



Title	オートファジー機構の解明
Author(s)	明間, すずな
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60317
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	あけま すずな 明間 すずな	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者名	まつもと なつ 松本 夏	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	3 年
					年
					年
					年
アドバイザー 教員 氏名	野田 健司	所属	歯学研究科 口腔科学フロンティアセンター		
研 究 課 題 名	オートファジー機構の解明				
研究成果の 概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

研究目的

オートファジーとは、主に飢餓の時に見られる自食作用のことである。飢餓状態のとき細胞はオートファジーにより細胞内に元々ある細胞質成分を分解して、新たな合成の材料とし飢餓に適応する。オートファジーの過程には 2016 年度のノーベル賞を受賞された大隅先生がおもに発見された Atg タンパク質を中心として様々な因子が働いていることが分かっている¹⁾。しかし複雑な膜動態を伴うオートファジーにはまだわかっていないことが多く、我々は新たなオートファジー関連因子の同定を目的に実験を行った。

研究計画

オートファジーの制御にはリン酸化、脱リン酸化が重要であることが知られている。リン酸化酵素（キナーゼ）については知見が多く報告されているのに対し、脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）の知見はほとんどない。キナーゼは基質特異性が高いため欠損株でその表現型が出やすいが、ホスファターゼは基質特異性が低く機能重複しているため、変異による表現型が出にくい。そのため、過剰発現で機能を亢進させることによってオートファジーへ影響を与えるホスファターゼの同定を試みた。フロンティアセンターでは出芽酵母の全ホスファターゼ 40 種についてスクリーニングを行っており、富栄養条件下でオートファジーを誘導するホスファターゼとして Ppz1,2 が同定されていた。二つは相同な機能を持ったパラログであり、これらはカリウムトランスポーターを抑制することが報告されている²⁾が、オートファジーへ関与は知られていない。我々はこの Ppz1,2 がどのようにオートファジー制御へ関与するのか調べた。

研究方法・研究経過

実験にはヒトホルモンを添加することで発現誘導が起こる系を用い、酵素活性をもつ Ppz1,2 と酵素

活性欠損させた変異体、Ppz1d, Ppz2d の過剰発現を起こす株を作成し用いた。Ppz1,2 について次に示す 1-3 の実験を行った。

1. Ppz1,2 の基質の同定

Tonks らはホスファターゼの活性部位中のアミノ酸残基の変異により活性を消失したホスファターゼ変異体が基質タンパク質と強く結合することを見出している³⁾。我々は Atg タンパク質が Ppz の基質であると考え、免疫沈降法を用いて酵素活性欠損させた Ppzd を精製し、結合している Atg タンパク質を抗体により検出しようと試みた。

Atg1, Atg2, Atg3, Atg7, Atg8, Atg9, Atg11, Atg12, Atg17, Vps34 について検出を行った。検出の結果、図 1 のように Ppzd と結合している Atg タンパク質は検出されず、この方法で Ppz の基質を特定することはできなかった。

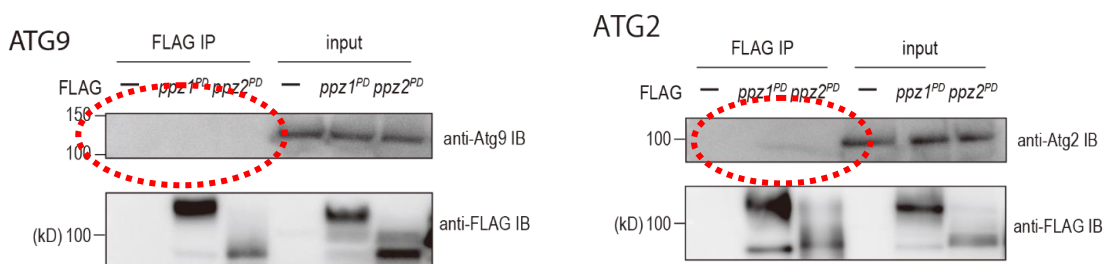


図 1 精製した Ppz に結合するタンパク質の検出

2. オートファジーにおける Ppz1,2 の作用点の同定

ほぼ全ての Atg タンパク質は飢餓に呼応して液胞近傍に集積し、PAS と呼ばれるドット構造を形成する⁴⁾。PAS はオートファゴソーム形成開始の場であると考えられており、PAS の形成はオートファジー活性の指標の一つとなる。蛍光タンパク質である GFP を融合させた Atg タンパク質を発現する株を作成し、蛍光顕微鏡を用いて PAS が形成されているかを観察した。

観察は富栄養条件下で Atg8 と Atg13 について行った。酵素活性がある Ppz1,2 の過剰発現株で Atg8 の PAS への集積が見られたが酵素活性を失った株では PAS への集積はなかった。(図 2-1)

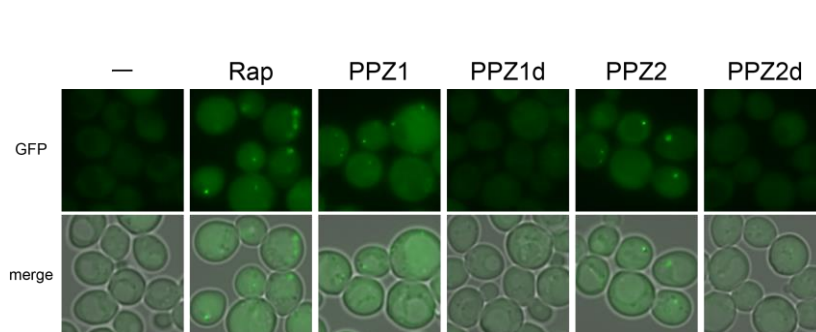


図 2-1 Atg8 の蛍光顕微鏡観察

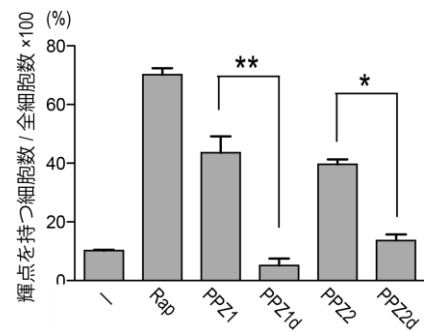


図 2-2 顕微鏡観察の定量化

また、Atg8 について観察した細胞における PAS を持つ細胞の数を算出したところ、酵素活性の有無で有意差が見られた。このことから富栄養条件下でも Atg8 は Ppz の酵素活性に依存して PAS に集積していることが考えられる。(図 2-2)

さらに、オートファジー誘導の最上流因子である Atg13 について観察したところ Ppz の過剰発現で Atg13 の PAS への集積は見られなかった。(図 2-3)

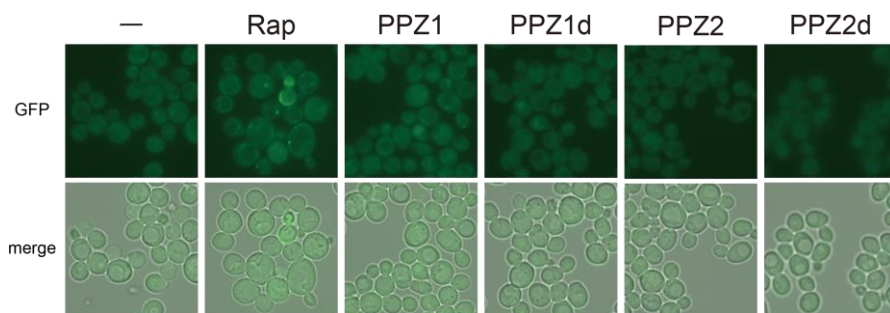


図 2-3 Atg13 の蛍光顕微鏡観察

Ppz の過剰発現によって Atg8 は PAS へ集積するが、Atg13 は集積しないことから、Ppz は Atg13 よりも下流に働くことによってオートファジーを誘導していると考えられる。

3. Ppz1,2 二重欠損株のオートファジーへの影響

最後に、ホスファターゼは欠損では表現型が出にくいと言われていたが、Ppz1,2 の二重欠損株を作成し、オートファジー活性を Atg8 の GFP-cleavage assay によって検討してみた。GFP-cleavage assay はオートファジーの活性を測る生化学的手法である。Atg8 はオートファゴソーム形成に必須の因子で、オートファゴソーム膜上に存在し、液胞内に運搬された後、分解される。Atg8 に蛍光タンパク質である GFP を融合させると GFP は強固な構造のために分解せれずに SDS-PAGE 上で遊離 GFP として検出され、この量をもってオートファジー活性をはかることができる。

Ppz1 欠損株、Ppz2 欠損株、野生株のラパマイシン処理時のオートファジー活性を比較した。Ppz1 欠損株では野生株に比べて遊離 GFP の出現量が少なく、Ppz2 は野生株と同様の出現量であった。二重欠損株では遊離 GFP が全く検出されなかった。図 3-1 を定量化し図 3-2 が得られたが、このグラフからも Ppz1 欠損株は野生株とくらべて有意にオートファジー活性の低下が見られ、Ppz2 は野生株と活性の差がないということが裏付けられた。このことから、オートファジー経路には主に Ppz1 が必要であることが示唆された。

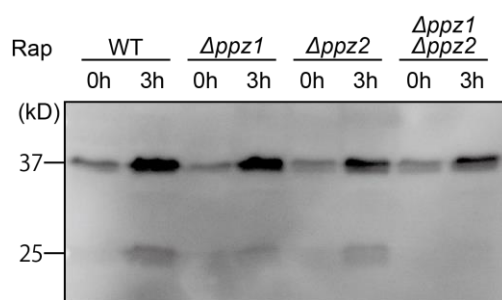


図 3-1 Ppz 欠損株のオートファジー活性

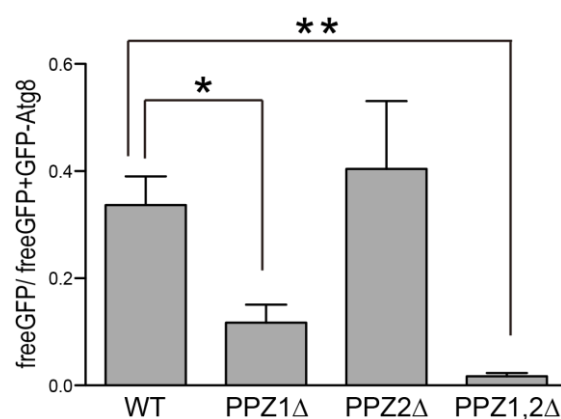


図 3-2 オートファジー活性の定量化

研究成果

Ppz はオートファジーに必須の因子を脱リン酸化することでオートファジーを誘導していると考えられる。本実験では、Ppz のオートファジー誘導はその酵素活性によること、オートファジーの最上流因子 Atg13 よりも下流の因子に作用することが示唆された。また、欠損株を用いた実験では、オートファ

ジの誘導には主に Ppz1 が関与していること、Ppz1,2 二重欠損株ではオートファジーがほとんど起こっていないことが示唆された。

今後の展望

本実験では Ppz の基質の同定をすることができなかったため、二重欠損株における PAS 形成や、質量分析法を用いて相互作用因子を単離し基質を同定しようと現在試みている。また、Ppz 過剰発現によって誘導されるオートファジーをより詳細に調べることによって、Ppz の作用点・役割がさらに明らかになることが期待される。

参考文献

- 1) Mizushima N., Yoshimori T. and Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011,27:107-132
- 2) Yenush L., Mulet JM., Ariño J. and Serrano R. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 2002, 21:920-929
- 3) Flint AJ., Tiganis T., Barford D. and Tonks NK. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94:1680-1685.
- 4) Suzuki K., Kirisako T., Kamada Y., Mizushima N., Noda T. and Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 2001, 20:5971-5981.