

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成19年度採択分

平成22年 4月25日現在

研究課題名（和文）

オートファジー分子機構とその多様性の解明

研究課題名（英文）

Studies on Molecular Mechanism and its Diversity of Autophagy

研究代表者

氏名 **大隅 良典** (OHSUMI YOSHINORI)

所属研究機関・部局・職 東京工業大学・フロンティア研究機構・特任教授



研究の概要：本研究計画はオートファジーの膜動態の分子機構の解明とその多様性の解明を2つの柱としている。

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、ATG、タンパク質分解、ユビキチン様タンパク質、膜動態

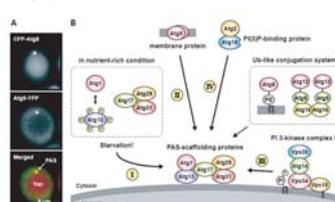
1. 研究開始当初の背景

今日のオートファジー研究のめざましい発展は、我々がその過程に必須な遺伝子群として酵母の多数の ATG を同定したことに端を発している。その後 20 数年、一貫して酵母のオートファジーの研究を続け、オートファジーに必須な 18 個の Atg タンパク質の機能の解析を進め、オートファゴソーム形成の基本的分子装置であることを世界に先駆けて報告した。オートファジー研究は多数の動植物で逆遺伝学的解析が進み、様々な高次機能やその破綻に伴う病態などが次々と明らかにされ、オートファジー関連の論文も急増している。しかしその多くは現象論的な解析に留まり、オートファジーの分子機構解明を目指した研究は少なく、多くの謎をもつオートファジーの膜動態と、その機構の多様性を理解することの重要性が増している。

2. 研究の目的

以下の2つの課題を柱として解析を進める。第一に最も重要な過程であるオートファゴソーム形成の分子機構を明らかにする。オートファジーの膜動態に必須な Atg タンパク質はタンパク質キナーゼ、PI3 キナーゼ、ユビキチン様のタンパク質・脂質結合反応系、機能未知の複合体からなる。膜動態の機構の全容解明には個々の Atg の解析のみならず、全 Atg の時間的空間的な関係を1つのシステムとして理解することが必須である。オートファゴソーム形成の場

図 1

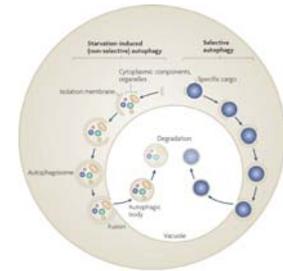


として提唱した PAS の実体の解明が急務である。(図 1)

第二の課題はオートファジーの様式の多様性を明らかにし、様々な条件下におこる分解機構を解明し、構成

図 2

的、選択的オートファジーの生理的な意義を明らかにすることを目的とする。これによりタンパク質、オルガネラの代謝回転、質的・量的管理システムの理解を目指す。(図 2)



3. 研究の方法

可能な限り多様な研究手法を駆使することが必要であり、以下が主な方法である。

1. 微弱な蛍光をもつ微細な構造を高感度の時間・空間分解能で生細胞観察を行うシステムの確立
2. 分子生物学、生化学と細胞生物学的手法の結合
3. 精製 Atg タンパク質を用いた in vitro 再構成系の構築
4. 遺伝学的手法を駆使した細胞の網羅的観察と新規因子のスクリーニング

4. これまでの成果

全 Atg に GFP-を融合し正常レベルで各 atg 遺伝子の破壊株で発現させ、他の Atg の PAS 局在に対する影響の網羅的・定量的解析から、機能単位間の階層構造が明らかになった。

1. 飢餓誘導されるバルク分解を担うオートファジー（以下オートファジー）では、Atg17 が最も上流に位置することが明らかとなった。Atg17 は、オートファジーに必須で、Cvt 系路には必要ない因子として新規に同定した Atg29, Atg31 と相互依存的に 3 者複合体を形成することが明らかとなった。
2. 構成的な Cvt 経路の関与を排除するために

atg11破壊株を用いて、オートファジーに関わる PAS が飢餓により形成が誘導され、栄養の添加で速やかに消失する極めて動的な構造であることが示した。

3. 飢餓のシグナルが TOR kinase による Atg13 のリン酸化状態の制御、オートファジーの誘導が脱リン酸化 Atg13 による Atg1 kinase の活性化、前述の3者との5者複合体形成、続いて他の Atg がリクルートされるモードを提案した。

B. オートファジーに特異的 PI3 kinase 複合体の PAS 局在を Atg14 が規定し、その kinase 活性がオートファジーに必須である。オートファジーの進行に伴い PI3P がオートファゴソームの内膜に濃縮され、液胞内に輸送されることを明らかにした。

C. オートファゴソーム形成の実行因子である結合体形成に関して以下の知見を得た。

1. *in vitro* 再構成系を用いて Atg8-PE の形成に伴い膜上の Atg8-PE がリポソーム同士の凝集および、ヘミ融合を引き起こす。これらの活性に関与する Atg8 の残基を特定し、膜融合活性が *in vitro* のオートファゴソーム形成に必須な役割を担っていることを示した。

2. 大腸菌内で Atg12-Atg5 を形成させる系の構築し、Atg8 脂質化反応の再構成系に精製 Atg12-Atg5 添加する実験により、Atg8 の脂質化に対して E3 様の促進機能を有することを示すことに成功した。

オートファジーの分子機構の解明に関しては以下のような成果を得ることができた。

1. 細胞質酵素 Lap3 が飢餓により Atg11 に依存する Cvt 経路の基質と同様な機構で液胞に輸送され、分解をされることを発見した。

2. 非醗酵性培地で生育する酵母は増殖の停止期に入るとミトコンドリアを選択的にオートファジー依存的に液胞で分解する。この過程の可視化系を構築し、酵母の全必須遺伝子破壊株の網羅的なスクリーニングを行い、この過程に関わる多数の遺伝子を同定した。最も顕著な欠損を示す変異の解析を行い、新規遺伝子 *ATG32* を同定した。Atg32 はミトコンドリア外膜タンパク質であり、Atg11 と Atg8 を結合しリセプターとして機能している。

4. 北大稲垣研との共同研究から選択的 cargo リセプターと Atg8 や LC3 との結合に関わる WxxL/I モチーフを同定した。

5. 飢餓誘導オートファゴソームに取り込まれた細胞質成分の網羅的な解析から細胞質酵素、リボソームなどが、Atg11 に依存しない新規の選択的分解基質となる系が存在することが明らかとなった。

5. 今後の計画

高感度の顕微鏡観察により 1 分子レベルでの Atg の細胞内動態を解析を進める。PAS の基盤をなす Atg17、-29、-31 の 3 者複合体、及び Atg1-13 が結合した 5 者複合体の解析を行

う。Atg12-Atg5 による脂質化の促進機構、膜形成を理解する上で緊急の課題である Atg8 PE 化反応の細胞内部位、膜中間構造体を同定し、その生化学的、形態学的な解析を行う。唯一の膜タンパク質である Atg9 を含む構造体の同定と隔離膜形成における役割を明らかにする。オートファジーの選択的基質認識機構を明らかにすると共に、cargo に依存した膜形成の機構を明らかにする。さらに Atg11 非依存性の選択性の分子基盤を明らかにする。Atg タンパク質及びその複合体の 3 次元構造を解明する。

6. これまでの発表論文等 (論文総数 33 件)

1. Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol. Cell Biol.*, 30, 1049-1058 (2010)

2. Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3-processing and delipidation during autophagy. *EMBO J.*, 28, 1341-1350 (2009)

3. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell*, 17, 87-97 (2009)

4. Obara K, Sekito T, Niimi K, Ohsumi Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via PtdIns(3)P and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.*, 283, 23972-23980. (2008)

5. Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2039-2050 (2008)

6. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130, 165-178 (2007)

7. Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 12, 209-218 (2007)

(Review) Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458-467.

(受賞)

平成 19 年 9 月 日本植物学会学術賞
平成 21 年 1 月 朝日賞

ホームページ等

<http://www.ohsumilab.ari.titech.ac.jp/>