986-2989.

持田 啓佑, 中戸川 仁 (2015) オートファジーによる小胞体と核の選択的な分解機構 **細胞工学** 34, 1076-1077.

持田 啓佑, 中戸川 仁 (2015) 選択的なオートファジーによる小胞体および核の分解 **ライフサイエンス 新着論文レビュー**.

[学会発表](計 21 件)

中戸川 仁, オートファジーによる核と小胞体の選択的な分解機構, A3 日本オートファジー合同セミナー, 2017 年 3 月 10 日, ザ・セレクトン福島 (福島県福島市)。

持田 啓佑, 中戸川 仁, Negative regulatory mechanisms of the yeast mitophagy receptor Atg32, A3 日本オートファジー合同セミナー, 2017 年 3 月 10 日, ザ・セレクトン福島 (福島県福島市)。

中戸川 仁, オートファジーの分子機構: 食う側でもあり食われる側でもある小胞

体，酵母研究会第 82 回講演会，2017 年 3 月 8 日，北野工房のまち（兵庫県神戸市）。

持田 啓佑，中戸川 仁，選択的オートファジーによる小胞体と核の分解機構，第 39 回日本分子生物学会，2016 年 11 月 30 日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

中戸川 仁，オートファジーによる核と小胞体の分解の分子基盤，第 89 回日本生化学会大会（招待講演），2016 年 9 月 26 日，東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）。

Hitoshi Nakatogawa, Molecular mechanisms of autophagic degradation of the nucleus and the endoplasmic reticulum in yeast（招待講演・国際学会），2016 年 9 月 12 日，淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）。

Keisuke Mochida, Hitoshi Nakatogawa, Degradation of the ER and the nucleus via selective autophagy（ポスター），EMBO conference, Structure and function of the endoplasmic reticulum（国際学会），2016 年 10 月 24 日，Girona Spain.

中戸川 仁，オートファジーによる核と小胞体の選択的分解の分子機構，第 68 回日本細胞生物学会（招待講演），2016 年 6 月 17 日，京都テルサ（京都府京都市）。

Hitoshi Nakatogawa, Mechanisms that drive nucleophagy and ER-phagy, 4th Sino-Japan Symposium on Autophagy（招待講演），2016 年 4 月 23 日，Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing China.

Hitoshi Nakatogawa, Yeast cells eat the ER and nucleus to survive starvation conditions, the 2016 Minisymposium on Autophagy（招待講演），2016 年 4 月 15 日，中央研究院生物化学研究所，Taipei Taiwan.

中戸川 仁，オートファジーによる小胞体と核の選択的分解，遺伝学研究会（招待講演），2016 年 3 月 26 日，国立遺伝学研究所（静岡県三島市）。

中戸川 仁，Molecular Mechanisms of ER-Phagy and Nucleophagy in Yeast, Gordon Research Conference（招待講演・国際学会），2016 年 3 月 21 日，米国 カリフォルニア。

中戸川 仁，オートファジーに寄る小胞体と核の分解：特異的因子の同定とメカニズムの解明，創薬シーズ開発研究会，2015 年 11 月 5 日，横浜市立大学（神奈川県横浜市）。

中戸川 仁，出芽酵母における小胞体と核の選択的オートファジー，酵母遺伝学フォーラム，2015 年 9 月 2 日，広島大学（広島県東広島市）。

Hitoshi Nakatogawa, Hrr25 kinase regulates three selective autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, The 16<sup>th</sup> Northeastern Asian Symposium on Autophagy: From Basic to Medicine（招待講演），2014 年 12 月 18 日～2014 年 12 月 31 日，Busan Korea.

中戸川 仁，ER ファジーレセプターの同定と解析，第 8 回オートファジー研究会（招待講演），2014 年 11 月 10 日～2014 年 11 月 11 日，ガトーキングダムサッポロ（北海道札幌市）。

Hitoshi Nakatogawa, Hrr25 phosphorylates three receptor proteins to stimulate selective autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, CSH Asia Protein Modification & Homeostasis, 2014 年 6 月 16 日～2014 年 6 月 20 日，Suzhou China.

中戸川 仁，選択的オートファジーの制御メカニズム，日本生化学会関東支部例会（招待講演），2014 年 6 月 14 日，茨木大学（茨城県水戸市）。

中戸川 仁 出芽酵母における選択的オートファジーの制御機構 生体システム専攻バイオサイエンスシンポジウム（招待講演）2014 年 2 月 18 日 東京工業大学すずかけ台キャンパス（神奈川県横浜市）。

中戸川 仁 出芽酵母における選択的オートファジーの制御機構 第 7 回オートファジー研究会 2013 年 12 月 21 日 ヤマハリゾートつま恋（静岡県掛川市）。

② Hitoshi Nakatogawa, Hrr25 Triggers two distinct selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins, The 3<sup>rd</sup> Sino-Japan Symposium on Autophagy（招待講演），2013 年 10 月 15 日，Dunhuang China.

〔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.nakatogawa-lab.bio.titech.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東京工業大学・生命理工学院・准教授  
中戸川 仁 (NAKATOGAWA, Hitoshi)  
研究者番号 : 90414010

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし