

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されません

研究課題名	オートファジーにおける膜新生駆動システムの実体と全容の解明
研究機関・ 部局・職名	東京工業大学・フロンティア研究機構・特任准教授
氏名	中戸川 仁

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	63,684,695	63,684,695	7,920	63,692,615	63,692,615	0	0
間接経費	19,105,408	19,105,408	0	19,105,408	19,105,408	0	0
合計	82,790,103	82,790,103	7,920	82,798,023	82,798,023	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	460,061	20,891,205	29,036,651	0	50,387,917
旅費	0	407,220	203,540	0	610,760
謝金・人件費等	0	2,506,620	7,204,121	0	9,710,741
その他	0	1,000,538	1,982,659	0	2,983,197
直接経費計	460,061	24,805,583	38,426,971	0	63,692,615
間接経費計	138,018	7,871,982	11,095,408	0	19,105,408
合計	598,079	32,677,565	49,522,379	0	82,798,023

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
分光光度計	Hitachi U-2900	1	1,438,500	1,438,500	2011/6/16	東京工業大学
分光蛍光光度計	Hitachi F-2700	1	2,183,160	2,183,160	2012/2/16	東京工業大学
発光検出解析装置	GE LAS4010	1	8,694,000	8,694,000	2012/2/16	東京工業大学
PCR装置	GeneAmp PCRシステム 9700	1	926,100	926,100	2012/4/10	東京工業大学
微量高速遠心機	TOMY Kitman	1	508,725	508,725	2012/5/15	東京工業大学
微量サンプル分光高度計	GEヘルスケア・ジャパン NanoVue Plus with	1	1,256,640	1,256,640	2012/11/15	東京工業大学
分離用超遠心機	日立工機 CP80WX	1	6,720,000	6,720,000	2013/1/25	東京工業大学
多目的マイクロプレートリーダー	Varioskan Flash	1	6,116,250	6,116,250	2013/3/7	東京工業大学
微量高速遠心機	TOMY Kitman	1	538,650	538,650	2013/3/13	東京工業大学

5. 研究成果の概要

オートファジーとは、細胞内の大規模な分解系であり、細胞内の物質代謝や恒常性維持に重要な役割を果たしている。オートファジーには、分解対象を隔離し、リソソームや液胞といった分解の場に輸送するための脂質膜の袋「オートファゴソーム」の形成が必須である。本研究では、オートファゴソームの膜の前駆体を世界で初めて同定し、その単離法を確立した。また、新たな関連因子を多数同定することに成功し、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けた基盤を整えることができた。これら成果は、細胞内での膜新生機構の理解という点で他の基礎研究分野にも広く波及効果を及ぼし、将来的にはオートファジー活性の人為的制御技術創出のための情報基盤として、オートファジーが関与する生理機能の調節や病気の予防・治療法の開発にも役立つと期待される。

課題番号	LS044
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	オートファジーにおける膜新生駆動システムの実体と全容の解明
	Elucidation of the whole picture of the membrane generating system in autophagy
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東京工業大学・フロンティア研究機構・特任准教授
	Tokyo Institute of Technology, Frontier Research Center, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	中戸川 仁
	Hitoshi Nakatogawa

研究成果の概要

(和文):

オートファジーとは、細胞内の大規模な分解系であり、細胞内の物質代謝や恒常性維持に重要な役割を果たしている。オートファジーには、分解対象を隔離し、リソソームや液胞といった分解の場に輸送するための脂質膜の袋「オートファゴソーム」の形成が必須である。本研究では、オートファゴソームの膜の前駆体を世界で初めて同定し、その単離法を確立した。また、新たな関連因子を多数同定することに成功し、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けた基盤を整えることができた。これら成果は、細胞内での膜新生機構の理解という点で他の基礎研究分野にも広く波及効果を及ぼし、将来的にはオートファジー活性の人為的制御技術創出のための情報基盤として、オートファジーが関与する生理機能の調節や病気の予防・治療法の開発にも役立つと期待される。

(英文):

Autophagy is a bulk degradation system that plays important roles in cellular metabolism and homeostasis, and involves formation of a membrane sac called the autophagosome that sequesters degradation targets and delivers them into lytic compartments such as the lysosome

or vacuole. This study for the first time identified a precursory membrane of the autophagosome and established a method to isolate it. Moreover, this study also identified a number of new factors involved in autophagosome formation. Thus, a basis to elucidate the whole picture of the cellular system for autophagosome formation has been established. These achievements will have a great impact on not only autophagy but also other research fields in terms of understanding intracellular membrane neogenesis, and provide critical information for development of new drugs to regulate autophagic activity, which will be useful to control cellular physiological functions and diseases related to autophagy.

1. 執行金額 82,790,103 円
(うち、直接経費 63,684,695 円、 間接経費 19,105,408 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

3. 研究目的

我々の細胞が営む生命活動は、細胞を構成する成分の「合成」と「分解」の絶妙なバランスの上に成り立っている。オートファジー(自食作用)は、タンパク質等の細胞質成分のみならず、細胞内小器官のような巨大な構造物の丸ごとの分解をも媒介する、真核生物に高度に保存された大規模な分解系である。その最たる特徴は、分解すべきものを包み込み、種々の消化酵素を包含するリソソームや液胞といった分解コンパートメントに輸送するための脂質膜のふくろ、「オートファゴソーム」の形成にある。栄養飢餓時には、オートファゴソームは細胞質の一部を無作為に包み込み、その分解産物を細胞が飢餓を凌ぐための養分として供給する。また時には、機能不全となったミトコンドリア等の細胞内小器官、異常タンパク質の凝集塊、さらには細胞内に侵入したバクテリア等を特異的に認識して選択的に取り囲み、これらの除去を促す。こうした分解標的の多様性を反映するかのよう、オートファジーは細胞内の物質代謝や飢餓応答だけでなく、発生、分化、老化、細胞死、免疫等、多彩な生命機能に関与することが、近年急速に明らかとなってきている。さらに、オートファジーの破綻が、ハンチントン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患や、肝疾患、心不全等、様々な病気の発症につながるとの報告が相次いでおり、これら病気に対する予防法・治療法の開発のためにも、オートファジーの分子機構の解明が急務となっている。

本研究では、オートファジー研究における最重要課題と位置付けられ、なお多くの謎を残すオートファゴソームの形成機構の解明を目指した。オートファゴソームは、オートファジーの誘導に応じて細胞質で全く新規に作り上げられる。これまでの研究から、オートファゴソームの形成は Atg タンパク質と呼ばれる特異な因子群を必要とすることが明らかとなったが、オートファゴソームの膜が何に由来し、どのような過程を経て、どのようにして形成されるのか、という本質的な問いに対する答えは未だ得られていない。本研究では、膜の由来を始点とするオートファゴソーム形成の

素過程と、これを支えるシグナル伝達経路や細胞内膜系、さらにこれらを統御する Atg タンパク質群を1つの「膜新生駆動システム」として捉え、その実体と全容を明らかにすることを目標とした。

4. 研究計画・方法

(1) オートファゴソーム膜前駆体の単離と解析

我々は、最近、オートファゴソーム形成の素過程の解明のための突破口となる成果を得た。すなわち、オートファゴソームの「膜の前駆体」を捉えることに成功し、それが蓄積する条件を見出した。本研究では、まず、この膜の前駆体を単離し、その形態を明らかにして、オートファゴソームの膜がどのような形態学的過程を経て作られるのかを明らかにするための研究に取り組んだ。また、同前駆体を大量調製し、含まれるタンパク質や脂質分子を網羅的に解析することで、オートファゴソーム膜の脂質組成を決定し、オートファゴソームの形成に必要な新規因子の同定を試みた。また、タンパク質・脂質のプロファイルから、同前駆体が細胞内のどの膜から作られているのか、その由来に関する情報を得ることを試みた。さらに、同前駆体の形成機構およびオートファゴソーム膜への変換機構を追究することで、オートファゴソーム形成の一連の素過程を明らかにすることを目指した。

(2) 新規オートファジー関連因子の探索

非常にダイナミックな膜動態を伴うオートファゴソームの形成過程を、既知のAtgタンパク質のみで支え得るとは考え難い。しかし、これまでの経緯から、生育非必須遺伝子を対象にした関連遺伝子のスクリーニングは飽和に達したと考えられる。そこで、本研究では、出芽酵母の生育に必須な遺伝子を対象に、オートファゴソームの形成に必要な因子を系統的にスクリーニングした。得られた新規因子について、特にAtgタンパク質群との関係に着目しながら、それらのオートファゴソーム形成における役割を明らかにすることを試みた。さらに、動物細胞を用いた新規因子の解析にも着手し、我々ヒトにも通ずるオートファゴソーム形成のメカニズムの解明を目指した。

5. 研究成果・波及効果

(1) オートファゴソーム膜前駆体の単離と解析

オートファゴソーム膜前駆体の単離法を確立することができた。しかしながら、電子顕微鏡解析によってその形態を明らかにするには至らなかった。試料調製の段階で形態が失われた可能性が考えられたため、他の調整法を試みている。また、前駆体膜を大量調製し、含まれるタンパク質の質量分析による同定を試みたが、既知の因子は検出されたものの、新規因子の同定には至らなかった。こちらに関しても前駆体膜の単離法および解析手法を再検討している段階である。一方、前駆体膜はAtgタンパク質群の協調的な働きにより、PASと呼ばれるオートファゴソーム形成の場で形成されることを明らかにすることができた。また、前駆体膜にはゴルジ体から生じる膜小胞上に存在する膜タンパク質Atg9が含まれることが明らかとなったため、今後、前駆体膜の形態を明らかにし、Atg9を含む膜小胞との形態的な違いを見出すことで、前駆体膜の形成機構に関する重要な知見が得られるものと期待される。

(2) 新規オートファジー関連因子の探索

出芽酵母の生育に必須な遺伝子を対象に、オートファゴソームの形成に必要な因子を系統的にスクリーニングした結果、分泌経路やエンドサイトーシス経路など、細胞内膜輸送経路に働く因子を中心に、ノックダウンによりオートファゴソーム形成に顕著な欠損を示す 28 の因子を同定することに成功した。これらには未報告の因子も複数含まれていた。さらにいくつかの因子にフォーカスし既知の Atg タンパク質との関係を中心に解析を進めた結果、それぞれについてオートファゴソーム形成のメカニズムに新たな洞察を与えると期待される興味深い知見が得られつつある。また、Hrr25 というタンパク質リン酸化酵素のノックダウンは、液胞内酵素の集合体と余剰なペルオキシソームの選択的オートファジーに特異的に関わることも見出し、そのメカニズムを明らかにすることもできた(論文投稿中)。さらに既知の Atg タンパク質の解析もおこない、(1)Atg4による Atg8 の脱脂質化反応の意義、(2)Atg12-Atg5 結合体の酵素活性発現機構、(3)タンパク質リン酸化酵素 Atg1 のオートファゴソーム膜への結合機構を明らかにし、得られた成果をそれぞれ、Autophagy 誌、Nature Structural & Molecular Biology 誌、Journal of Biological Chemistry 誌に報告した。

以上のようにして、本研究により、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けた基盤を整えることができた。これら成果は、オートファジーの研究分野のみならず、細胞内での膜新生機構の理解という点で、他の関連分野にも広く大きなインパクトを与え、将来的にはオートファジー活性の人為的制御技術創出のための情報基盤として、オートファジーが関与する生理機能の調節や病気の予防・治療法の開発にも役立つと期待される。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 9 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, Inagaki F, <u>Nakatogawa H</u>*, Ohsumi Y*. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nat. Struct. Mol. Biol., 2013, 20, 433-439. *責任著者 2. Yamaguchi M, Matoba K, Sawada R, Fujioka Y, <u>Nakatogawa H</u>, Yamamoto H, Kobashigawa Y, Hoshida H, Akada R, Ohsumi Y, Noda NN, Inagaki F. Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. Nat. Struct. Mol. Biol., 2012, 19, 1250-1256. 3. <u>Nakatogawa H</u>*, Ohbayashi S, Sakoh-Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, Kondo-Kakuta C, Noda NN, Yamamoto H, 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., 2012, 287, 28503-28507. *責任著者 4. <u>Nakatogawa H</u>*, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y*. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. Autophagy, 2012, 8, 177-186. *責任著者 5. Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, <u>Nakatogawa H</u>, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y, Okamoto K. Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. J. Biol. Chem., 2012, 287, 10631-110638. 6. Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, <u>Nakatogawa H</u>, Ohsumi Y, Inagaki F. Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. Mol. Cell, 2011, 44, 462-475. <p>(掲載済み一査読無し) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Nakatogawa H</u>, Ohsumi Y. Atg4 proteases in autophagy. Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn., 2012, 2138-2142. 2. Nakatogawa H, Ohsumi Y. SDS-PAGE techniques to study ubiquitin-like conjugation systems in yeast autophagy. Methods Mol. Biol., 2012, 832, 519-529. 3. 中戸川 仁、大隅 良典「オートファジーにおける膜形成のダイナミクスと分子メカニズム」 実験医学増刊「細胞内のリノベーシオン機構 タンパク質分解系による生体制御」29, 120-126, 2011. <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Nakatogawa H</u>. "A novel protein that regulates target recognition in selective autophagy" The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Fukuoka, Dec 14-Dec 16, 2012. 2. <u>Nakatogawa H</u>. "A novel kinase that regulates selective autophagy in yeast" 6th International Symposium on Autophagy, Okinawa, Oct 28-Nov 1, 2012. 3. 中戸川 仁「選択的オートファジーにおける標的認識の分子メカニズム」第 12 回日本蛋白質科学会年会 名古屋 2012 年 6 月 20~22 日 * 当発表をおこなったワークショップをオーガナイザーとして企画 4. Nakatogawa H. "Functions of autophagy-related ubiquitin-like proteins revealed by in vitro studies." "The Ubiquitin Family." Cold Spring Harbor Laboratories, New York, USA. 17-21/5/2011, CSHL Meetings&Courses Program.

	<p>5. 中戸川 仁 「オートファゴソーム形成機構の解明に向けた新たなアプローチ」 第84回日本生化学会大会 シンポジウム 「脂質生化学の新展開－脂質機能に迫る新しい構成論的アプローチ－」 京都 2011年9月21－24日</p> <p>6. 中戸川 仁 「In vitro 再構成系が明らかにしたオートファジー関連ユビキチン様タンパク質結合体の機能とそのメカニズム」 第11回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ 「生体膜ダイナミクス:In vitro 再構成系によるアプローチ」(オーガナイザー) 大阪 2011年6月7－9日</p> <p>7. Nakatogawa H. “Dissection of molecular mechanisms underlying autophagy using in vitro reconstitution systems.” 第34回日本分子生物学会年会 シンポジウム 「高次複合体ダイナミクスにおける基本原理の解明を目指した再構成生物学の最前線」 横浜 2011年12月13－16日</p> <p>8. 中戸川 仁 「オートファジー関連ユビキチン様タンパク質 Atg8 の脂質化と脱脂質化の意義」平成22年度遺伝学研究所研究会 三島 2011年3月30～31日 主催・国立遺伝学研究所</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1. 中戸川 仁 高校生・一般向け公開講演会 「東工大が誇る若手研究者たち」－生命科学で探る生物の仕組み、活動－ 「細胞はお腹が空くと自分を食べる!？」 2012年8月31日</p> <p>2. Nakatogawa H. “New approaches toward the elucidation of molecular mechanisms of autophagy.” 2012 Senri Life Science International Symposium on “Cutting Edge of Autophagy Study”. Osaka, Japan, 20/1/2012, Senri Life Science Foundation.</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.ohsumilab.aro.iri.titech.ac.jp/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>中戸川 仁 高校生・一般向け公開講演会 「東工大が誇る若手研究者たち」 －生命科学で探る生物の仕組み、活動－ 「細胞はお腹が空くと自分を食べる!？」 2012年8月31日 東京工業大学大岡山キャンパス(東工大蔵前会館 ロイヤルブルーホール) 参加者51名</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載</p> <p>計0件</p>	
<p>その他</p>	

様式21

7. その他特記事項