

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

吉森 保

(情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系 教授)

「たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム」

1. 研究実施の概要

真核細胞内部では種々の膜オルガネラ間を分子が往来し、物流のネットワークが形作られている。分子のやり取りは、たんぱく質に制御されたダイナミックな膜の動き（分離・移動・伸長・融合等）を介したメンブレントラフィックと呼ばれる輸送機構によって行われる。このシステムは高等生物において特に発達し、多細胞社会の運営に欠かせない種々の機能を担っており、その破綻は様々な疾患の原因となる。本研究は、未知の部分の多い物流経路エンドソーム系とオートファジーに焦点を絞り、その分子メカニズムの解明と高次生体機能と疾患における役割の究明を目指すものである。

本研究開始後、オートファジーを担うオルガネラ・オートファゴソーム形成に関わる分子の同定など分子機構の理解に貢献する成果を得た。さらに、エンドソーム系とオートファジーの両者について、メンブレントラフィックの分子解剖に極めて有効な方法論であるセミインタクト細胞を用いた膜ダイナミクスの再構成系の確立に成功し、それを用いた解析に着手している。また機能的意義については疾患との関わりを重点的に解析し、エンドソーム輸送制御分子と脂質蓄積病の原因遺伝子産物の機能的連関、オートファジーによるフォールディング異常タンパク質排除や細胞内に侵入した病原性細菌の効率的な隔離と殺菌を発見した。

今後は、これらのメンブレントラフィックの分子基盤を明らかにして行くと共に、判明した疾患における役割の解析をさらに進め、臨床医学に資する知的財産の創出を図る。

2. 研究実施内容

[エンドソーム系] エンドソームでは、運び込まれた分子が選別され、細胞膜、リソソーム、ゴルジ体という異なる目的地に向け発送されている。この選別は、細胞の増殖制御等種々の機能に結びつく重要な過程である。そのようなエンドソームにおける選別と輸送の分子機構を明らかにし、発癌や脂質蓄積病等エンドソームに関わる疾患の発症機序を探ることを目的とする。平成15年度までに、エンドソーム～リソソーム輸送を定量的にモニターする系を確立し、セミインタクト細胞を用いてその輸送の再構成に成功した（未発表）。この実験系を用いれば、輸送を制御する細胞質因子の探索などが可能となる。ま

たエンドソーム輸送に関わるSKD1タンパク質の機能解析をRNA干渉法により行い、SKD1がエンドソーム→リソソーム輸送を特異的に制御していることを見いだした（未発表）。また、エンドソームへのコレステロール蓄積を伴う脂質蓄積病の一種C型ニーマンピック病の原因タンパク質NPC1とSKD1が結合することが判明した（鳥取大・二宮治明博士らとの共同研究、未発表）。SKD1の過剰発現は、NPC1欠損細胞におけるコレステロール蓄積を解除する。SKD1は、NPC1との結合を介してコレステロール輸送にも関与しているものと思われる。さらに、エンドソーム機能に関与すると思われる新規タンパク質Tom1の機能解析にも着手した（北大・横沢英良博士らとの共同研究）。

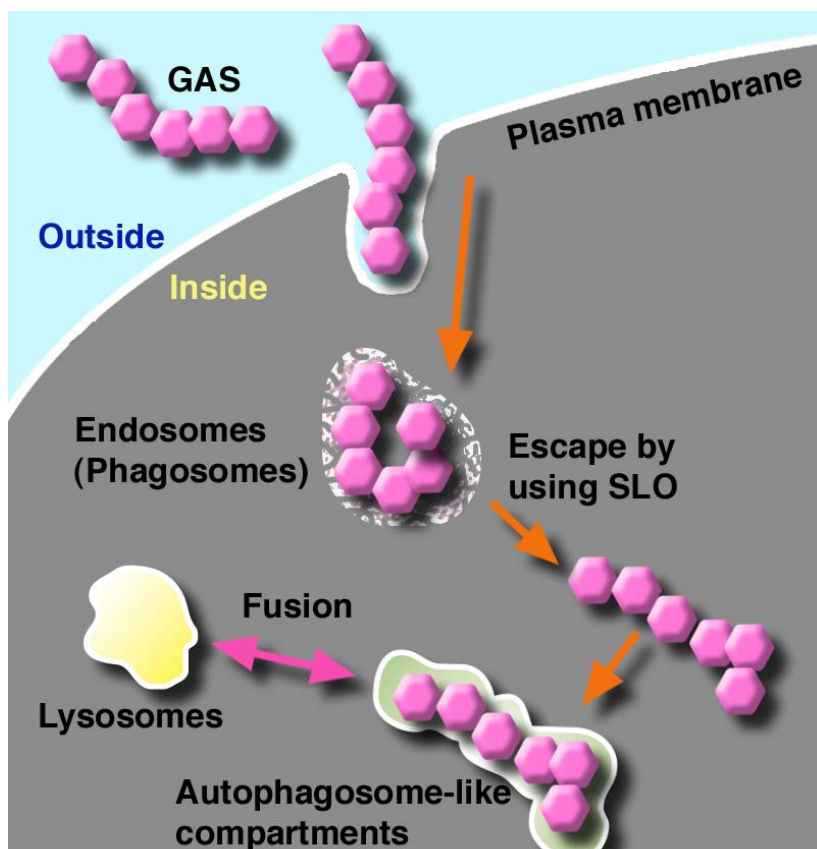
[オートファジー] 細胞を構成するタンパク質の大部分は、最終的にオートファジーによりリソソームに運ばれ分解・再利用されている。オートファジーは細胞成分の代謝回転や飢餓時の栄養源確保に加え、発生・分化や様々な疾患とも密接に関係すると考えられているが、その分子機構や生理的病理的意義には不明の点が多い。本研究では、オートファジーの分子機構と生理機能、特に疾患における役割を明らかにすることを目指す。分子機構については、1) オートファジーを担う膜構造オートファゴソームの形成に必須のタンパク質Atg5を修飾する酵素Atg10を同定（文献8）、2) 上述のSKD1に関わるエンドソーム→オートファゴソーム間輸送が、オートファゴソームとリソソームの融合に必須であることを発見（文献11）、3) Atg5が、約800kDaの巨大分子複合体を作ることを示し、その成分である新規タンパク質Atg16Lを同定した（文献6）。

実験手法の開発についても進展があった。エンドソーム系の場合と同様のセミインタクト細胞を用い、オートファゴソームの前駆体となる小胞の形成を再構成することができた（未発表）。これを用いて、オートファジー誘導機構の解析を実施中である。また、GFP-LC3を全身に発現するトランスジェニックマウスを作成し、各組織におけるオートファジー誘導を容易に検出できるようにし、網羅的な解析を行いつつある。Atg5遺伝子破壊マウスの作成も進行中なので、その解析からオートファジーの機能的意義に関する情報が得られるであろう。

疾患の解析ではオートファジーの新しい機能を発見するに至った。

Unfolding病：延長ポリグルタミン鎖（PolyQ）と α_1 アンチトリプシンのZ変異体は、細胞内に蓄積し凝集することで、各々ハンチントン舞蹈病等の神経変性疾患と肝不全を引き起こす。Atg5遺伝子破壊細胞を用いた解析などから、オートファジーがこれらの異常タンパク質を認識し特異的に分解することを明らかにした（京大・垣塚彰博士、阪大・永井義隆博士、Pittsburgh大・David Perlmutter博士らとの共同研究、投稿準備中）。上述のセミインタクト細胞による再構成系でも、PolyQが長さ依存的に前駆体小胞形成を誘導したので、今後オートファジーの特異的誘導とPolyQ認識メカニズムの分子解剖を行う。

感染症：A群連鎖球菌(GAS)は、ヒトの咽頭粘膜などに広汎に分布し、それによる咽頭炎などの感染症は極めて患者数が多い。時として、死亡率数10%の劇症感染症を引き起こすので恐れられている。この菌は、非貪食系細胞にも高頻度に侵入するが、その意義や侵入後の運命などはよく分かっていなかった。今回我々は、GASが、エンドサイトーシス経路



細胞内に侵入したGASの運命： エンドソームから毒素作用により細胞質に脱出したGASは、しかしオートファゴソームに捕らえられる。そこにリソソームが融合し、消化酵素によりGASは殺される。オートファジー不能細胞では、GASは増殖し細胞外に出てしまう。GASが細胞内に侵入しにくいマウスはGAS感染による致死率が高いことから、オートファジーによる殺菌が病原性抑制に大きな役割を果たしていることが推測される。

を経て細胞内に侵入後エンドソームから細胞質に抜け出すが、そこでオートファジーにより認識され極めて効率よくオートファゴソーム様構造に隔離され、最終的に90%以上の菌が殺されることを、GFP-LC3やAtg5遺伝子破壊細胞を用いた解析から示した。オートファジーが自然免疫機構の一端を担うことを明確に示した初めての例である（阪大・天野敦雄博士、中川一路博士らとの共同研究、論文投稿中）。

以上の疾患解析の成果は、様々な意味を持つ。これまで非特異的と考えられてきたオートファジーが特異的に標的を認識

する可能性があること、正常タンパク質の分解に留まらず有害な異物除去に働くこと、細胞内侵入性の病原微生物の生存戦略にオートファジーへの対抗手段が含まれることが予想されること、等オートファジーの分子機構と変性疾患や感染症の発症メカニズムの両面で重要な知見が得られた。

3. 研究実施体制

吉森グループ

- ① 研究分担グループ長：吉森 保（情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系、教授）
- ② 研究項目：単一グループの編成なので全研究を担当

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○ Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H.

Tom 1, a VHS domain-containing protein, interacts with Tollip, ubiquitin,

and clathrin

J. Biol. Chem. 278, 52865-72 (2003)

- Kanazawa C, Morita E, Yamada M, Ishii N, Miura S, Asao H, Yoshimori T, Sugamura K.
Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation
Biochem. Biophys. Res. Commun. 309, 848-856 (2003)
- Katoh K, Shibata H, Suzuki H, Nara A, Ishidoh K, Kominami E, Yoshimori T, Maki M.
The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting.
J. Biol. Chem. 278, 39104-39113 (2003)
- Ohashi M, Mizushima N, Kabeya Y, Yoshimori T.
Localization of Mammalian NAD(P)H Steroid Dehydrogenase-like Protein on Lipid Droplets.
J. Biol. Chem. 278, 36819-36829 (2003)
- Saeki K, Hong Z, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, You A.
Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells.
J. Leukoc. Biol. 74, 1108-1116 (2003)
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T.
Mouse Apg16L, a Novel WD Repeat Protein, Targets to the Autophagic Isolation Membrane with the Apg12-Apg5 Conjugate.
J. Cell Sci. 116, 1679-1688 (2003)
- Fujita H, Yamanaka M, Imamura K, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, and Himeno M
A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: Class E vps phenotype.
J. Cell Sci. 116, 401-414 (2003)
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y.
Mouse Apg10 as an Apg12 conjugating enzyme: Analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method.
FEBS let. 532, 450-454 (2002)
- Ikonomov OC, Sbrissa D, Yoshimori T, Cover TL, Shisheva A.
PIKfyve kinase and SKD1 AAA ATPase define distinct endocytic compartments:

only PIKfyve expression inhibits the cell-vacuolating activity of helicobacter pylori VacA toxin.

J. Biol. Chem 277 46785-46790 (2002)

- Suzuki T, Nakagawa M, Yoshikawa A, Sasagawa N, Yoshimori T, Ohsumi Y, Nishino I, Ishiura S, Nonaka I.

The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy.

J Biochem. 131 647-51 (2002)

- Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T.

SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation

Cell Struct. Funct. 27 29-37 (2002)

(2) 特許出願

なし