



Title	ホスファターゼが介在する新規オートファジー制御機構の解明
Author(s)	松本, 夏
Citation	平成29年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2018
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/68106
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成 29 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	まつもと なつ 松本 夏	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	あけま すずな 明間 すずな	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4 年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	荒木 保弘	所属	歯学部 口腔科学フロンティアセンター		
研究課題名	ホスファターゼが介在する新規オートファジー制御機構の解明				
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。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

[研究目的]

オートファジーは酵母からヒトに至るまで真核生物に普遍的に存在する細胞内分解機構である。オートファジーは主に飢餓によって誘導され、オートファゴソームという小胞で細胞質成分を取り囲み液胞に輸送し解することで飢餓時に栄養源やエネルギーを供給している。また、細胞内に侵入した細菌をオートファジーによって除去する機構も知られている。オートファジー制御において、TORC1, Atg1 を始め複数の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、キナーゼに相反する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ない。これは脱リン酸化酵素の機能的重複が原因であると考えられる。前年度の研究により脱リン酸化酵素 Ppz1, Ppz2 がオートファジーを負に制御することが明らかになったため、私たちは引き続きこれらがどのようにオートファジー機構に関与しているか解明を行った。

[研究計画]

オートファジーを負に制御する TORC1 やオートファジー関連因子 (Atg タンパク質) の酵素活性と挙動から、脱リン酸化酵素 Ppz1, Ppz2 のオートファジーでの作用点を、Ppz1, Ppz2 を抑制するタンパク質の挙動から Ppz1, Ppz2 の状態を明らかにすることができる。さらに Ppz1, ppz2 はカリウムトランスポーター Trk1, Trk2 を抑制することが知られていたため、このカリウムトランスポーターを欠失させることでオートファジー機構に関連しているかを評価できる。

[研究方法]

- 実験 1. Ppz1, Ppz2 を欠損した細胞で Atg タンパク質に蛍光蛋白質 GFP を融合させオートファジー関連蛋白質の細胞内挙動を観察する。また、Atg タンパク質を直接基質としオートファジー誘導を負に制御する TORC1 とオートファジー始動の最初の因子の Atg1 の二つのキナーゼの酵素活性をそれぞれの基質の Vpa34 と Atg13 のリン酸化状態を指標に検証する。
- 実験 2. Ppz1, Ppz2 欠損によるオートファジー不全がカリウムトランスポーター Trk1, Trk2 を介するカリウムの流入に依存しているかどうか、Trk1, 2 をさらに欠失し GFP-Atg8 の切断を指標にオートファジー不全が回復するか検討する。

実験 3. Ppz1 を抑制するタンパク質として Hal3 が報告されていた。Hal3 は Ppz1 と結合しその働きを抑制するため、飢餓前後でこれらの結合度が変化していないか Ppz1 に結合している Hal3 定量化を行い、そのオートファジー機構への影響を検討した。

[研究成果]

実験 1.

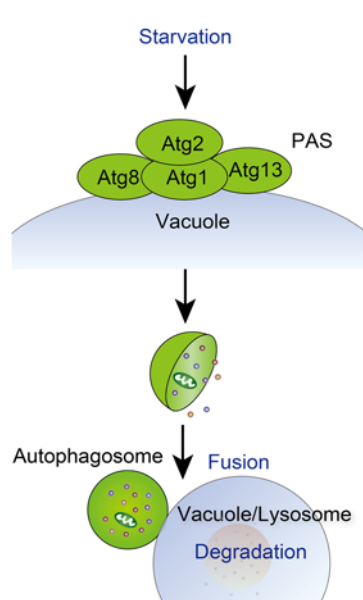


図 1. オートファジーの流れ

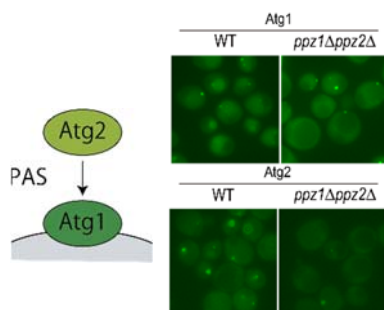


図 2. Ppz1, 2 を欠損させると Atg1 は集積するが Atg2 はしない

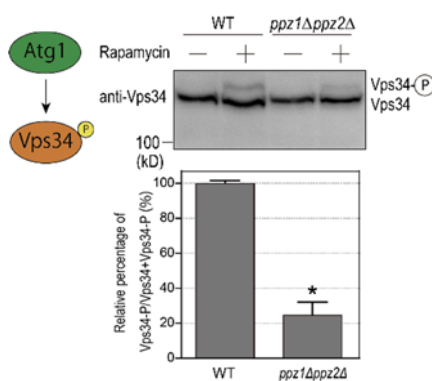


図 3. Ppz1, 2 を欠損させると Atg1 活性が低下する

飢餓状態では Atg タンパク質が液胞近傍部に集まることが知られている(図 1)。種々の Atg タンパク質を検討したところ、Atg1 では二重欠損株でも野生株同様に集積が観察されたが、Atg2 では二重欠損株で集積が顕著に減少していた(図 2)。さらに Atg1 の活性を測定すると、ppz1,2 二重欠損株では Atg1 の基質である Vps34 のリン酸化率が野生株に比べ優位に低下した(図 3)ことから、二重欠損時は Atg1 の活性が低下していたとわかる。これらの形態学的・生化学的結果から Ppz1,2 は Atg1 の活性化に必須であることが明らかになった。

実験 2.

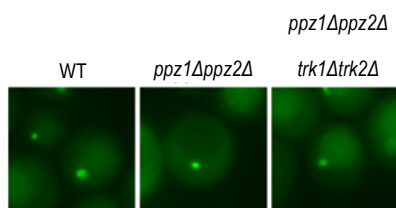
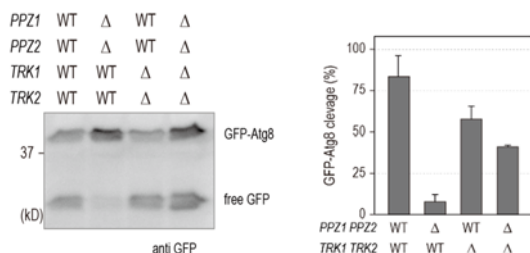
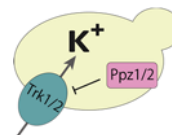


図 4. Ppz1, 2 Trk1, 2 四重欠損株ではオートファジー活性が回復する

ppz1,2 に加え trk1,2 の四重破壊株ではオートファジー活性は野生株同等に回復した(図 4)。このことから Ppz1,2 は Trk1,2 依存的にオートファジーに関与していることが明らかになった。Ppz1,2 はともに栄養状態に関わらず恒常的に細胞膜上に存在し(図 5)、この局在は Ppz1,2 が細胞膜上のカリウムトランスポーター Trk1,2 を制御するという知見に一致する。また、Ppz1 は Ppz2 と比較し発現量が大きく上回っており、実験 2 で得られたオートファジー活性への影響の差はこの発現量の違いに起因すると考えられる。



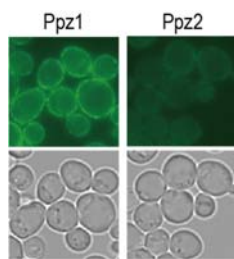


図 5. Ppz1,2 は細胞膜に局在する

実験 3.

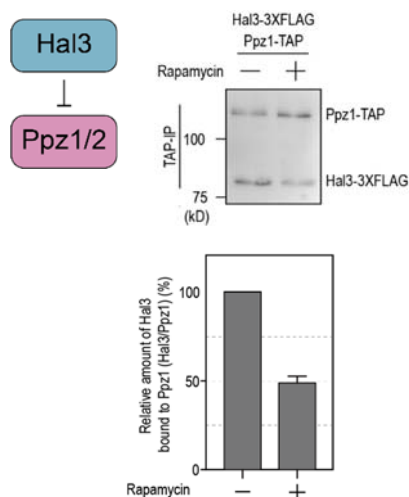
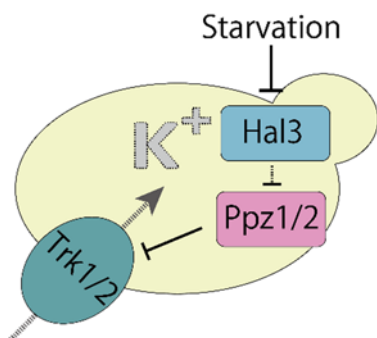


図 6. 飢餓状態では Ppz1 に結合する Hal3 の量が減少する

Hal3 は Ppz1 を抑制するタンパク質のひとつで、飢餓前後の全 Ppz1 に対する Ppz1 に結合している Hal3 の量を定量化すると、飢餓前に比べ飢餓時はその結合量が約半分となった(図 6)。このことから飢餓時は Hal3 による Ppz1 の抑制が外れ、Ppz1 が活性化できることが分かる。

[考察]

以上の結果から、我々は、*PPZ1, PPZ2* 欠損におけるオートファジー不全は、飢餓時に Ppz1, Ppz2 が抑制するはずのカリウムトランスポーター Trk1, Trk2 が過剰に働き、細胞内にカリウムが大量に流入するため生じるのではないかと。また野生型では Hal3 が飢餓時に Ppz1 を抑え、Trk1, Trk2 が働きカリウムが流入し、オートファジーが起こっておるのではないかとというモデルを提案する。



[参考文献]

1) Yenush L., Mulet JM., Ariño J. and Serrano R. (2002) 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* 21:920-929

2) Yenush L1, Merchan S, Holmes J, Serrano R. (2005) pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. Mol Cell Biol. Oct;25(19):8683-92.

3) Muñoz I1, Ruiz A, Marquina M, Barceló A, Albert A, Ariño J. (2004) Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: a mutagenesis study. J Biol Chem. Oct 8;279(41):42619-27. Epub 2004 Jul 29.