



Title	カリウムイオン介在性オートファジー制御機構の研究
Author(s)	松本, 夏
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105353
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松 本 夏)	
論文題名	カリウムイオン介在性オートファジー制御機構の研究
論文内容の要旨	
【研究目的】 オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解・再利用機構であり、細胞質のタンパク質やオルガネラを二重膜に囲い込んでオートファゴソームを形成し、液胞／リソソームで分解することで、アミノ酸等を再供給する。特に飢餓などの栄養ストレス下で強く誘導され、異常タンパク質の除去、ミトコンドリアや小胞体の品質管理、代謝適応、細胞内感染防御など多面的な役割を担っている。近年、オートファジーが飢餓応答だけでなく、その破綻はがんや神経変性疾患など複数の疾患の原因となることが明らかになりつつある。 オートファジー制御において、TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1)、Atg1 (Autophagy-related gene 1)をはじめ複数のキナーゼ（タンパク質リン酸化酵素）の関与がこれまでに明らかとなっている。一方で、ホスファターゼ（タンパク質脱リン酸化酵素）のオートファジー制御への関与は知見が限られている。これは一般的にキナーゼの基質特異性が高く単一欠損で表現型が出やすいのに対し、ホスファターゼは機能の冗長性が高く、単一遺伝子の欠損では表現型が得られにくいことによると考えられる。そこで本研究では欠損系でなく過剰発現を利用したスクリーニングを採用し、出芽酵母を用いた新規オートファジー関連ホスファターゼの同定とその機能解析を目的とした。 【材料及び方法】 実験生物として遺伝操作が行いやすく、ヒトを含む真核生物の中で、現在でもオートファジーの研究において頻繁に使用されるモデル生物である出芽酵母を用いた。遺伝子の過剰発現にはβ-estradiolの添加のみで迅速かつ用量依存的に目的遺伝子の発現を誘導できるβ-estradiol誘導系を用いた。この系はオートファジーのような栄養条件に依存する研究において、酵母で用いられる他の銅、糖、メチオニンの添加などの誘導系よりも一層有用である。オートファジー誘導には、TORC1阻害剤であるrapamycin添加または窒素飢餓を用いた。オートファジー活性の評価には、オートファジーによって分解を受けるAtg8にGFPタグを付与し分解率を計測するGFP-Atg8クリベージアッセイ、または液胞酵素に改変を加えオートファジーによってのみ活性化するアルカリホスファターゼを用いたALPアッセイを用いた。オートファジー関連因子の評価には内在性タンパク質の顕微鏡観察および基質のリン酸化バンドの定量を用いた。細胞内K^+は95℃で加熱抽出した酵母の上清中のK^+濃度を計測し、総細胞数と生存細胞率で補正した。 【結果】 酵母のホスファターゼ43種類のうち典型的と考えられる39種類についてオートファジーが通常抑制される富栄養下で、過剰発現によりオートファジーを誘導するホスファターゼをスクリーニングした。その結果、パラログであるPpz1およびPpz2(以下Ppz1/Ppz2)に着目した。これらは、K^+トランスポーターを阻害することが知られていたが、オートファジーとの関連は報告されていなかった。この過剰発現によるオートファジー誘導はPpz1/Ppz2のホスファターゼ活性がない変異体では生じず、脱リン酸化機能を介してオートファジーを誘導することが示唆された。さらに、栄養状態の中心的調節因子であるTORC1の活性変化を基質であるSch9およびAtg13のリン酸化によって確認すると、その活性が低下していないことから、Ppz1/Ppz2の過剰発現によるオートファジー誘導はTORC1下流で生じていることが明らかになった。 次に欠損系では、PPZ1単独欠損でrapamycin処理による飢餓誘導後オートファジー活性が約半減し、PPZ2単独欠	

損は野生型に近いが、*ppz1Δ ppz2Δ* 二重欠損ではさらにオートファジーが低下した。このことからPpz1/Ppz2は機能的に重複してオートファジー誘導に必要であるということが示された。*ppz1Δ ppz2Δ* のオートファジー関連因子への影響も解析した。TORC1が飢餓を感知すると、TORC1の活性が低下し、その下流のAtgタンパク質群へとシグナルが伝わっていく。TORC1の飢餓における活性変化を確認すると、*ppz1Δ ppz2Δ* ではオートファジー不全を示すにも関わらず、野生型と同様に十分な不活性化を認めた。したがって、*ppz1Δ ppz2Δ* はTORC1の制御には影響しないことが明らかになった。続いてTORC1の下流に位置するオートファジー関連因子Atg群のうち、最上流と最下流に位置するAtg1, Atg2はいずれも野生型と*ppz1Δ ppz2Δ* でオートファジーの隔離膜形成の起点となる輝点

(PAS:Pre-autophagosomal structure) を形成した。しかし、Atg群の最上流因子でオートファジーの開始段階を担うAtg1のキナーゼ活性が*ppz1Δ ppz2Δ* では低下していることが明らかとなり、Ppz1/Ppz2はAtg1の活性化に必要であることが示唆された。

Ppz1/Ppz2は主に形質膜に局在していたのに対して、Atg1は主に液胞近傍に局在するため、直接の基質である可能性が低いと考え、Ppz1/Ppz2の既知の基質である形質膜上のK⁺トランスポーターTrk1/Trk2とK⁺を介したオートファジーに着目した。*TRK1*と*TRK2*を*ppz1Δ ppz2Δ* 二重欠損株からさらに欠損すると、*ppz1Δ ppz2Δ* におけるオートファジー不全が回復した。また、K⁺を大幅に低減した合成培地で*ppz1Δ ppz2Δ* のオートファジー活性が回復した。以上から、細胞内K⁺濃度の低下が飢餓によるオートファジー誘導に必要であることが示唆された。実際に細胞内K⁺濃度を計測すると、野生型では飢餓により細胞内K⁺濃度が有意に低下したのに対し、*ppz1Δ ppz2Δ* では低下が著しく抑制された。さらに、富栄養下でのPpz1/Ppz2の過剰発現によるオートファジー誘導も、K⁺, Na⁺を排出してH⁺を取り込むK⁺, Na⁺/H⁺アンチポーター*NHA1*欠損による細胞内K⁺濃度上昇で軽減した。これらの結果から、富栄養下でも細胞内K⁺が低下することによってオートファジーが誘導されることが考えられる。

【結論及び考察】

本研究では、Ppz1/Ppz2の過剰発現が富栄養条件下でオートファジーを誘導する一方、TORC1の不活性化を伴わないことを示した。さらに*ppz1Δ ppz2Δ* 株は飢餓によりTORC1が飢餓を感知し不活化するのにも関わらず、Atg1活性化が十分起こらず、オートファジー不全を呈することを明らかにした。Ppz1/Ppz2の主な局在が形質膜である点、Ppz1/Ppz2の既知の基質であるTrk1/Trk2が形質膜上で細胞内にK⁺を取り込むことを考慮すると、Ppz1/Ppz2はTrk1/Trk2依存的なK⁺の取り込みを抑制し、細胞内K⁺濃度の低下を介してオートファジーを誘導すると考えられる。

実際に*ppz1Δ ppz2Δ* のオートファジー不全が*TRK1*, *TRK2*の追加欠失や低K⁺培地により回復し、逆にPpz1/Ppz2過剰発現によるオートファジー誘導がK⁺を細胞外に排出する*Nha1*欠失により弱まったこと、さらに*ppz1Δ ppz2Δ* では飢餓でも細胞内K⁺濃度が高く維持されたことは、飢餓応答における「Ppz1/Ppz2→Trk1/Trk2抑制→細胞内K⁺濃度低下→Atg1活性化→オートファジー開始」という関係を支持する。K⁺は膜電位やH⁺駆動力を介して広範な細胞状態を変化させうため、本研究ではK⁺濃度低下自体がAtg1の活性化に影響するかまでは明らかとなっていないが、今後Atg1を含む初期因子群 (Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31複合体) を再構成し、K⁺やH⁺などのイオンが複合体形成能やAtg1のリン酸化活性にどのような影響を及ぼすかを評価、検証する必要がある。

Ppz1/Ppz2とTrk1/Trk2自体は真菌特異的であるが、脱リン酸化酵素がK⁺チャネル制御に関わる例や、K⁺流出がオートファジーや細胞死、免疫応答に関与する報告もあるため、細胞内K⁺恒常性を軸としたオートファジー制御の解明は、酵母にとどまらず高等真核生物のストレス応答・疾患理解への一助となることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 本 夏)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	野田 健司
	副 査	教授	田熊 一敬
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	准教授	村上 智彦

論文審査の結果の要旨

オートファジーは細胞内分解・再利用機構であり、真核生物に広く保存されていることより、その分子機構の理解において出芽酵母がモデル細胞として極めて有用であった歴史がある。松本夏氏は、本来オートファジーが誘導されない富栄養条件下でも、出芽酵母に存在する全てのプロテインホスファターゼをそれぞれ人為的に過剰発現させることで、オートファジーが誘導させることができるものをスクリーニングし、Ppz1/Ppz2 を同定した。rapamycin 処理による飢餓誘導後オートファジー活性が *ppz1Δ ppz2Δ* 二重欠損では低下し Ppz1/Ppz2 は機能的に重複してオートファジー誘導に必要であるということが示された。

Ppz1/Ppz2 の既知の基質である形質膜上の K^+ トランスポーター Trk1/Trk2 と K^+ を介したオートファジーに着目し *TRK1* と *TRK2* を *ppz1Δ ppz2Δ* 二重欠損株からさらに欠損すると、*ppz1Δ ppz2Δ* におけるオートファジー不全が回復した。また、 K^+ を大幅に低減した合成培地で *ppz1Δ ppz2Δ* のオートファジー活性が回復した。以上から、細胞内 K^+ 濃度の低下が飢餓によるオートファジー誘導に必要であることが示唆され、富栄養下でも細胞内 K^+ が低下することによってオートファジーが誘導されると考えられた。

以上の結果は、これまで十分な理解がされていないオートファジー制御における K^+ および Ppz1/2 の役割を示すものであり、博士（歯学）に値するものとする。