

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	オートファジーによるグリコーゲン分解の分子機構
Title(English)	
著者(和文)	礪田隆宏
Author(English)	Takahiro Isoda
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12835号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,田口 英樹,中戸川 仁,藤田 尚信,加納 ふみ
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12835号, Conferred date:2024/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

オートファジーによるグリコーゲン分解の分子機構

東京工業大学生命理工学院

2019 年度博士課程入学

氏名 礒田隆宏

指導教員名 岩崎博史

目次

要旨	4
第 1 章 序論	7
オートファジーの概要	7
選択的オートファジー	11
本研究の目的	17
第 2 章 結果	18
オートファジーの基質の網羅的解析	18
グリコーゲン代謝関連酵素はグリコーゲン依存的にオートファジー分解を免れる	19
グリコーゲンはオートファジーの基質になりにくい細胞内成分である	20
長時間の窒素源飢餓時にはレセプター依存的なグリコファジーが起こる	21
長時間の窒素源飢餓時に誘導されるグリコファジーには Atg45 が必要である	22
Atg45 の発現増加がグリコファジーを促進する	24
Atg45 はグリコファジーレセプターである	25
Atg45 の C 末端の膜結合領域はグリコファジーに必要である	27
Atg45 は孢子形成時のグリコーゲン量の維持に必要である	29

第3章 考察	31
プロテオーム解析について	31
Atg45 の分子機構	33
Atg11 に依存しないレセプター依存的なオートファジーについて	33
グリコファジーの生理的意義.....	34
グリコーゲンが非選択的なオートファジーで分解されにくい理由と Atg45 の役割	35
他の生物種におけるグリコファジーレセプターと Atg45 の比較	36
第4章 実験手法.....	38
謝辞.....	49
参考文献	50
表	63
図	75

要旨

マクロオートファジー（オートファジー）は細胞内成分を分解する機構である。新規に合成された隔離膜が細胞内成分を取り囲みながら伸長し、最終的にオートファゴソームと呼ばれる細胞内成分を取り囲んだ小胞となる。オートファジーは非選択的な分解機構だと考えられていたが、選択的にオルガネラやタンパク質を分解する選択的オートファジーが報告され、従来考えられていたよりも複雑な基質選択性が存在することが明らかとなった。オートファジーの基質選択性についてはいまだ未解明な点が多く、本研究では、オートファジー基質の網羅的解析を行うことで新知見を得ることを目的としスタートした。

オートファジーの基質を内包する小胞（オートファジックボディ）を精製し、プロテオーム解析を行ったところ、Gsy2などのグリコーゲン代謝関連酵素がサイトゾルに存在するにも関わらずオートファジックボディから排除されていることが明らかとなった。また、グリコーゲン代謝関連酵素は、オートファジー誘導条件である窒素源飢餓時にグリコーゲン依存的にサイトゾル内で偏った局在を示すこと、グリコーゲン合成不全株では、グリコーゲン代謝関連酵素の分解が増加することがわかった。更に、電子顕微鏡による解析からグリコーゲン自体も窒素源飢餓時にサイトゾルに存在するにも関わらず、オートファジーの基質となりにくいことが明らかとなった。

以上の結果から、グリコーゲンがオートファジーの基質となりにくい細胞内成分であり、グリコーゲン代謝関連酵素はグリコーゲンに結合することで分解を免れていると考えられた。

選択的オートファジーの一部は長時間の飢餓で強く誘導される。そこで、グリコーゲンのオートファジーも長時間の飢餓で誘導される可能性を考えた。グリコーゲン代謝関連酵素のうちグリコーゲン合成酵素 Gsy2 を指標にグリコーゲンの経時的な分解を評価した。その結果、24 時間などの長時間の窒素源飢餓時には、Gsy2 の分解が増加し、グリコーゲンのオートファジー（グリコファジー）が誘導されることが示唆された。選択的オートフ

ファジーにおける基質選択性は、レセプターによって決定されており、レセプターと Atg8 及び Atg11 への結合が重要である。Gsy2 の分解に対して、Atg11 への依存性は低かったものの、Atg8 のレセプターとの結合に必要な領域が重要であることが明らかとなり、グリコファジーと呼ぶべき選択的オートファジーの経路であることが示唆された。レセプターの探索を目的として、グリコーゲン結合ドメインを有するタンパク質に着目し、グリコファジーに与える影響を評価したところ、機能未知タンパク質 Yil024c がグリコファジーに必要であることがわかり、Atg45 と名付けた。Atg45 は、サイトゾルのタンパク質であり、長時間の窒素源飢餓時に発現が増加し、その過剰発現はグリコファジーを促進した。また、Atg45 は Atg8 に結合し、その結合がグリコファジーに重要であることからグリコファジーレセプターであると結論付けた。更に、Atg45 の C 末端領域には、両親媒性ヘリックスと予測される膜に結合する性質を有する領域があり、この領域もグリコファジーに重要であることが明らかとなった。

胞子形成時に機能するタンパク質の発現を抑制する転写抑制因子 Ume6 により、Atg45 の発現が抑制されることが報告されている。そのため、胞子形成条件でのグリコファジー活性の程度とグリコファジーへの Atg45 の寄与を Gsy2 の分解を指標として評価した。その結果、胞子形成時に Atg45 依存的なグリコファジーが生じることが明らかとなった。また、胞子形成時において、液胞に輸送されたグリコーゲンは液胞内で分解されずに蓄積されることや、Atg45 の欠損株では野生株と比較して細胞内グリコーゲン量が低下することが明らかとなり、胞子形成時のグリコファジーは、グリコーゲンを液胞内に蓄積するために働く機構であることが示唆された。

以上のように、本研究では、プロテオーム解析を端緒とし、これまで報告がほとんどなかった「オートファジーによる分解を受けにくい細胞内成分」として、グリコーゲンやそれに結合するグリコーゲン代謝関連酵素を同定した。また、長時間の飢餓時や胞子形成時には、新規に同定したグリコファジーレセプター Atg45 の発現増加によって、グリコファ

ジーが誘導されることを明らかにした。本研究成果を基盤として、グリコファジーの詳細な分子機序やその意義などについての研究や、グリコーゲンがオートファジーから逃れる仕組みの研究などが進展していくことが期待される。

第1章 序論

オートファジーの概要

オートファジーは細胞内成分の分解機構であり、細胞の恒常性維持に深くかかわっている。オートファジーは、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーに大別できる（図1）¹。なかでも、マクロオートファジー（以下、オートファジー）は最も広く研究されているオートファジー経路であり、最大の特徴は、オートファゴソームと呼ばれる細胞内成分を内包する小胞の形成である。オートファジーでは、隔離膜と呼ばれる脂質膜が合成され、伸長していく過程で細胞内成分を取り囲み、最終的に隔離膜の先端が融合（反応としては膜の分裂）することで、二重の脂質膜で形成されるオートファゴソームとなる。オートファゴソームの外膜は、液胞/リソソームと融合し、内膜が液胞/リソソームの内腔に放出され、リパーゼやプロテアーゼ等の働きによって分解される。酵母においては、Autophagy-related (*ATG*)タンパク質の一つである Atg15 が唯一の液胞内リパーゼとして報告されており、Atg15 の欠損株では、オートファゴソーム内膜が分解されずに液胞内に蓄積する^{2,3}。この液胞内に存在するオートファゴソーム由来の小胞をオートファジックボディと呼ぶ⁴。また、オートファジックボディは、液胞内プロテアーゼ Pep4、Prb1 等の欠損によっても蓄積され、これらのプロテアーゼによる Atg15 の切断による活性制御の存在が示唆される^{4,5}。

また、オートファジーは、電子顕微鏡による内容物の観察などから、非選択的な分解機構であると考えられてきた^{4,6,7}。一方で、レセプタータンパク質と呼ばれる一群のタンパク質が介在することで、選択的に基質を分解することも可能であるとされ、前者をバルク（非選択的）オートファジー、後者を選択的オートファジーと呼ぶ。バルクオートファジーと選択的オートファジーには、共通して必要な因子と、選択的オートファジーにのみ必須となる因子が存在し、前者をコア Atg タンパク質と呼ぶ。これまで、20 個程度のコア

Atg タンパク質が同定されており、これらはその機能に基づいて 6 つのユニットに分類可能である。すなわち、1) Atg1/ULK1 タンパク質キナーゼ複合体、2) Atg9 小胞、3) ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体 I、4) Atg2-Atg18 複合体、5) Atg12-Atg5-Atg16 複合体、6) Atg8-ホスファチジルエタノールアミン(PE)結合反応系の 6 つである⁸。これらは、進化的にも保存されており、酵母と哺乳類において多くの共通したメカニズムが見出されている。以下では、酵母での知見を中心にこれらの機能ユニットについて概説する。

1) Atg1/ULK1 タンパク質キナーゼ複合体

Atg1(哺乳類では ULK1)タンパク質キナーゼ複合体は、Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 からなる複合体であり、オートファゴソーム形成の際には、この複合体の形成が最初期に起こる⁹。Atg13 は Target of rapamycin complex 1 (TORC1)によるリン酸化を受けており、飢餓に伴う TORC1 の活性抑制と、ホスファターゼの活性によってこの脱リン酸化が引き起こされる¹⁰⁻¹³。オートファゴソームの形成時には、コアタンパク質が Pre-autophagosomal structure (PAS)と呼ばれる膜形成の場に集積することが必要となるが、Atg13 の脱リン酸化とそれに伴う Atg1 タンパク質キナーゼ複合体形成とその集積が PAS 形成を誘導する^{9,11-13}。最近、初期の PAS が多数の Atg1 タンパク質キナーゼ複合体が集積した液滴であることが示されており、この液滴形成に伴って、後述する下流の因子が PAS に集積する¹⁴。また、酵母において PAS は液胞膜近傍で形成されるが、液胞膜上のタンパク質である Vac8 が Atg13 と結合し、Atg1 タンパク質キナーゼ複合体を液胞膜上にリクルートすることで、PAS の液胞膜近傍での形成を可能にしていることが報告されており、Vac8 が PAS の形成位置を決定する因子であると考えられている^{15,16}。

Atg1 のキナーゼ活性はオートファジーの進行に必要であり、基質となるタンパク質として、酵母では Atg4 や Atg9 等が知られている^{17,18}。また、最近 *in vitro* のアッセイ系で、

Atg8 の脂質化に関わる Atg16 や Atg3 などリン酸化することが示されており、このリン酸化が Atg8 の脂質化の抑制に関与していることが示されている¹⁹。

2) Atg9 小胞

Atg9 は 6 回膜貫通型タンパク質と推定される膜タンパク質であり²⁰、Atg9 は、ゴルジ体とエンドソームを行き来するとともに、その大部分が Atg9 小胞とよばれる小胞として存在している。Atg9 小胞は、Atg13 や Atg17、選択的オートファジーでは Atg11 に結合して PAS に集積するとされており、ここで集積した Atg9 小胞がオートファゴソーム膜の形成の核になると考えられる²¹⁻²⁵。また、Atg9 はスクランブラーゼ活性を有しており、その活性により、隔離膜の細胞質側と内腔側のリーフレット間の膜輸送を行っていると考えられる^{26,27}。

3) ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体 1 (PI3KC3-C1)

ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ複合体は、触媒サブユニットである Vps34 を中心として、異なる制御サブユニットで構成された主に 2 つの複合体が存在する。すなわち、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ複合体 1 (PI3KC3-C1) とホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ複合体 2 (PI3KC3-C2) の 2 種類である。このうちオートファジーに必須なのは、PI3KC3-C1 であり、PI3KC3-C2 はエンドサイトーシスに関与する²⁸。PI3KC3-C1 は、Vps34、Vps15、Vps30(Atg6)、Atg14 及び Atg38 によって構成される。PI3KC3-C1 がオートファゴソーム関連膜のホスファチジルイノシトール(PI)をホスファチジルイノシトール 3 リン酸(PI(3)P)へとリン酸化し、オートファゴソーム関連膜は PI(3)P が豊富な膜構造となる^{29,30}。その結果、Atg18 や Atg21 などの PI(3)P に特異的に結合するタンパク質がリクルートされ、隔離膜形成が進むと考えられる³¹。

4) Atg2-Atg18 複合体

Atg2 は、オートファゴソームの形成に必須であるが、その機能は長らく不明であった。最近、Atg2 の N 末端と C 末端がそれぞれ膜結合能を有しており、隔離膜とオートファゴソーム膜の脂質供給源である小胞体をつなぎ合わせる可能性が報告された³²。更に、Atg2 の構造解析を基にした研究から Atg2 が巨大な疎水性ポケットを有するタンパク質であり、そのポケットを介して ER から隔離膜のサイトゾル側のリーフレットへとリン脂質を輸送する活性を有することが明らかとなった^{33,34}。これらの事実から、Atg9 小胞などから形成される膜構造に Atg2 の活性により ER から脂質が供給され隔離膜が伸長し、最終的にオートファゴソームになると考えられる。Atg18 は、PI(3)P 結合タンパク質であり、Atg2 を PAS へとリクルートする役割がある³¹。

5) Atg12-Atg5-Atg16 複合体

Atg12-Atg5-Atg16 複合体は、Atg8 とホスファチジルエタノールアミン(PE)の結合を触媒する E3 酵素である。E1 酵素である Atg7 と E2 酵素である Atg10 によって Atg12 と Atg5 が共有結合を形成する³⁵。さらに、Atg12-Atg5-Atg16 複合体が非共有結合によって形成される³⁶。形成された複合体は、PI(3)P 結合タンパク質である Atg21 への結合、隔離膜への直接的な結合、Atg1 や Atg18 への結合などにより、隔離膜にリクルートされる^{37,38}。この隔離膜上への局在により、Atg8 の隔離膜特異的な PE 化を可能にしていると考えられる

6) Atg8-ホスファチジルエタノールアミン(PE)結合反応系

Atg8 はオートファジー関連膜に特異的に局在し、PAS やオートファゴソームのマーカーとしても用いられる。Atg8 は、オートファジー関連膜上の PE と共有結合をつくることで、機能を発揮する。この Atg8 の PE 化は多段階の反応であり、まず、システインプロテアーゼ Atg4 によって C 末端のアルギニンが切断される³⁹。これにより C 末端となったグ

リシン残基に E1 酵素 Atg7 が結合し、E2 酵素 Atg3 に受け渡される⁴⁰。その後、E3 酵素 Atg12-Atg5-Atg16 複合体によって PE 化される⁴¹。また、Atg4 は、Atg8 を脱 PE 化する作用も有しており、これにより Atg8 が膜から乖離し、リサイクルされると考えられる^{39,42}。Atg8 は、多機能タンパク質であると知られており、隔離膜の伸長や内膜の分解、膜融合などに関わると報告されている⁴³⁻⁴⁶。また、後述するように、選択的オートファジーでも基質の選択に重要な役割を担う⁴⁷。

選択的オートファジー

選択的オートファジーでは、バルクオートファジーと異なり、特定の基質を優先的にオートファゴソームに取り込む。Ape1 複合体や、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体、核、リソソーム、グリコゲンなどに対する選択的分解が報告されており、それぞれ、Cvt 経路、マイトファジー、ペキソファジー、ER ファジー、ヌクレオファジー、リソファジー、グリコファジーと呼ばれている⁴⁸⁻⁵³。これらの選択的オートファジーでは、レセプター/アダプターと呼ばれるタンパク質の介在によって選択性が担保されている。レセプターには、基質に直接結合するタイプのものと、基質に結合したユビキチン鎖を介して結合する二種類に分類でき、酵母の場合は多くが基質に直接結合するタイプである⁵⁴。

酵母において、ほとんどのレセプターは Atg11 と Atg8 へ結合することで選択的な基質分解に寄与している(図 2)^{47,55}。また、Atg8 ファミリータンパク質との結合は、進化的に保存されたレセプタータンパク質の機能であり、Atg8-family interacting motif (AIM)や LC3- interacting region (LIR)などと呼ばれる WXXL で代表されるモチーフ配列で、Atg8 ファミリータンパク質の AIM 結合ポケットに結合する^{47,56}。レセプターに結合した Atg11 は、Atg1 複合体や Atg9 などをリクルートすることで PAS を形成し、基質の周囲での隔離膜の形成を可能にする^{24,55,57}。また、隔離膜上の Atg8 とレセプターが結合することで、基質に沿った隔離膜の形成を可能としていると考えられる。

Atg11 は、バルクオートファジーには必須でなく、選択的オートファジーの経路で重要な役割を担っており⁵⁷⁻⁵⁹、Atg11 への依存性の違いが選択的オートファジーとバルクオートファジーを分子生物学的に区別する一つのポイントとなる。

また、Atg20 と Atg24 も特定の基質の分解に必要な因子として報告されている。Atg20 や Atg24 の欠損株では、Fas 複合体や、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、リボソームなどの分解が低下する一方、オートファジー活性自体は大きく低下しない⁶⁰⁻⁶⁶。隔離膜の形成時の脂質膜の先端は、曲率が高く物理的に不安定な状態となる⁶⁷。このような状態で安定的に存在するためには、曲率の高い先端部分を安定化させる因子が結合する必要となる⁶⁷。Atg20 と Atg24 は、PI(3)P に結合する PX ドメインとともに曲率の高い膜に結合する性質がある BAR ドメインを有しており、隔離膜の先端部に結合し安定化することで、開口部の大きさが維持され、リボソームやオルガネラなどのサイズの大きな構造体の分解が可能となると考えられている^{8,68}。

以降、出芽酵母におけるオルガネラオートファジーを中心に各選択的オートファジーの知見をまとめる。

1) マイトファジー

マイトファジーはミトコンドリアを選択的に分解する経路であり、出芽酵母では、Atg32 がレセプターとして知られている^{63,69,70}。Atg32 は、窒素源飢餓時などに誘導され、ミトコンドリア外膜に膜貫通ドメインを介して局在する基質結合型のレセプターである。

Atg32 は、Atg11 と Atg8 に結合し、Atg11 との結合は、Casein kinase2(CK2)によるリン酸化によって促進され、ホスファターゼである Ppg1 による脱リン酸化により抑制される^{69,71-74}。Atg32 のリン酸化は、ミトコンドリアへの依存性が高い呼吸培地では抑制され、マイトファジー誘導条件である飢餓培地にシフトすることで促進されるが、Ppg1 の欠損株では、呼吸培地においても Atg32 がリン酸化を受け、Atg11 と結合可能となる⁷¹。また、

Ppg1 欠損株では、マイトファジー誘導時に野生株と比較してマイトファジーが促進され、呼吸培地においても、Ppg1 欠損と同時に Atg13 のリン酸化部位に変異を導入し Atg1 複合体を恒常的に活性化させることで、マイトファジーが活性化される⁷¹。これらの事実から、マイトファジーの適切な活性制御ために、CK2 と Ppg1 によるリン酸化制御が存在していると考えられる。

分裂酵母では、Atg43 がレセプターとして報告されている⁷⁵。Atg43 はN末端に AIM を C 末端の膜貫通領域を有しているが、Atg43 の欠損株に、AIM 領域を含む 20 残基をミトコンドリア結合サイトに融合させたものでも相補可能であり、Atg43 はミトコンドリアに AIM を介して隔離膜を引き寄せることでレセプターとして働いていると考えられる⁷⁵。

2) ペキシソファジー

ペキシソファジーは、ペルオキシソームの選択的に分解する機構である。ペキシソファジーは、メタノールを単一の炭素源として生育可能であるメタノール資化性酵母をモデルとした研究も進められている。メタノール資化性酵母は、メタノール培養時にメタノール代謝に必要なペルオキシソームを大きく発達させる特性をもち、発達したペルオキシソームは、ペルオキシソームへの依存性の低い炭素源にシフトすることで、オートファジーによる分解を受ける⁷⁶。この分解は、レセプタータンパク質 Atg30 のリン酸化による Atg30 と Atg11 の結合促進によって進行する⁷⁷。また、*Saccharomyces cerevisiae* においても、Atg36 がペキシソファジーレセプターとして報告されており、やはりリン酸化による制御を受ける⁷⁷。Atg30 と Atg36 はともに可溶性のタンパク質であり、ペルオキシソーム膜タンパク質である Pex3 と結合してペルオキシソームに局在する^{78,79}。また、Atg30 と Atg36 はともに Hrr25 によるリン酸化を受けると報告されている⁸⁰。

哺乳類においては、ユビキチン結合タンパク質である p62 や Nbr1 がレセプターと機能することが報告されている^{81,82}。ペルオキシソーム膜上のタンパク質がユビキチン化され

ることにより、p62 や Nbr1 がペルオキシソーム膜に局在し、レセプターとして機能する。また、ペキシファジーは過酸化水素の添加や、ペルオキシソーム内で ROS を発生させる Clofibrate の処理などによっても誘導され、キナーゼである ATM による Pex5 のリン酸化が引き金になると報告されている⁸¹。リン酸化された Pex5 は、ユビキチン化される。p62 が Pex5 上のユビキチンに結合し、ペキシファジーが進行すると考えられる⁸¹。最近、ミトコンドリアに局在するユビキチンリガーゼとして知られている MARCH5 が、PEX19 と PEX3 によりペルオキシソームにリクルートされ、PMP70 をユビキチン化することで、ペキシファジーを誘導することが報告された⁸³。このような形式で生じたユビキチン化により、NBR1 や P62 がリクルートされて、ペキシファジーが進むと考えられる。

3) ER ファジー・ヌクレオファジー

出芽酵母では、Atg39 と Atg40 が ER-phagy レセプターとして機能する⁵¹。Atg39 と Atg40 はともに膜貫通ドメインを有するタンパク質で、ER 膜に局在する。窒素源飢餓などの条件で発現が誘導され、どちらも Atg8 と Atg11 に結合し、この結合が効率的な ER-phagy の進行に重要である⁵¹。Atg39 は、ER と連続した膜構造である核膜周辺に局在しており、主に核膜周辺の ER-phagy やヌクレオファジーに関与する⁵¹。一方で、Atg40 は、細胞膜直下の ER に強く局在しており、主に細胞膜直下の ER-phagy に関与している⁵¹。このように、巨大なオルガネラである ER については、その部位ごとに特異的なレセプターが存在している。また、Atg40 は、レティキュロンホモロジードメインを有しており、Atg40 が隔離膜上の Atg8 と結合し、濃縮されることで、ER の膜構造を変形させ、ER のオートファゴソーム内への取り込みを促進する⁸⁴。Atg39 がレセプターとして寄与するヌクレオファジーでは、核膜から出芽した小胞がオートファゴソームに取り込まれるが、Atg39 の過剰発現では、核膜の一部がチューブ状に伸びた構造となり、その先端がちぎられて、小胞となることが観察されている^{85,86}。電子顕微鏡を用いた観察から、小胞は膜の

外膜と内膜の両方を含んでおり、詳細は不明であるが、Atg39 が核膜を変形させることで、このような小胞を形成し、オートファジーによる分解に導いていると考えられる^{85,86}。

4) 凝集性タンパク質のオートファジー

Cue5 はユビキチン化される凝集タンパク質やプロテアソームのレセプターであり、酵母における現在唯一の Atg11 に依存しないレセプターである^{87,88}。また、Cue5 には、哺乳細胞に Tollip と呼ばれるオースログが存在し、共通の機能を有しているとされている⁸⁸。しかし、最近、Tollip はエンドソームでのマイクロオートファジーで機能することを示す報告がされており⁸⁹、当初想定されたマクロオートファジーにおけるレセプターとしての機能とは異なる機能を有する可能性がある。

5) 液滴状態のタンパク質の選択的オートファジー

Cytoplasm-to-vacuole targeting(Cvt)経路は、液胞酵素である Ape1 や Ams1、Lap3、Ape4 等を選択的オートファジーの経路でサイトゾルから液胞に輸送する機構である^{90,91}。Cvt 経路で輸送される基質は蛍光顕微鏡解析により、ドット状の局在を示すことが知られていたが、最近 Ape1 が液液相分離によって液滴を形成するタンパク質であり、Ape1 液滴にその他のタンパク質が集積し、レセプタータンパク質 Atg19 を介した選択的オートファジーで液胞へと輸送されるモデルが提示されている⁹²。また、Ape1 が液滴を作れず分散したり凝集したりする場合には、オートファジーの分解を受けにくくなることが示されている⁹²。Atg19 は Ape1 液滴の境界面に局在するが、このように液滴表面に Atg19 が浮遊することが Ape1 液滴の選択的分解に重要であることも明らかになっている⁹²。

哺乳細胞において、p62 はポリユビキチン化されたタンパク質のレセプターとして働くと考えられているが、p62 とユビキチン化タンパク質の結合は、p62 の液液相分離を促し、選

択的な分解に導く⁹³。また、p62 と Atg8 ファミリータンパク質との結合が阻害された場合、p62 液滴の近傍で形成された隔離膜は p62 と反対方向に伸長し、p62 の分解が著しく低下する⁹⁴。このことから、p62-Atg8 ファミリータンパク質間の結合によって、p62 液滴に沿った隔離膜の伸長とそれに伴うオートファゴソームによる選択的取り込みが実現すると考えられる。

以上のように、サイトゾルタンパク質の高効率な選択的分解には、基質の液滴としての集合とそれを分解するためのレセプターを介した隔離膜との結合が重要なファクターだと考えられる。

6) グリコファジー

グリコーゲンは、グルコースで構成される多数の分岐を持つ多糖であり、グルコースの貯蔵庫としての役割を担っており、トレハロースと共に保存糖とも呼ばれる⁹⁵。グリコーゲンはサイトゾルで合成され、必要に応じてサイトゾルに存在するグリコーゲンホスホリラーゼとグリコーゲン脱分岐酵素によって分解され、最終的にグルコース-1-リン酸となり、解糖系やその他の経路で利用される⁹⁵。

また、グリコーゲンはオートファジーの基質になることが知られている。ライソソーム病の一つであるポンペ病で、グリコーゲンの分解酵素である α -グリコシダーゼの機能不全によりリソソーム内にグリコーゲンが蓄積し、リソソームの機能不全が生じる。このグリコーゲンのリソソームへの蓄積はオートファジー阻害により抑制されうる⁹⁶。

哺乳類におけるグリコーゲンのオートファジーは、レセプターを介した選択的オートファジーの経路でありグリコファジーと呼ばれる⁵⁰。グリコーゲン結合ドメインと LIR を有する Stbd1 がグリコファジーレセプターとして報告されている^{50,97,98}。しかし、Stbd1 の機能は臓器によってその必要性が異なることなどから⁹⁷、他のレセプターが存在する可能性や臓器によってはレセプターに依存しない非選択的オートファジーでの分解が寄与してい

る可能性も考えられる。

酵母では、電子顕微鏡観察によりオートファゴソーム内に少数のグリコーゲン顆粒が認められることが報告されてきた⁹。また、炭素源が枯渇する定常期において、液胞内や胞子膜に局在しグリコーゲン分解能を有する Sga1 の欠損によりグリコーゲンの蓄積がみられることや、オートファジーのコア遺伝子の欠損によりその蓄積が抑制されることから飢餓時のオートファジーによるグリコーゲン輸送の存在が考えられていた^{99,100}。しかし、酵母におけるグリコーゲンのオートファジーのメカニズムについては、レセプターを介した様式なのかどうかも含めて全く不明である¹⁰¹。

本研究の目的

これまでに、オートファジーを誘導するシグナルやオートファゴソーム膜の形成メカニズムなどについて多くの知見が集まっている。同様に、オートファジーの分解基質についてもオルガネラの選択的オートファジーを中心に各基質の分解機構やその生理的意義について研究が進められてきた。しかし、未だオートファジーの分解基質の全体像が解明されたとは言い難く、非選択的とされるバルクオートファジーにおいて何らかの優先性が存在する可能性や、これまで未解明の選択的な基質が存在している可能性なども考えられる。また、酵母において Atg11 が選択的オートファジーに必須だとされているが、Cue5 をレセプターとしたユビキチン化タンパク質の選択的オートファジーには、Atg11 が不要と報告されており^{87,88}、そのような Atg11 の依存性への違いが生じる理由や Atg11 を必要としない選択的オートファジー経路が Cue5 以外に存在するかについては、未解明である。更に、オートファジーの基質となりにくい排除される細胞内成分の知見についてはほとんど報告されていない。そこで、私はオートファジー誘導条件下でオートファジックボディを精製し、そのプロテオーム解析を行うことで、このようなオートファジーの基質選択性に関して新たな特性を解明することを目的とした。

第2章 結果

オートファジーの基質の網羅的解析

オートファジーの基質に関する網羅的解析を実施するために、オートファジックボディの精製を行った。オートファジックボディを蓄積する株として *atg15* 欠損株(*atg15Δ*)を用いた。また、オートファジーが誘導できないコントロールとして、*atg2Δatg15Δ*株を用いた。オートファジーの誘導条件としては、ラパマイシン処理と窒素源飢餓の2種類の誘導条件で行った。浮上分画法により取得した液胞画分について液胞膜を割り、密度勾配遠心を行い、各フラクションに分けた。各フラクションをウェスタンブロッティングにより確認したところ、オートファジックボディマーカーとして用いた Pgk1 が、Atg2 依存的に 6-8 のフラクションに濃縮されていることが確認された (図 3A)。このフラクションは、液胞膜マーカーである Pho8 をほとんど含まないことから (図 3A)、オートファジックボディが濃縮されたフラクションであると結論付け、オートファジックボディ (Autophagic body) フラクションとした。

このフラクションと共に、細胞懸濁液 (Total lysate) について LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行い、横軸に Total lysate、縦軸に Autophagic body フラクションの各タンパク質の存在量の対数値をプロットした (図 3B, C)。ラパマイシン処理と窒素源飢餓のどちらにおいても、多くのタンパク質は右肩上がりの直線上に位置し、Total lysate と Autophagic body フラクションの対数値の比率が同程度であることが明らかとなった。また、そこには Pgk1 や Adh1、Tdh2、Tdh3、Trp4 といったサイトゾルタンパク質が多く含まれており、これらのタンパク質は、バルクオートファジーにより非選択的に分解されていることが示唆された。一方で、Atg1 や Atg8、Atg19、Atg34 等の既知のオートファジー関連遺伝子や、Ape1 や Lap3 等の選択的オートファジーの基質は、Total lysate と比較して、Autophagic body フラクションに多く、オートファジックボディに濃縮されている

と考えられた (図 3B、C)。また、Total lysate と比較して Autophagic body フラクシオンに少ないタンパク質として、アクチンやチューブリンといった細胞骨格関連やヒストン等の核局在タンパク質が多く見出された (図 3B,C)。これらは、サイトゾルのタンパク質等と比較して、巨大な構造を形成している。そのため、ある一定以上の大きさを有する構造は、バルクオートファジーによって分解されにくい可能性が考えられた。

更に、Gsy2、Glc3、Gph1 等のグリコーゲン代謝関連酵素の一群も AB/TL が低いタンパク質として見出された (図 3B、C)。サイトゾルタンパク質であるグリコーゲン代謝関連酵素がオートファジックボディから排除されるという結果は、Pgk1 などの多くのサイトゾルタンパク質とは異なる挙動であり、何らかの特殊な現象が背景にある可能性が考えられた。そこで、これらグリコーゲン代謝酵素に着目して以下の研究を進めた。

グリコーゲン代謝関連酵素はグリコーゲン依存的にオートファジー分解を免れる

グリコーゲン代謝関連酵素がオートファジーの分解を受けにくいことを確認するため、GFP cleavage assay を実施した。GFP cleavage assay は、GFP が液胞内プロテアーゼに対して耐性を有することを利用した方法で、GFP を融合したタンパク質がオートファジー等の経路によって液胞に輸送され分解された後、遊離した GFP(GFP')の量をイムノブロッキング法などで検出する方法である。更に、GFP 融合タンパク質と GFP'の合計量に対する GFP'量の比率を算出することで、標的タンパク質の分解の程度を数値化可能である。私は、Gsy2、Glc3、Gph1 と共に、コントロールとしてサイトゾルタンパク質である Pgk1 と Trp4 に GFP を融合させ、GFP cleavage assay を行った。その結果、グリコーゲン代謝関連酵素の分解は Pgk1 や Trp4 と比較して顕著に低レベルであることが明らかとなった(図 4)。また、Gsy2 の細胞内局在を蛍光顕微鏡により調べたところ、富栄養条件ではサイトゾルに拡散して見えるのに対して、窒素源飢餓条件ではクラスター状の局在を示すことが明らかとなった(図 5A)。また、このクラスター状の局在部位は、Glc3 や Gph1 も

共局在することや、核やミトコンドリア、ER のマーカートンパク質と共局在を示さないことから、サイトゾルに存在することが明らかとなった(図 5B、C)。窒素源飢餓時には、グリコーゲン合成が促進されることが報告されており¹⁰²、細胞内グリコーゲン量を定量すると確かに窒素源飢餓条件で経時的にグリコーゲンが蓄積することが確認された(図 6)。また、グリコーゲン代謝関連酵素はグリコーゲンと結合して機能することから、グリコーゲン代謝関連酵素のオートファジー分解は、窒素源飢餓条件時に蓄積するグリコーゲンへの結合によって抑制されている可能性を考えた。

この可能性を検証するため、グリコーゲン合成に必須であるグリコゲニンの欠損(*glg1Δglg2Δ*)が、グリコーゲン代謝関連酵素の局在やオートファジー分解に与える影響を調べた。まず、野生株と *glg1Δglg2Δ* 株の細胞破碎液を遠心分離し、Gsy2 のペレット画分への移行を評価した結果、*glg1Δglg2Δ* 株では、Gsy2 のペレット画分への移行が顕著に低下した(図7A)。図17Bで示すように、*glg1Δglg2Δ* 株においても細胞懸濁液中にグリコーゲンを添加することで、Gsy2 がペレット画分へ移行したことも併せて考えると、Gsy2 は確かにグリコーゲンに結合すると考えられた。また、蛍光顕微鏡解析の結果から、野生株ではクラスター状に局在していた窒素源飢餓時の Gsy2 の細胞内局在が、*glg1Δglg2Δ* 株ではサイトゾルに拡散した(図7B)。更に、グリコーゲン代謝関連酵素の GFP cleavage assay を行った結果、*glg1Δglg2Δ* 株では、野生株と比較してグリコーゲン代謝関連酵素の分解が顕著に増加することが明らかとなった(図7C)。以上の結果から、グリコーゲン代謝関連酵素はグリコーゲンに結合することで分解を免れていると結論付けた。

グリコーゲンはオートファジーの基質になりにくい細胞内成分である

これまでの検討から、野生株における Gsy2 等の分解は、グリコーゲンのオートファジー分解を反映しており、グリコーゲンそのものもオートファジーの分解を受けにくい構造である可能性が考えられた。グリコーゲンは、電子顕微鏡を用いて観察が可能である。そこ

で、*atg15Δ*株を用いて、グリコーゲンがオートファジックボディ内に取り込まれるかを電子顕微鏡により検討した。グリコーゲンは、窒素源飢餓時に、濃い電子密度の構造体として確認され、サイトゾルに蓄積していることが観察された(図8A)。一方で、オートファジックボディ内、明確にグリコーゲンと判別できる構造は確認できなかった(図8A)。より正確にグリコーゲンの局在を調べるため、PATAg 染色によって、グリコーゲンなどの糖鎖を特異的に染色した¹⁰³。その結果、野生株では、PATAg 陽性の顆粒構造がサイトゾルに認められたのに対して、*glg1Δglg2Δ*株では認められず、確かにグリコーゲンが染色されていることが確認された(図8B)。また、本手法を用いても、オートファジックボディ内にはグリコーゲンが確認されなかった(図8B)。以上の結果から、グリコーゲン自体も窒素源飢餓時のオートファジーの標的となりにくいことが明らかとなった。

長時間の窒素源飢餓時にはレセプター依存的なグリコファジーが起こる

グリコーゲンがオートファジーによる分解を受けにくいことが明らかとなった一方で、酵母において、定常期にグリコーゲンが液胞内のグリコーゲン分解酵素 Sga1 による分解を受けることが報告されており、オートファジーで液胞に運ばれている可能性が指摘されている^{100,104}。そのため、特定の条件ではグリコーゲンのオートファジー分解が誘導される可能性が考えられた。また、ER 等のオルガネラの選択的オートファジーは、長時間の飢餓時などのバルクオートファジーとは異なる条件で誘導される例が報告されている¹⁰⁵。そこで、長時間の飢餓時におけるグリコーゲンのオートファジー活性を評価した。

グリコーゲンに結合する Gsy2 の分解を指標にして、グリコーゲンのオートファジー活性を経時的に評価した結果、16 時間以降の長時間の窒素源飢餓において Gsy2 の分解の増加が認められた(図9A)。更に、PATAg 染色を用いた電子顕微鏡解析による観察により、長時間の窒素源飢餓でグリコーゲンを含むオートファジックボディの割合が増加することが明らかとなった。以上の結果から長期の窒素源飢餓条件では、グリコーゲンのオー

トファジーが誘導されていることが示唆された。

長時間での窒素源飢餓時の Gsy2 分解が選択的オートファジーなのかを調べるため、Atg2, Atg11, Atg17, Atg24 の依存性を評価した。Atg2 はマクロオートファジーに必須の因子であり、Atg11 は多くの選択的オートファジーに必要な因子である。一方で、Atg17 はバルクオートファジーに必要だと言われている。また、Atg24 は、ミトコンドリアやリソソーム、FAS 複合体といったサイズの大きな構造体の分解に必要だと考えられている。Gsy2 の分解は Atg2, Atg17, Atg24 に強く依存した一方で、Atg11 への依存性は低レベルであった (図 10A)。また、Pgk1 についても同様に評価したところ、Atg24 の依存性は見られなかったものの、それ以外の因子への依存性は Gsy2 と同様であった (図 10B)。Gsy2 で見られた Atg24 の依存性はグリコーゲン顆粒が 40 nm 程度であるためサイズが大きいことによる影響であると推察された。レセプターを介したタンパク質の分解機構の多くは Atg11 に依存するが、Cue5 は Atg11 を必要としないレセプターだとされている⁸⁸。そこで、別の視点からもレセプターの必要性を検証するために、Atg8 との結合に着目した検討を行った。多くのレセプタータンパク質は自身の AIM 配列を介して Atg8 の AIM 結合ポケットと結合する。また、AIM との結合に必要な Atg8 の AIM 結合ポケット近傍のアミノ酸である 52 番目のプロリンと 67 番目のアルギニンにアラニン変異(P52A R67A)を導入することで、その結合能を大きく減弱させることが可能である⁵⁶。そこで、P52A R67A 変異を導入した際の Gsy2 の分解を評価した。コントロールとして用いた Pgk1 の分解は、P52A R67A 変異の導入で低下しないのに対して、Gsy2 の分解は減弱した (図 10C)。以上の結果から、長時間飢餓時のグリコーゲンのオートファジーは、Atg11 への依存性が低い選択的オートファジー (グリコファジー) である可能性が示唆された。

長時間の窒素源飢餓時に誘導されるグリコファジーには Atg45 が必要である

レセプタータンパク質を含めたグリコファジーの制御因子を同定するため、グリコーゲン

結合ドメイン(GBD)を有するタンパク質に着目した。CBM48 は AMPK の制御サブユニットが有する GBD であり、*Saccharomyces cerevisiae* では、Gal83 などが有している。また、*Saccharomyces cerevisiae* database (SGD)には、CBM48 と類似のドメイン(Pfam domain: PF16561) を有するタンパク質がリスト化されている。このリストに合致するタンパク質(図 11A)について、窒素源飢餓条件で、Gsy2 と共局在を示すかを評価したところ、サイトゾルタンパク質 Yil024c が Gsy2 と共局在を示す様子が確認された (図 11B)。また、Gsy2 の一部は細胞膜上に局在し、膜タンパク質である Crp1 と共局在することが観察された (図 11B)。そこで、これらのタンパク質と共に、Crp1 のホモログである Mdg1 の Gsy2 分解への影響を評価した。*yil024c* Δ , *crp1* Δ , *mdg1* Δ , *crp1* Δ *mdg1* Δ 株について Gsy2 の分解を評価したところ、*crp1* Δ と *crp1* Δ *mdg1* Δ 株で Gsy2 の分解がわずかに低下した。また、*yil024c* Δ 株では、明確な Gsy2 分解の低下が確認された (図 12A)。

Crp1 は膜上で Gsy2 と共局在を示すことから、膜ヘグリコーゲンをアンカーしている可能性が考えられた。そこで、*crp1* Δ を作成し、窒素源飢餓時の Gsy2 局在を評価したところ、*crp1* Δ 株では、Gsy2 の膜局在が著しく減弱することが明らかとなった(図 13A)。また、Crp1 の過剰発現 (*GPDpr*) によって、Gsy2 が細胞膜全体に結合する様子が確認された(図 13B)。以上の結果から、Crp1 はグリコーゲンを細胞膜にアンカーするタンパク質であり、詳細は不明であるがグリコーゲン局在が変化することによりオートファジー分解の程度も変化する可能性が考えられた。一方で、Yil024c はサイトゾルタンパク質であり、Gsy2 分解への影響の大きさを考えると、グリコファジーを直接的に制御している可能性が考えられた。また、グリコゲニンの欠損株においては、Yil024c の Gsy2 分解への影響がみられなかったことから、Yil024c の作用は確かにグリコーゲンをターゲットにしたものであると推察された(図 12B)。以上の結果より、Yil024c がグリコファジー制御因子であると考え、Atg45 と命名し、以降の検討を進めた。

Atg45 の発現増加がグリコファジーを促進する

窒素源飢餓 8 時間程度ではグリコファジーによる分解が低レベルなのに対して、24 時間などの長時間の窒素源飢餓では分解が促進することから、Atg45 の発現誘導による制御が存在する可能性を考えた。野生株で Atg45-GFP を発現させ、免疫ブロットニングで Atg45-GFP と GFP' の合計量を評価した結果、Atg45 の発現は窒素源飢餓 24 時間以降に増加することが明らかとなった (図 14)。この長時間の飢餓時に発現が増加するという結果は、過去の窒素源飢餓時の経時的なマイクロアレイ結果と一致する (Gasch et al., 2000)。以上の結果から、長時間の窒素源飢餓時に Atg45 の発現が亢進することで、グリコファジーが誘導される可能性が考えられた。

Atg45 の発現増加とグリコファジー誘導の関係を明確にするため、Atg45 を *ACT1* プロモーター下で過剰発現させ、Gsy2 分解に与える影響を評価した。その結果、Atg45 の過剰発現株では、Gsy2 分解が著しく促進されることが明らかとなった (図 15A)。また、Atg2、Atg11、Atg17、Atg24 への依存性を評価した結果、過剰発現時の分解も Atg11 への依存性が低く、Atg2、Atg17、Atg24 への依存性が高かった (図 15B)。更に、Atg45 の過剰発現が実際にグリコーゲン自体のオートファゴソームへの取り込みを促進させるかを検証するため PATAg 染色を用いた電子顕微鏡解析を実施した結果、確かに Atg45 過剰発現株においてグリコーゲンがオートファジックボディ内に蓄積する様子が確認された (図 15C)。

以上の結果から、Atg45 の発現増加により、グリコファジーが促進することが明らかとなった。

次に、Atg45 が細胞内グリコーゲン量に与える影響を評価した。グリコーゲンは液胞内で Sga1 による分解を受ける。そこで、野生株、Sga1 欠損株 (*sga1Δ*)、Atg45 過剰発現株 (*ATG45o.e.*)、Atg45 過剰発現させた Sga1 欠損株 (*sga1ΔATG45o.e.*) の 4 種類の細胞における細胞内グリコーゲン量を比較した。その結果、意外なことに、*ATG45o.e.* 株において

野生株と比較したグリコーゲンの低下は見られなかった (図 16A)。一方で、*sga1ΔATG45o.e.*株では、野生株や *sga1Δ*株と比較して有意なグリコーゲン量の増加が確認され、*ATG45o.e.*株に対しても増加傾向がみられた (図 16A)。これらの結果から、*ATG45* の過剰発現で液胞にグリコーゲンが運ばれているが、運ばれたグリコーゲンの多くが分解できていない可能性が考えられた。実際、Sga1 の発現は孢子形成時に誘導されることが知られており、増殖培地等ではその発現が低レベルであると考えられる¹⁰⁷。そこで、Sga1 を *GPD* プロモーター下で過剰発現し、その影響を検討した。まず、*GPD* プロモーター下で発現させた際の Sga1-GFP の発現量をイムノブロッティングにより検出したところ、*SGA1* プロモーター下と比較して明らかに発現量が増加した (図 16B)。また、*SGA1* プロモーター下での発現量は、窒素源飢餓培地において非常に低レベルであることが確認された (図 16B)。興味深いことに、Atg45 と同様に 24 時間以降において発現が増加することも明らかとなった (図 16B)。次に、野生株、Sga1 過剰発現(*SGA1o.e.*)株、*ATG45o.e.*株、Atg45 と Sga1 の過剰発現 (*ATG45o.e. SGA1o.e.*) 株においてグリコーゲン量を測定したところ、*SGA1o.e.*株、*ATG45o.e.*株では野生株とほとんど差がみられなかったのに対して、*ATG45o.e. SGA1o.e.*株では明らかなグリコーゲン量の減少が確認された (図 16C)。以上の結果から確かに、Atg45 の発現亢進がグリコーゲンの液胞輸送を促進すること、また液胞に輸送されたグリコーゲンは、Sga1 依存的な分解を受けることが確認された。

Atg45 はグリコファジーレセプターである

Atg45 を介したグリコファジーの分子機構を調べるため、最初に、Atg45 の推定 GBD が実際にグリコーゲンと結合するかを検討した。2 種類の Atg45 の欠損変異体 (Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹、Atg45¹⁻⁹⁶) を作成し (図 A)、これらの欠損変異体と野生型、更にポジティブコントロールとして Gsy2 に GFP を融合させ、*glg1Δglg2Δ*株に発現させた。各細胞の細胞破碎液か

らデブリを除いたのち、グリコーゲン溶液あるいはネガティブコントロールとして等量の溶媒と混合して遠心し、各タンパク質のグリコーゲン依存的なペレット画分への移行を評価した。ポジティブコントロールである Gsy2-GFP とともに Atg45-GFP と Atg45¹⁻⁹⁶-GFP では、グリコーゲン依存的なペレット画分への増加が確認された(図 17B)。一方で、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-GFP はグリコーゲン依存的なペレット画分の増加が確認されなかった(図 17B)。以上の結果から、Atg45 の GBD がグリコーゲンに結合することが確認された。次に、Atg45 の GBD が Atg45 の機能に必要十分かを調べるため、Atg45-mScarlet、Atg45¹⁻⁹⁶-mScarlet と Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-mScarlet を過剰発現した際の Gsy2 分解への影響を評価した。その結果、Atg45¹⁻⁹⁶、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹ とともに、Gsy2 の分解促進作用は認められなかったことから(図 17C)、Atg45 の GBD はグリコファジー促進作用には必要だが、それだけでは十分ではないことが明らかとなった。

レセプタータンパク質の多くは、基質と共に優先的にオートファジーによって分解されることが知られている。そこで、GBD とそれ以外の領域が Atg45 自体のオートファジー分解に与える影響を調べるため、Atg45¹⁻⁹⁶、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹ のオートファジー分解を野生型とともに評価した。Atg45-GFP と Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-GFP の分解は同程度であったのに対して、Atg45¹⁻⁹⁶-GFP の分解は明らかに低下した(図 18A)。多くのレセプタータンパク質は Atg8 に結合するため、オートファジー関連構造体のマーカーである Atg8 と共局在を示す。そこで、Atg45、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹、Atg45¹⁻⁹⁶ が Atg8 と共局在を示すかを検討したところ、Atg45-mScarlet と Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-mScarlet は GFP-Atg8 とドット状の共局在を示したのに対して、Atg45¹⁻⁹⁶-mScarlet は共局在を示さなかった(図 18B)。

以上の結果から、Atg45 の GBD 以外の領域は、Atg45 の Atg8 との結合に関与している可能性が考えられた。そこで、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹ における推定 AIM 領域を探したところ、唯一の推定 AIM 領域として、127-YVNL-130 を見出した(図 19A)。この領域が AIM であることを確かめるため、Y127A と L130A の変異(AIMm)を導入し、Atg8 との結合を評価し

た。GFP-Atg8 と Atg45-Flag あるいは Atg45^{AIMm}-Flag を *ACT1* プロモーター下で *atg15Δ* 株に発現させ、共免疫沈降を行った結果、Atg45-Flag は GFP-Atg8 との結合が認められたが、Atg45^{AIMm}-Flag ではその結合が顕著に低下した (図 19A)。

更に、Atg45 と Atg45^{AIMm}を *ACT1* プロモーター下で過剰発現させ、グリコファジーが促進されるかを評価した結果、Atg45 過剰発現株と比較して Atg45^{AIMm}過剰発現株ではグリコファジー促進作用が低下した (図 19B)。また、プラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で各 Atg45 を発現させた場合も、やはり Atg45^{AIMm}でグリコファジー活性が低下することが確認された (図 19C)。以上の結果から、Atg45 は AIM を介して Atg8 に結合し、その作用はグリコファジー促進に必要であることが明らかとなり、Atg45 がグリコファジーレセプターであると結論付けた。

尚、プラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で Atg45 を発現させた場合では、ゲノムから発現させた場合と比較して Atg45 の発現量が増加し、Gsy2 の分解も促進されることが確認された (図 19D)。そこで、以降の実験では、プラスミドで Atg45 を発現させる際に、大過剰な Atg45 の発現を避けるため、主に *ATG45* プロモーター下で Atg45 を発現させることとした。

Atg45 の C 末端の膜結合領域はグリコファジーに必要である

Atg45 の GBD 以外の領域についてより詳細に解析するため、C 末端 25 残基の欠損変異 (Atg45¹⁻¹⁶⁴) と、AIM まで含めた C 末端側 67 残基の欠損変異 (Atg45¹⁻¹²²) を作成し (図 20A)、その過剰発現によるグリコファジーへの影響を調べた。その結果、Atg45¹⁻¹⁶⁴において著しくグリコファジー促進作用が低下し、Atg45¹⁻¹²²では更に低下した (図 20B)。このことから、Atg45 の C 末端側 25 残基には AIM と協調的に働く領域が存在すると考えられた。Atg45 の二次構造を JPred4 によって予測したところ¹⁰⁸、C 末端付近にはヘリックス構造と予想される領域があることが明らかとなった (図 21A)。更に、HeliQuest を用い

て¹⁰⁹、推定ヘリックス内のアミノ酸の並びを調べたところ、本領域が両親媒性ヘリックスである可能性が示唆された（図 21A）。両親媒性ヘリックスは、その疎水面を介して膜に結合する性質を有する場合がある¹¹⁰。そこで、Atg45 の推定両親媒性ヘリックス領域に膜結合能があるかを検証するため、推定両親媒性ヘリックスを含む Atg45 の C 末端側 25 残基（Atg45¹⁶⁵⁻¹⁸⁹）に GFP を融合させ、その局在を観察した。その結果、Atg45¹⁶⁵⁻¹⁸⁹-GFP は、細胞膜、ER、液胞膜などに局在する様子が観察された（図 21B）。更に、疎水面の疎水性アミノ酸 6 つに、L173A、L176A、I179A、V183A、Y186A、W187A の変異(6A)を導入し（Atg45¹⁶⁵⁻¹⁸⁹ (6A)）、その影響を調べたところ、膜への局在は著しく低下した（図 21B）。以上の結果から、Atg45 の C 末端付近には疎水性アミノ酸に依存した膜結合領域が存在することが明らかとなった。

Atg45 の膜結合能がグリコファジーに重要かを検討するため、全長の Atg45 に同様の変異を導入し（Atg45^(6A)）、野生型、Atg45^{AIMm}、Atg45^{AIMm(6A)}とともに、*ATG45* プロモーター下で発現させ、プラスミドを用いて *atg45Δ* に導入した。いずれの変異を導入したものにおいても、野生型の Atg45 を発現させたものと比較して、著しくグリコファジーが低下した（図 22A）。このことから、Atg45 の膜結合領域は、AIM とともに Atg45 の機能に重要であると考えられた。一方、*ACT1* プロモーターの発現下で各変異体について同様の実験を行ったところ、Atg45^{AIMm(6A)}で、Atg45^{AIMm}以上のグリコファジーの低下がみられたものの、Atg45^(6A)では野生型との差が認められなかった（図 22B）。このことから、Atg45 が過剰に存在する条件では、C 末端の膜結合領域は Atg45 の機能に必須ではなく、補助的に働く可能性が考えられた。

Atg45 の膜結合能が Atg8 との共局在に重要かを評価するため、mScarlet を融合させた Atg45^{AIMm}、Atg45^(6A)と野生型をプラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で発現させ、その局在を GFP-Atg8 とともに蛍光顕微鏡で観察した。その結果、両方の変異体で GFP-Atg8 との共局在が認められなくなった（図 23）。以上の結果から、Atg45 の膜結合領域も

Atg45 のオートファジー関連膜への局在に寄与すると考えられた。

Atg45 は孢子形成時のグリコーゲン量の維持に必要である

Atg45 は、Ume6 によって転写が抑制されるタンパク質であることが報告されている¹¹¹。Ume6 は、孢子形成時に働くタンパク質を抑制する転写因子である。また、孢子形成時は、グリコーゲン合成が促進する条件であり¹¹²、オートファジーも誘導される¹¹³。そこで、孢子形成時にグリコファジーが活性化されると考え、孢子形成時のグリコファジー活性と Atg45 の依存性について検討した。孢子形成能を有する Mating type (*MAT*) のヘテロ 2 倍体(*MATa/α*)を用いて、野生株と *atg45Δ*株を 1%KAc 培地にシフトして孢子形成を誘導し、PATAg 染色を用いた電子顕微鏡観察を行った。その結果、興味深いことに野生株では、液胞内にグリコーゲンが蓄積する様子が確認された(図 24A)。一方で、*atg45Δ*株では、液胞内のグリコーゲンが減少していた(図 24A)。次に、*MATa/α*と *atg45Δ(MATa/α)*株とともに孢子形成能を有さない、1 倍体(*MATα*)とホモ二倍体(*MATa/a*)について、Gsy2 の分解を指標に孢子形成条件でのグリコファジー活性を評価したところ、*atg45Δ(MATa/α)*株だけでなく *MATα*株と *MATa/a*株でもグリコファジー活性が大きく低下した(図 24B)。更に、これらの株を用いて蛍光顕微鏡による Gsy2-GFP の局在観察を実施した結果、孢子形成培地にシフトして 12 時間後では、*MATa/α*では Gsy2 が液胞に濃縮しているのに対して、その他の株で液胞への濃縮は認められなかった。(図 24C、24D)。以上の結果から、孢子形成時には Atg45 依存的なグリコファジーが誘導され、この誘導には 1%KAc 培地の栄養条件だけでなく、*MAT*遺伝子による制御が重要であることが明らかとなった。

この結果から、*MAT*遺伝子により Atg45 の発現が制御されている可能性を考え、*MATα*、*MATa/α*、*MATa/a*株に Atg45-GFP を発現させ、その発現量を免疫ブロットイングにより評価した。その結果、孢子形成誘導 12 時間後において、*MATa/α*細胞で最

も Atg45 の発現量が多い結果となった(図 25A)。更に、qPCR を用いて Atg45 mRNA の発現量についても評価した結果、Atg45-GFP 量と同様の結果が得られた(図 25B)。

最後に、グリコファジーの生理的意義を調べるため、胞子形成時のグリコーゲン量に対する Atg45 欠損の影響を評価した。その結果、野生株(*MATa/α*)と比較して *atg45Δ*(*MATa/α*)株では細胞内グリコーゲンの低下が認められ(図 26)、グリコファジーは胞子形成時のグリコーゲン量維持に重要であると考えられた。

第3章 考察

本研究結果から考えられたグリコーゲンの分解機構モデルを図 27 に示す。

本研究では、オートファジーの基質のプロテオーム解析を端緒として、短時間の窒素源飢餓時には、グリコーゲン分解酵素やグリコーゲンが、オートファジーの基質となりにくい細胞内成分であることを明らかにした。一方で、長時間の窒素源飢餓時や胞子形成時には、レセプターを介した選択的オートファジーのメカニズムでグリコファジーが誘導されることを明らかにし、グリコファジーレセプターとして Atg45 を同定した。また、Atg45 の発現量がグリコファジー活性制御に重要であることも明らかにした。更に、Atg45 の機能には、AIM を介した Atg8 との結合だけでなく、C 末端付近の膜結合領域が重要であり、この 2 つの領域で隔離膜への結合を高めていると考えられた。

プロテオーム解析について

オートファジーの分解基質のプロテオーム解析は複数の手法が考えられる。例えば、コア Atg タンパク質依存的にオートファジー誘導条件で減少するものを検出する方法である。細胞内のタンパク質量は、タンパク質の転写・翻訳や、プロテアソーム系等のオートファジー分解以外の影響も受けることから、この方法では、オートファジーに強く依存するもののみが同定される。そのため、個々の基質の分解量を解析するには限界がある。また、選択的な基質やレセプターを探索する方法として Atg8 に結合するタンパク質を解析する方法があるが、Atg8 への結合性を持つもののみをターゲットとするため、Atg8 への結合に依存しないものなどについては検出できない。その中で、今回用いたオートファジックボディを精製しプロテオーム解析を行うという手法は、オートファジックボディ内の基質を偏りなく直接的に評価可能であり、感度と網羅性が高いと考えられる。特に、オートファジーによる分解をうけにくいタンパク質は、このような直接的に基質全体を解析する手法で

のみ同定できると思われる。また、類似の解析方法として、オートファゴソームが蓄積する Ypt7 の欠損株を用いて、オートファゴソームを精製しプロテオーム解析を行う方法があるが¹¹⁴、Ypt7 は液胞の形成など多様な経路に関与することから、特定のタンパク質の発現量や分解などへ間接的に寄与する可能性が考えられる。一方で、Atg15 は液胞内での膜分解のみに寄与する。そのため、Atg15 の欠損では、液胞に運ばれた基質の分解ができず、分解されたアミノ酸などのリサイクルが滞るが、そのような影響の少ない短いタイムコースでのオートファジー誘導条件であれば、間接的な影響を抑えた解析が可能になると考えられる。

オートファジックボディのプロテオームの解析結果から、オートファジックボディに濃縮される基質として、Ape1 や Lap3、Atg19、Atg34 や Atg8、Atg1 などの選択的オートファジーの基質やレセプター、Atg マシナリーなどが同定され、本手法が機能していると考えられた。また、Pgk1 等の多くのサイトゾルタンパク質は平均的にオートファジックボディにとりこまれており、この平均的なタンパク質の多くは非選択的な取り込みを受けていると考えられた。排除されているタンパク質は、核やアクチンなどの巨大な構造体に局在するものが多く存在した。後述するグリコーゲンも含めてある一定以上の大きさを持つものや、核などの巨大構造構成因子はオートファジーによる分解から免れる傾向があると考えられる。このことから、バルクオートファジーにおいても、非選択的にあらゆる細胞内成分を分解できるわけではなく、分解可能な対象に一定の制限が存在していると考えられた。

今回の解析では、Atg32 や Atg36、Atg39、Atg40 等のタンパク質が低レベルあるいはほとんど検出されず、正確な評価ができなかった(Data not shown)。これらのタンパク質の発現量の低さや配列上の特性などにより、LC-MS/MS での検出が難しい等の理由が考えられた。Atg45 についても検出できておらず、発現量が低いことが原因であると考えられる。そのため、今回のプロテオーム解析結果では、全てのレセプターや選択的オートファジー

の基質の同定はできないが、今回着目したグリコーゲン代謝関連酵素とともに、複数の新規優先的分解基質も同定できており、オートファジーの分解基質の新知見を得るためのファーストスクリーニングとしては十分機能していると考えられる。

Atg45 の分子機構

Atg45 は、GBD と AIM を介してグリコーゲンと Atg8 の両方に結合するタンパク質であり、Atg45 の欠損によりグリコファジーが低下し、Atg45 の発現増加がグリコファジーを促進することから、Atg45 がグリコファジーレセプターであると結論付けた。また、AIM と GBD 以外に、C 末端領域も Atg45 の機能に重要であることを明らかにした。C 末端領域は 2 次構造予測等から両親媒性ヘリックスと予測され、このヘリックス領域を含む C 末端の欠損や、疎水面の疎水性アミノ酸のアラニン置換により、Atg45 の機能が著しく低下した。この C 末端領域だけを細胞内に発現させ局在を観察すると、疎水面の疎水性アミノ酸依存的に膜に結合することが確認された。また、Atg45 と Atg8 の共局在は、AIM の変異と、C 末端の変異のどちらにおいても著しい低下が認められた。以上から、Atg45 の C 末端領域は、Atg45 の隔離膜への結合を強めている可能性が考えられる。

一方で、Atg45 を *ACT1* プロモーター下でプラスミドを用いて発現させると、AIM の変異でグリコファジーの低下がみられ、AIM と C 末端の両方に変異を入れると相加的な低下がみられものの、C 末端の変異単独では、グリコファジーが低下しなかった。これは、グリコーゲン顆粒に多量の Atg45 が結合した場合には、Atg45 と Atg8 の結合が多価に生じ、AIM を介した弱い結合のみでもグリコーゲンを隔離膜にアンカー可能になるためと考えている。

Atg11 に依存しないレセプター依存的なオートファジーについて

窒素源飢餓時のグリコファジーが Atg17 に依存するのに対して、Atg11 には弱い依存性し

か示さない。また、Pgc1 の分解も Atg11 欠損株で同様に低下していたことから、この依存性はオートファジー活性全体の低下によると考えられる。Atg11 は、レセプターに結合することで、基質近辺での隔離膜形成を可能にするが、グリコファジーは Atg11 への依存性が低いことから、基質周辺での隔離膜形成が不要である可能性が考えられる。出芽酵母において Atg11 に依存しないレセプターとしては、ユビキチン化タンパク質のオートファジー分解に関わる Cue5 が報告されている⁸⁸。グリコーゲンやユビキチン化タンパク質等、サイトゾルに広く分布する基質は、バルクオートファジーで形成される PAS 周辺に拡散によって到達可能なため、Atg11 を介して基質の周囲に隔離膜を作る必要がなく、バルクオートファジーの経路で形成される隔離膜にレセプターが結合することで、周囲の標的基質を隔離膜にトラップしオートファゴソーム内への標的基質の隔離を実現している可能性が考えられる。

グリコファジーの生理的意義

本研究では、グリコファジーレセプターとして、Atg45 を同定したものの、その欠損によるグリコファジーの低下が細胞に与える影響については未解明の課題である。細胞内のグリコーゲン量を評価した実験では、Atg45 と液胞内グリコーゲン分解酵素 Sga1 を同時に過剰発現した細胞で、グリコーゲン量が顕著に減少したものの、Sga1 単独の欠損や Sga1 単独の過剰発現では、48 時間の窒素源飢餓時においてもグリコーゲン量の変化は見られなかった。このことから、少なくとも窒素源飢餓条件では、細胞内グリコーゲン量を調整する機能として、グリコファジーの寄与は小さいと考えられる。一方で、胞子形成時にはグリコーゲンが Atg45 依存的なグリコファジーによって、液胞内に濃縮された。また、Atg45 の欠損株において、胞子形成時の細胞内グリコーゲン量が低下することが明らかとなった。胞子形成時には、Sga1 の発現量が増加するものの、大部分が胞子膜上に局在することが報告されている¹¹⁵。このことは、胞子形成時に Sga1 の発現は増加するが、液胞内の Sga1 が

少なく、液胞に運ばれたグリコーゲンは分解されにくいことを示唆している。上記の細胞内グリコーゲン量の結果や電子顕微鏡解析によって明らかとなった液胞内にグリコーゲンが蓄積する現象を踏まえて考えると、胞子形成時にグリコーゲンを液胞に輸送する意義は、液胞内に蓄積することでサイトゾルでの分解からグリコーゲンを保護することにあると考えられる。Atg45 の欠損株で、明確な胞子形成への影響は確認できていないが、飢餓が長引いた際や何らかの環境変化が生じた際に、保存していたグリコーゲンをエネルギー源として利用するのかもしれない。

今後、Atg45 の欠損株を用いて、長期の窒素源飢餓時や胞子形成時のグリコファジー低下に起因する表現型を探索するとともに、今回検討できていないオートファジー誘導条件（炭素源飢餓、ER ストレス、DNA ストレスなど）についても Atg45 欠損の影響を調べ、その生理的な意義を解明したいと考えている。

グリコーゲンが非選択的なオートファジーで分解されにくい理由と Atg45 の役割

サイトゾルに存在するグリコーゲンがレセプターを必要とし、非選択的なオートファジーでは極めて分解されにくい理由は興味深い謎である。グリコーゲンは 40 nm 程度の顆粒構造でサイトゾルに存在しており¹¹⁶、窒素源飢餓時にはサイトゾルに広く分布する。大きさの観点から考えると、グリコーゲンは 500 nm 程度の直径を有するオートファゴソームより十分小さく取り込まれうると考えられる。実際、40 nm ほどの大きさを有するリボソームは電子顕微鏡でサイトゾルと同程度の濃度で AB 内に観察される。つまり、分子自体の大きさ以外の要因で、グリコーゲンが分解されにくい可能性が考えられる。

窒素源飢餓時のグリコーゲンは、電子顕微鏡での観察結果から α 顆粒状に複合体となって存在していると考えられる。また、哺乳類では Glycogen が液液相分離により濃縮されることも報告されているが¹¹⁷、酵母においても電子顕微鏡及び Gsy2 の蛍光顕微鏡観察結果から、グリコーゲンの局在はサイトゾルに均一ではなく、クラスター状に偏って存在して

いることがわかり、これはグリコーゲン顆粒同士の弱い結合によると考えられる。このようなグリコーゲンの自己集合によるサイズの巨大化がバルクオートファジーによる取り込みを困難にしている可能性がある。

また、隔離膜は、伸長しながら周囲の成分を取り囲むが、その伸長方向は周囲の環境の影響を受ける。例えば、p62 液滴の周囲でできた隔離膜は、LC3 と p62 液滴が結合できる時のみ、p62 を取り囲むように伸びていく⁹⁴。また、液滴周辺での隔離膜の伸長方向は、液滴のサイズや張力・隔離膜との親和性で変化すると考えられるが¹¹⁸、グリコーゲンが自己集合し、密に存在する環境には、隔離膜が侵入できない可能性が考えられる。このようなグリコーゲンと隔離膜の性質により、グリコーゲンが隔離膜に取り囲まれにくくなっている可能性が考えられる。Atg45 は、液滴から遊離したグリコーゲン顆粒を効率よくトラップする役割や、隔離膜とグリコーゲンの親和性を高め隔離膜が自己集合したグリコーゲンを取り囲むことを可能にする役割等を担うことで、グリコファジーを進めているのかもしれない。

他の生物種におけるグリコファジーレセプターと Atg45 の比較

哺乳類のグリコファジーレセプター Stbd1 は Atg45 との配列の相同性は低いが、Atg45 と同様に GBD を介したグリコーゲンへの結合と LIR を介した Atg8 ホモログ GABALAPL1 への結合が報告されている⁹⁸。しかし、Stbd1 は N 末端領域に膜貫通ドメインと予測される配列を有しており、ER 膜などに強く局在しており¹¹⁹、多くがサイトゾルに局在している Atg45 とはその点で大きく異なる。また、肝臓では、Stbd1 依存的にリソソームにグリコーゲンが輸送されると報告されているが⁹⁷、その輸送には、Stbd1 の膜貫通領域と GBD のみで十分であり、LIR として報告されている領域は不必要であることを示す結果も得られており、Stbd1 の分子機構について今後より詳細な検証が必要であると考えられる。Stbd1 は ER-ミトコンドリアコンタクトサイトに局在することも報告されており¹¹⁹、この

部位はオートファゴソームの形成部位とも一致することから、Stbd1 はグリコーゲンを隔離膜にアンカーするようなレセプターではなく、隔離膜の形成部位近傍に、グリコーゲンを濃縮するような役割があるのかも知れない。また、骨格筋などにおいては、Stbd1 非依存的にリソソームにグリコーゲンが輸送される例も報告されているおり⁹⁷、哺乳類にも Stbd1 以外に Atg45 のような可溶性レセプターが存在する可能性も考えられる。

ショウジョウバエでは、Gsy2 のホモログである GlyS に哺乳類にも保存されている AIM 推定配列(608-DWRTL-612)が存在し、それを介して Atg8 に結合することが報告されている¹²⁰。グリコーゲン合成酵素はグリコーゲンに結合して働くことから、これらの生物種では、グリコーゲン合成酵素を介したグリコファジーが存在する可能性も想像されるがその証拠は得られていない。酵母の Gsy2 では、GlyS の AIM の L site がメチオニンとなっているが、L site がメチオニンでも機能する AIM も報告されていることから⁵¹、Gsy2 がレセプター様の機能を発揮する条件が存在する可能性も否定できない。他のレセプターの存在を含めたグリコファジーのメカニズムの詳細については今後の課題である。

第4章 実験手法

酵母の培養

培地は、YPD 培地(1% yeast extract [gibco]、2% peptone [BD]、2% グルコース)、あるいは、SDCA 培地(0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate [YNB w/o aa and as][BD]、0.5% ammonium sulfate [ナカライテスク]、0.5% casamino acid [BD]、2% グルコース)、または、SD 培地(0.17% YNB w/o aa and as、0.5% ammonium sulfate、2% グルコース)を用いた。寒天培地は、上記の培地に 2%の粉末寒天を加えて作成した。薬剤耐性を利用した形質転換体の選択には、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の clonNAT (WERNER BioAgents)、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の G418(富士フィルム和光純薬)、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hygromycin B (富士フィルム和光純薬)、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Zeocin (Invitrogen)を添加した YPD 寒天培地を利用した。

窒素源飢餓でのオートファジー誘導は、SD 培地で $\text{OD}_{600}=1.0$ 付近まで培養した菌体を回収し、2 回滅菌水で洗浄した後、窒素源飢餓培地(SD-N 培地、0.17% YNB w/o aa and as、2% グルコース)にシフトすることで実施した。また、ラパマイシン処理によるオートファジー誘導は、SD 培地で $\text{OD}_{600}=1.0$ 付近まで培養した後、終濃度 200 ng/mL となるようラパマイシン(R-5000; LC Laboratories)を添加することで誘導した。

胞子形成誘導は、YPA 培地(1% yeast extract、2% peptone、1% 酢酸カリウム)で、 $\text{OD}_{600}=2.0$ 付近まで培養後、2 回滅菌水で洗浄し、1%KAc 培地(1% 酢酸カリウム)にシフトすることで誘導した。

酵母株の作成

本研究で使用了株リストを表 1 に示す。本研究では、各株を X2180-1B、BY4741、SEY6210、SEY6211 のいずれかの細胞を由来として作成した。胞子形成に使用した二倍体

細胞は、SEY6210 と SEY6211 を親株とした細胞を接合させることで作成した。各遺伝子の破壊やタグの融合は、標的遺伝子に対する相同組換えにより導入した。具体的には、標的遺伝子に対する 54bp の相同組み換え領域を付加したフォワード及び、リバープライマーを設計し、目的に合ったプラスミドをテンプレートとし、PCR を行い、その PCR 産物を形質転換に用いた。使用したテンプレートプラスミドとプライマーのリストを表 2 と 3 にそれぞれ示す。形質転換は、コンピテントセルを作成し、ヒートショック法により導入した。1 mL の YPD 培地で一晚培養した酵母菌体を 40 mL の YPD に移し、4 時間程度培養した後、Li-Sorbitol 溶液(100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl [pH8.0]、1mM EDTA、1M ソルビトール)で 2 回洗浄し、Li-Sorbitol 溶液 300 μ l に懸濁し、キャリア DNA (11467140001; Roche)を 50 ml 加えて、-80°Cに保存した。コンピテントセルを解凍後、50 μ l を別チューブに分注し、5 μ l の PCR 断片を加え、Li-PEG 溶液(100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA、40% PEG 3350[202444-500G; Sigma-Aldrich])を 300 μ l 加えて、30 分常温に置き、42°Cで 10 分間処理した後、YPD 培地に置き換え、2 時間ほど復帰培養を行った後、適切な選択培地のプレートに菌体をまいた。選択培地に生えてきたコロニーを単離し、PCR により適切に DNA 断片が標的とした遺伝子領域に挿入されていることを確認した。

プラスミドの作成

pTA1 (pRS416-ATG45pr-ATG45-3xFLAG) は、まず、ATG45 のプロモーター領域とコーディング領域、ターミネーター領域を含む断片を、X2180-1B のゲノムを鋳型として、2 種類のプライマー (P251_Inf-pRS416-pro YIL024-Fw、P252_Inf-pRS416-YIL024 ter-Rv) を用いて PCR することで増幅した。増幅した断片とシングルコピーベクターpRS416 を制限酵素 HindIII と EcoRI で切断し、断片をベクターに挿入した。更に、作成した pRS416-ATG45pr-ATG45-ATG45ter を鋳型として、4 種のプライマー (T7-promoter -

Fw と P269_Inf-YIL024-3xFLAG-msPGK-Rv 及び、P267_Inf-3xFLAG-scPGKterm-Fw と P268_T7-pro US-Rv) を用いて、PCR し、増幅した断片を pRS416 に In-Fusion HD Cloning Kit (Takara)を用いて導入した。

pTA2 (pRS416-ATG45pr-ATG45^{Y127AL130A}-3xFLAG) と pTA3(pRS416-ATG45pr-ATG45^(6A)-3xFLAG)は、pTA1 を鋳型として、pTA2 は、(P255_yil024_Y127A/L130A-Fw と P256_yil024_Y127A/L130A-Rv)、pTA3 については、(P288_Yil024c-Seq-6aa-Fw、P371_Yil024c-Seq-6aa-prYil-Rv) を用いて PCR し、大腸菌に形質転換することで作成した。

pTA5(pRS416-ACTpr-ATG45-3xFLAG)と pTA6(pRS416-ACTpr-ATG45^{Y127AL130A}-3xFLAG)、pTA7(pRS416-ACTpr-ATG45^(6A)-3xFLAG)は、pYM-18 と pTA1 あるいは pTA2、pTA3 をそれぞれ、ACTpr と Atg45-Flag の鋳型とし、4 種類のプライマー (ACTpr : P274_prACT1-Fw と P275_prACT1-Rv、ATG45-Flag : P276_InF-prACT1-Yil024-Fw と P276_InF-prACT1-Yil024-Fw) を用いて PCR し、pTA5、pTA6、pTA7 それぞれに 2 つずつの断片を作成し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara)を用いて pRS416 に挿入した。

pTA4 (pRS416-ATG45pr-ATG45^{Y127AL130A(6A)}-3xFLAG) と pTA8 (pRS416-ACT1pr-ATG45^{Y127AL130A(6A)}-3xFLAG) は、それぞれ、pTA3 と pTA7 を鋳型として、2 種類のプライマー (P255_yil024_Y127A/L130A-Fw、P256_yil024_Y127A/L130A-Rv) を用いて PCR し、大腸菌に形質転換することで作成した。

pTA10 は、pRS416-ACTpr-ATG45-GFP と pRS416-ACTpr-ATG45^(6A)-GFP を鋳型として、2 種類のプライマー (p369_yil024c_D2-164-Fw、p370_pACT1-yil024c_D2-164-Rv) を用いて PCR し、大腸菌に形質転換することで作成した。

作成したプラスミドは、東京工業大学技術部・バイオ部門にシーケンス解析を委託し、配列を確認した。

液胞精製

*atg15Δ*株及び、*atg15Δatg2Δ*株を 750 ml の SD 培地で $OD_{600}=1.0$ 付近まで培養し、ラパマイシン処理条件あるいは窒素源飢餓で 2 時間培養後回収し、超純水で菌体を洗浄後、1/3000 量のメルカプトエタノールと 5 unit/mL となるよう Zymolyase-100T (07665-55; ナカライテスク)を加えた Spheroplast buffer (1.2 M ソルビトール、50 mM Tris-HCl [pH 7.5]) 45 mL に懸濁し、培養器で 70 rpm, 30°C, 30 分間振蕩した。その後、3500 rpm、2 分、4°Cで遠心し、上清を除き、Spheroplast buffer で 2 回洗浄した。10 mL の 16% Ficoll buffer (16% Ficoll [Ficoll-PM400; cytiva]、0.2 M ソルビトール、100 mM MES-Tris [pH 6.9]、20 mM $MgCl_2$)を添加し懸濁後、ホモジェナイザー (WHEATON) で細胞を破碎した。細胞破碎液の一部を Total lysate として回収し、残りサンプル全量を centrifuge ware 40PA(HITACHI)に移し、その上に 12% Ficoll buffer (12% Ficoll、0.2 M ソルビトール、100 mM MES-Tris [pH 6.9]、20 mM $MgCl_2$ 10 mL)と 0% Ficoll buffer (0.2 M ソルビトール、100 mM MES-Tris [pH 6.9]、20 mM $MgCl_2$) 15 mL を重層し、22,000 rpm、1 時間、4°Cで遠心した。

遠心後、フラクショネーター (Piston Gradient Fractionator; BIOCAMP) を用いて、12% Ficoll buffer と 0% Ficoll buffer の間のバンドを回収し、16% Ficoll buffer を全量が 6 mL となるように加えた。更に、SETON OPEN-TOP polyclear centrifuge tubes 151-514B に全量に移し、7% Ficoll buffer (7% Ficoll、0.2 M ソルビトール、100 mM MES-Tris [pH 6.9]、20 mM $MgCl_2$) 4.5 mL と 0% Ficoll buffer 2.5 mL を重層し、22,000 rpm、1 時間、4°Cで遠心した。

遠心後、フラクショネーターを用いて、7% Ficoll buffer と 0% Ficoll buffer の間のバンドを回収し、液胞画分とした。

ALP assay

回収した Total lysate サンプルと液胞画分を遠心し、その上清 5 mL を ALP assay buffer (100 mM Tris-HCl [pH 9.0]、10 mM MgSO₄、10 mM ZnSO₄)に 500 µL に加えた。50 µL の a-Naphtyl phosphate (N7255-5G; Sigma-Aldrich)を加えて、30°Cで 10 分インキュベートした。10 分後に Stop buffer (2 M グリシン [pH 11.0])を 500 µL 加えて、分光光度計 (F-2700; 日立ハイテクサイエンス) を用いて、345 nm の励起波長で、472 nm の蛍光を測定した。

オートファジックボディ精製

10% OptiPrep buffer (10% Optiprep [1114542; AXS Abbott Diagnostics Technologies]、30 mM MES-Tris[pH 6.9]、0.1 M KCl、0.5% MgCl₂、0.7M Solbitol)と 45% Optiprep buffer (45% Optiprep、30 mM MES-Tris[pH 6.9]、0.1 M KCl、0.5% MgCl₂、0.7M Solbitol) を用いて Gradient master で密度勾配を形成させた。各液胞フラクションを 0.8 mm のフィルター (ミリボア) で処理した後、各サンプルを重層し、20,000 rpm, 100 分、4°Cで遠心した。遠心後のサンプルをフラクショネーターで回収し、6、7、8 番目のフラクションを Autophagic body (AB)フラクションとした。Total lysate、液胞フラクション、AB フラクションサンプルを 10%TCA で沈殿させ、アセトン洗浄後、体積当たりの ALP アッセイ値が株間で揃うように 1/20 量のメルカプトエタノールを加えた Sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]、2% SDS、10% グリセロール、微量のプロモフェノールブルー)を加えて 65°C、15 分で処理した。

質量分析

サンプルは、メタノール/クロロホルム沈殿を行った後、PTS 溶液 (12 mM sodium Deoxycholate、12 mM sodium N-Lauroyl Sarcosinate、0.1 M Tris-HCl [pH 9.0])に懸濁

し、BCA タンパク質アッセイキットでタンパク定量後、全サンプルをタンパク質濃度 25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ に調整した。各サンプルに 1/100 量の 1 M ジチオトレイトール (DTT)を加え室温で 30 分インキュベートした後、1/20 量のアルキル化溶液 (1M ヨードアセトアミド、50 mM 炭酸水素アンモニウム) を加え、50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液で希釈した。Lys-C 溶液を加えて室温で 3 時間処理し、更に Trypsin 溶液で、37°Cで一晩処理した。サンプルと等量の酢酸エチルを加えた後、終濃度 0.5%となるようにトリフルオロ酢酸を加え、15,700 g で 2 分遠心し、上清を除いた。更に、下層を SpeedVac で 3 時間遠心し、乾燥させた。

チップカラムを 2 mL チューブにセットし、20 μL の Elution 溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸、80% アセトニトリル) を加えて、遠心した後、20 μL の binding 溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸、2% アセトニトリル) を加え、1,000xg, 3 分間遠心を 2 回繰り返した。サンプルを、Binding 溶液 100 μL に再懸濁後、チップカラムに全量アプライし、1400 xg で 30 分間遠心した。100 mL の binding 溶液を加え、1,500 xg で 2 分遠心する作業を 2 回繰り返した。チップカラムを新しいチューブに付け替え、50 μL の Elution 溶液を加えて、1,000 xg で 3 分間遠心した。回収したサンプルを SpeedVac にかけて乾燥させた。25 μL の再懸濁用溶液 (2% アセトニトリル、0.1% ギ酸) を加え、再懸濁し、20,000 xg、4 °Cで 5 分遠心し、上清を LC-MS 用バイアルに移した。

調整したサンプルは、LC-MS/MS (LC: EASY- nLC™ 1000 system; ThermoFisher Scientific、Q-Exactive; ThermoFisher Scientific)を用いてペプチドを検出し、Proteome Discoverer™ (ThermoFisher Scientific)を用いて解析した。

蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡観察には、100 倍対物レンズ (オリンパス) を搭載したスピニングディスク型共焦点超解像顕微鏡 SpinSR10 (オリンパス) を利用した。GFP は 488 nm の青色レーザー

(Coherent)で、mCherry 及び mScarlet は、561 nm の黄色レーザー (Coherent)で励起した。画像の取得は、Cell Sens (オリンパス)を用いた。図 18B は、中間倍率 1 倍で、残りの蛍光顕微鏡画像は 3.2 倍で撮像し、3.2 倍の画像については、デコンボリューションを行って撮像した。

イムノブロットティング

OD₆₀₀ 分の菌体含有培地を回収し、最終濃度 10%となるよう、トリクロロ酢酸(TCA)を加え、氷上で 15 分以上静置した。その後、4 °C、20,000 g で 15 分遠心分離し、上清を除いたのち、液体窒素で凍結後、-80°Cに保存した。サンプルを取り出し、氷冷したアセトンで洗浄して風乾させたのち、1/10 量の DTT を加えた SDS-Urea Sample buffer (0.5 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ [pH 6.8]、50 mM EDTA、8 M Urea、10% SDS、10 % グリセロール、微量のブロモフェノールブルー) 100 µL に懸濁し、等量の 0.5-mmYZB ジルコニアビーズ (安井器械) を加え、Fastprep-24 (MP Biomedicals)を用いて、菌体を破碎した。更に、4 °C、20,000 g で 1 分遠心分離後、65°C、15 分振蕩した。

調整したサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。トランスブロット Turbo ブロットティングシステム (Bio-Rad)を用いて、アクリルアミドゲルから PVDF メンブレン (メルクミリポア) に転写させた。転写したメンブレンを TBST で洗浄した後、ボンソー溶液 (0.05 % ボンソー S [ナカライテスク]、2.5 % 酢酸) に 10 分程度浸し、超純水で洗浄したのちスキャナー (GT-X970 ; EPSON) を用いて画像を取り込んだ。TBST で洗浄後、1% スキムミルク溶液(TBST に溶解)でブロットティングし、1% スキムミルク溶液で希釈した 1 次抗体と常温で 1 時間あるいは 4°Cで一晩反応させた。メンブレンを TBST で 3 回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いた酵素標識二次抗体を 1% スキムミルク溶液で 5000 倍希釈した溶液に浸し常温で 30 分振蕩した。各抗体及び 1 次抗体と 2 次抗体の組み合わせは表に示した。二次抗体で反応後、

TBST で 3 回洗浄し、HRP 用化学発光基質 (FEMTOGLOW; フナコシ) と一分間反応させたのち、Fusion FX7 (M&S Instruments Inc.) を用いて画像を取り込んだ。

GFP 融合タンパク質のオートファジーによる分解量は、遊離 GFP と全長の検出バンドの強度を定量し、GFP 断片の値を全長と遊離 GFP の合計の値で割ることで算出した。バンドの定量には VisionCapt (M&S Instruments Inc.) を用いた。

共免疫沈降

窒素源飢餓培地で 1 時間培養した細胞を回収し、ペレットを Lysis buffer (50 mM Tris-HCl[pH 7.5]、10% Glycerol、1 mM EDTA、150 mM NaCl、protease inhibitor cocktail[cOmplete, EDTA-free; Roche]、0.1x Phosphatase inhibitor cocktail [PhosSTOP EASYpack ; Roche]、50 mM NaF、1mM PMSF、1 mM DTT)に懸濁し、2 mg の 0.5-mm YZB ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー(MB1001C(S); 安井機器)で細胞を破碎した。細胞破碎液に、終濃度 0.5%となるよう Triton X-100 を添加し、4 °Cで 10 分間浸透した。500 g、5min、4 °Cで 2 回遠心し、デブリを除いた。細胞抽出液中のタンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイキット (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific™) で定量し、等濃度となるようすべてのサンプルを lysis buffer で希釈し、一部を”input”サンプルとして回収した後、残りを磁性ビーズである GFP-Trap (GFP-Trap_MA; chromotek)と混合し、4°Cで 1 時間、回転攪拌した。その後、マグネットスタンドを用いて、GFP-Trap を分離し、上清を除き、0.3% Triton X-100 を加えた lysis buffer で 3 回洗浄した。その後、1/20 量のメルカプトエタノールを加えた Sample buffer を 50 μL 加え、”IP”サンプルとした。Input サンプルには、1/10 量のメルカプトエタノールを加えた 2x Sample buffer をサンプルと等量加えた。すべてのサンプルを 95°Cで 5 分間処理した。処理したサンプルはイムノブロッティングによって各タンパク質バンドを検出した。

電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、株式会社東海電子顕微鏡解析に委託して実施した。観察する細胞は、急速凍結・凍結置換法による処理を行った。培養した細胞を銅ディスクで挟み込み、-175°Cの液体プロパンで急速凍結した。その細胞を2%のグルタルアルデヒドと1%のタンニン酸を含むエタノールで-80°Cにて2日間凍結置換した後、-20°Cで2時間、4°Cで2時間インキュベートした。その後、エタノールで脱水し、酸化プロピレンに浸した後、酸化プロピレンとレジン（Quetol-651; Nisshin EM Co）を1:1で混合した溶液に浸したのち、100%のレジンに一晩浸し、60°Cで48時間処理して、ポリマー化しブロックを作成した。作成したブロックをウルトラマイクロトーム(ULTRACUT、UCT; Leica)を用いて、80 nmの薄切切片を作成し、ニッケルグリッドに接着させた。図8Aは、このグリッドを、2%の酢酸ウラニルで染色後、Lead stain solution（Sigma-Aldrich Co.）で2次染色を行った。

図8B、図9B、図15C、図24Aは、PATAg染色のため、形成したサンプルを接着させたグリッドを1%の過ヨウ素酸に浸した後、洗浄し0.5%のチオカルボヒドライドを含む20%酢酸に浸し、10%酢酸で洗浄、更に1%の銀タンパク質に浸した。

観察は、透過型電子顕微鏡（JEM-1400Plus; JEOL Ltd.）を用いて、100 kVの加速電圧で観察した。画像は、CCDカメラ（EM-14830RUBY2; JEOL Ltd.）で取得した。

グリコーゲン結合アッセイ

細胞をSD培地でOD=1.0付近まで培養し、50 OD₆₀₀分集菌し（図7Aについては、窒素源飢餓培地にシフト後、6時間培養してから集菌）、1 mlのLysis buffer（50 mM Tris-HCl[pH 7.5]、10% Glycerol、1 mM EDTA、150 mM NaCl、protease inhibitor cocktail、0.1x Phosphatase inhibitor cocktail、50 mM NaF、1 mM PMSF、1 mM DTT）に懸濁し、2

mg のジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカーにより菌体を破碎した。図 17B の実験においては、細胞懸濁液を、20,000 g、5 分、4 °C で遠心し、上清を回収する操作を 2 回繰り返した。タンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイキットで測定し、サンプル間のタンパク質濃度を lysis buffer で揃えた。各サンプルに等量の lysis Tbuffer あるいは、20 mg/ml となるよう lysis buffer にグリコーゲン (074-05561; 富士フィルム和光純薬株式会社) を溶解したグリコーゲン溶液と混合し、4 °C で 1 時間、回転攪拌した。図 7A の実験については、細胞懸濁液を、20,00 g、5 分、4 °C で遠心し、上清を回収する操作を 2 回繰り返した。両方の実験においてその後、各サンプル 50 μ L を "Total" サンプルとして回収し、残りのうち 600 μ L を 100,000 g、60 分、4 °C で遠心した。上清 100 μ L を "Sup" サンプルとして回収した後、ペレットを 600 μ L の lysis buffer に再懸濁し、"pellet" サンプルとした。すべてのサンプルに等量の 1/10 量のメルカプトエタノールを加えた 2x Sample buffer を加え、95 °C で 5 分振蕩した。処理したサンプルはイムノブロットィングによって各タンパク質バンドを検出した。

グリコーゲン定量

細胞を 5 OD₆₀₀ 分回収した後、0.25 M の炭酸ナトリウム溶液 125 μ L に懸濁し、95 °C で 4 時間ボイルした。1M 酢酸と pH 5.2 に調整した 0.2M 酢酸ナトリウム溶液を 1 サンプルあたり 75 μ L:300 μ L の割合で必要量調整し、サンプルに加え、250 μ L を新しいチューブに移した。20mg/mL となるよう α -amyloglucosidase (10115-1G-F; Sigma-Aldrich) を pH 5.2 の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液に溶解したものを作成し、各サンプルに 10 μ L 添加し、58 °C で 17 時間インキュベートした。サンプルを 20,000 g、5 分、4 °C で遠心し、上清 50 μ L を新しいチューブに分注した。酵素反応により遊離したグルコース量は、Glucose(GO) Assay Kit (Sigma-Aldrich) を用いて測定した。

RNA 抽出

RNA は、ホットフェノール法を用いて抽出した¹²¹。10OD600 ユニットの細胞を回収し、液体窒素で瞬間凍結後、400 μ L の AE buffer (50 mM CH₃COONa and 10 mM EDTA pH 5.0) に 1% SDS を加えたものを細胞ペレットに氷上で加え 0.5-mm のジルコニアビーズと 500 μ L の 65 °C に加温した AE buffer- saturated phenol を加えた。FastPrep-24 を用いて 5.5 m/s、30 s で 4 回破碎処理を行った。破碎サンプルは、1 分間氷上に置いたのち遠心分離した。上清を ANE buffer (10 mM sodium acetate, 100 mM NaCl, and 2 mM EDTA)-saturated phenol: chloroform と混合し、1 分間 vortex した後、5 分間遠心分離した。上清を chloroform: isoamyl alcohol と混ぜ合わせて 1 分間 vortex した後、5 分間遠心した。上清を 2.5 倍量のエタノールと 300 mM CH₃COONa (pH 5.3) と混合し、一晚 -20 °C で保存した。4°C で遠心し、上清を除いたのち、500 μ L の 70%エタノールをペレットに加えて 4°C で遠心した。上清を除いたのち、ペレットを RNase-free water に再懸濁した。

qPCR

Complementary DNAs (cDNAs) は、1 mg の RNA から PrimeScript RT reagent kit と gDNA eraser (TAKARA, RR047) を用いて合成した。qPCR は、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (TAKARA, RR820) と表 3 に記載の標的 RNA 特異的なプライマーを用いて行った。相対定量法を用いるスタンダードとして、段階希釈した cDNA を用いた。*ATG45* mRNA と内在性コントロールである *TAF10* mRNA¹²² の相対量はスタンダードを用いた CT 値から算出した。*ATG45* mRNA の発現量は、*ATG45* mRNA の量を *TAF10* mRNA の量で補正して算出した。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました岩崎博史先生、東京工業大学・科学技術創成科学院の大隅良典先生には深く感謝いたします。また、東京工業大学・科学技術創成科学院の武田英吾博士には、毎日のようにアドバイスや、議論をしていただきました。また、東京工業大学・科学技術創成科学院の神唯先生、川俣（堀江）朋子先生、山崎章徳先生には、要所で研究内容について相談に乗って頂きました。細川幸子さん、堀田淑坤さんには、技術的なサポートをして頂きました。また、東京工業大学技術部・バイオ部門の皆様には、プラスミドのシーケンス解析を実施頂きました。ナショナルバイオリソースセンターからは SEY6211 株の分与を受けました。ポーラ化成工業株式会社の末延則子役員や島貫智匡役員には、博士課程へ入学し研究を進めるために大変ご助力頂きました。また、ポーラ化成工業株式会社フロンティア研究所の斉藤優子さんをはじめとした science チームの皆様には、忙しい中にも関わらず、私が研究を進められるよう温かくサポート頂きました。大隅研究室の皆様、フロンティア研究所の皆様には様々な手助けを頂きました。この場を借りて感謝いたします。

参考文献

1. Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.
2. Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L., and Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol* 183, 5942–5955. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001>.
3. Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S. V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J. (2001). Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2083–2087. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000739200>.
4. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology* 119, 301–312. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.301>.
5. Kagohashi, Y., Sasaki, M., May, A.I., Kawamata, T., and Ohsumi, Y. (2023). The mechanism of Atg15-mediated membrane disruption in autophagy. *J Cell Biol* 222. <https://doi.org/10.1083/jcb.202306120>.
6. Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., and Ohsumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. *Journal of Cell Biology* 124, 903–913. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.6.903>.
7. Kopitz, J., Kisen, G., Gordon, P.B., Bohley, P., and Seglen, P.O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *Journal of Cell Biology* 111, 941–953. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.941>.
8. Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 439–458. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>.
9. Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* 12, 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x>.
10. Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *Journal of Cell Biology* 150, 1507–1513. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>.
11. Memisoglu, G., Eapen, V. V., Yang, Y., Klionsky, D.J., and Haber, J.E. (2019). PP2C phosphatases promote autophagy by dephosphorylation of the Atg1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 1613–1620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817078116>.
12. Yeasmin, A.M.S.T., Waliullah, T.M., Kondo, A., Kaneko, A., Koike, N., and Ushimaru,

- T. (2016). Orchestrated action of PP2A antagonizes atg13 phosphorylation and promotes autophagy after the inactivation of TORC1. *PLoS One* *11*, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166636>.
13. Kondo, A., Mostofa, M.G., Miyake, K., Terasawa, M., Nafisa, I., Yeasmin, A.M.S.T., Waliullah, T.M., Kanki, T., and Ushimaru, T. (2018). Cdc14 Phosphatase Promotes TORC1-Regulated Autophagy in Yeast. *J Mol Biol* *430*, 1671–1684. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.007>.
 14. Fujioka, Y., Alam, J.M., Noshiro, D., Mouri, K., Ando, T., Okada, Y., May, A.I., Knorr, R.L., Suzuki, K., Ohsumi, Y., et al. (2020). Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature* *578*, 301–305. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1977-6>.
 15. Hollenstein, D.M., Gómez-Sánchez, R., Ciftci, A., Kriegenburg, F., Mari, M., Torggler, R., Licheva, M., Reggiori, F., and Kraft, C. (2019). Vac8 spatially confines autophagosome formation at the vacuole in *S. Cerevisiae*. *J Cell Sci* *132*. <https://doi.org/10.1242/jcs.235002>.
 16. Gatica, D., Wen, X., Cheong, H., and Klionsky, D.J. (2020). Vac8 determines phagophore assembly site vacuolar localization during nitrogen starvation-induced autophagy. *Autophagy*. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1776474>.
 17. Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C.A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., et al. (2014). Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase. *Mol Cell* *53*, 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.011>.
 18. Sánchez-Wandelmer, J., Kriegenburg, F., Rohringer, S., Schuschnig, M., Gómez-Sánchez, R., Zens, B., Abreu, S., Hardenberg, R., Hollenstein, D., Gao, J., et al. (2017). Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation. *Nat Commun* *8*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00302-3>.
 19. Schreiber, A., Collins, B.C., Davis, C., Enchev, R.I., Sedra, A., D’Antuono, R., Aebersold, R., and Peter, M. (2021). Multilayered regulation of autophagy by the Atg1 kinase orchestrates spatial and temporal control of autophagosome formation. *Mol Cell* *81*, 5066–5081.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.10.024>.
 20. Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *Journal of Cell Biology* *148*, 465–479. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.465>.
 21. Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., and Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important

- membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology* *198*, 219–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>.
22. Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells* *14*, 525–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01299.x>.
 23. Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimurac, Y., Hirano, H., and Ohsumi, Y. (2015). Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 3350–3355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421092112>.
 24. He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W.L., Legakis, J.E., and Klionsky, D.J. (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *Journal of Cell Biology* *175*, 925–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606084>.
 25. Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D.J., and Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology* *190*, 1005–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912089>.
 26. Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Sugita, Y., Nomura, N., Iwata, S., Ohsumi, Y., et al. (2020). Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nat Struct Mol Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w>.
 27. Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L.N., Garza, C.M., Takahashi, S., Otomo, C., Grishin, N. V., Forli, S., Mizushima, N., and Otomo, T. (2020). Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nat Struct Mol Biol* *27*, 1194–1201. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00520-2>.
 28. Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* *153*, 519–530. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.519>.
 29. Cheng, J., Fujita, A., Yamamoto, H., Tatematsu, T., Kakuta, S., Obara, K., Ohsumi, Y., and Fujimoto, T. (2014). Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat Commun* *5*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms4207>.
 30. Obara, K., Noda, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* *13*, 537–547.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01188.x>.
31. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 23972–23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803180200>.
 32. Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201806727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806727115>.
 33. Osawa, T., Kotani, T., Kawaoka, T., Hirata, E., Suzuki, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2019). Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat Struct Mol Biol* *26*, 281–288. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0203-4>.
 34. Valverde, D.P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J.A., Walz, T., Reinisch, K.M., and Melia, T.J. (2019). ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology* *218*, 1787–1798. <https://doi.org/10.1083/JCB.201811139>.
 35. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, O.Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395–398.
 36. Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO Journal* *18*, 3888–3896. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3888>.
 37. Harada, K., Kotani, T., Kirisako, H., Sakoh-Nakatogawa, M., Oikawa, Y., Kimura, Y., Hirano, H., Yamamoto, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2019). Two distinct mechanisms target the autophagy-related e3 complex to the pre- autophagosomal structure. *Elife* *8*, 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.43088>.
 38. Munzel, L., Neumann, P., Otto, F.B., Krick, R., Metje-Sprink, J., Kroppen, B., Karedla, N., Enderlein, J., Meinecke, M., Ficner, R., et al. (2020). Atg21 organizes Atg8 lipidation at the contact of the vacuole with the phagophore. *Autophagy* *00*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1766332>.
 39. Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology* *151*, 263–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.263>.

40. Yoshinobu Ichimura, Takayoshi Kirisako, oshifumi Takaoß, Yoshinori Satomiß, Yasutsugu Shimonishiß, Naotada Ishihara, Noboru Mizushima, Isei Tanida, Eiki Kominami, Mariko Ohsumi, et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
41. Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 37298–37302. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200>.
42. Nakatogawa, H., Ishii, J., Asai, E., and Ohsumi, Y. (2012). Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* *8*. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18373>.
43. Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* *130*, 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>.
44. Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., and Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* (1979) *354*, 1036–1041. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6136>.
45. Xie, Z., Nair, U. & Klionsky, D.J. (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol Biol Cell* *19*, 3290–3298. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>.
46. Maruyama, T., Alam, J.M., Fukuda, T., Kageyama, S., Kirisako, H., Ishii, Y., Shimada, I., Ohsumi, Y., Komatsu, M., Kanki, T., et al. (2021). Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* *28*, 583–593. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00614-5>.
47. Johansen, T., and Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol* *432*, 80–103. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.016>.
48. Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (1997). Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *Journal of Cell Biology* *138*, 37–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.37>.
49. Dunn, W.A., Cregg, J.M., Kiel, J.A.K.W., van der Klei, I.J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A.A., Stasyk, O. V., and Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy* *1*, 75–83. <https://doi.org/10.4161/auto.1.2.1737>.
50. Jiang, S., Wells, C.D., and Roach, P.J. (2011). Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family

- interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem Biophys Res Commun* *413*, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.106>.
51. Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* *522*, 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature14506>.
 52. Koerver, L., Papadopoulos, C., Liu, B., Kravic, B., Rota, G., Brecht, L., Veenendaal, T., Polajnar, M., Bluemke, A., Ehrmann, M., et al. (2019). The ubiquitin-conjugating enzyme UBE 2 QL 1 coordinates lysophagy in response to endolysosomal damage. *EMBO Rep*, 1–17. <https://doi.org/10.15252/embr.201948014>.
 53. Kirkin, V., and Rogov, V. V. (2019). A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell* *76*, 268–285. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.005>.
 54. Khaminets, A., Behl, C., and Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol* *26*, 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>.
 55. Kamber, R.A., Shoemaker, C.J., and Denic, V. (2015). Receptor-Bound Targets of Selective Autophagy Use a Scaffold Protein to Activate the Atg1 Kinase. *Mol Cell* *59*, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.009>.
 56. Noda, N.N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2008). Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells* *13*, 1211–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x>.
 57. Yorimitsu, T. and Klionsky, D.J. (2005). Atg11 Links Cargo to the Vesicle-forming Machinery in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Mol Biol Cell* *16*, 1593–1605. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>.
 58. Tomioka, Y., Kotani, T., Kirisako, H., Oikawa, Y., Kimura, Y., Hirano, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2020). TORC1 inactivation stimulates autophagy of nucleoporin and nuclear pore complexes. *Journal of Cell Biology* *219*. <https://doi.org/10.1083/JCB.201910063>.
 59. Zientara-Rytter, K., and Subramani, S. (2020). Mechanistic Insights into the Role of Atg11 in Selective Autophagy. *J Mol Biol* *432*, 104–122. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.017>.
 60. Nemec, A.A., Howell, L.A., Peterson, A.K., Murray, M.A., and Tomko, R.J. (2017). Autophagic clearance of proteasomes in yeast requires the conserved sorting nexin Snx4. *Journal of Biological Chemistry* *292*, 21466–21480.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817999>.
61. Zhao, D., Liu, X.M., Yu, Z.Q., Sun, L.L., Xiong, X., Dong, M.Q., and Du, L.L. (2016). Atg20- and Atg24-family proteins promote organelle autophagy in fission yeast. *J Cell Sci* *129*, 4289–4304. <https://doi.org/10.1242/jcs.194373>.
 62. Nice, D.C., Sato, T.K., Stromhaug, P.E., Emr, S.D., and Klionsky, D.J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem* *277*, 30198–30207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204736200>.
 63. Kanki, T., and Klionsky, D.J. (2008). Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism. *J Biol Chem* *283*, 32386–32393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802403200>.
 64. Shpilka, T., Welter, E., Borovsky, N., Amar, N., Shimron, F., Peleg, Y., and Elazar, Z. (2015). Fatty acid synthase is preferentially degraded by autophagy upon nitrogen starvation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 1434–1439. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409476112>.
 65. Makino, S., Kawamata, T., Iwasaki, S., and Ohsumi, Y. (2021). Selectivity of mRNA degradation by autophagy in yeast. *Nat Commun* *12*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22574-6>.
 66. Ano, Y., Hattori, T., Oku, M., Mukaiyama, H., Baba, M., Ohsumi, Y., Kato, N., and Sakai, Y. (2005). A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate. *Mol Biol Cell* *16*, 446–457. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0842>.
 67. Sakai, Y., Koyama-Honda, I., Tachikawa, M., Knorr, R.L., and Mizushima, N. (2020). Modeling Membrane Morphological Change during Autophagosome Formation. *iScience* *23*, 101466. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101466>.
 68. Kotani, T., Sakai, Y., Kirisako, H., Kakuta, C., Kakuta, S., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2023). A mechanism that ensures non-selective cytoplasm degradation by autophagy. *Nat Commun* *14*, 5815. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41525-x>.
 69. Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev Cell* *17*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>.
 70. Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D.J. (2009). Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Dev Cell* *17*, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.014>.
 71. Furukawa, K., Fukuda, T., Yamashita, S. ichi, Saigusa, T., Kurihara, Y., Yoshida, Y.,

- Kirisako, H., Nakatogawa, H., and Kanki, T. (2018). The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy. *Cell Rep* 23, 3579–3590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.064>.
72. Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiumi, T., et al. (2013). Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep* 14, 788–794. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.114>.
 73. Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., and Kang, D. (2011). Phosphorylation of serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell* 22, 3206–3217. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0145>.
 74. Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Suzuki, S.W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Okamoto, K. (2012). Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *Journal of Biological Chemistry* 287, 10631–10638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299917>.
 75. Fukuda, T., Ebi, Y., Saigusa, T., Furukawa, K., Yamashita, S.I., Inoue, K., Kobayashi, D., Yoshida, Y., and Kanki, T. (2020). Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast. *Elife* 9, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.61245>.
 76. Farré, J.C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., and Subramani, S. (2008). PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* 14, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.011>.
 77. Farré, J.C., Burkenroad, A., Burnett, S.F., and Subramani, S. (2013). Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Rep* 14, 441–449. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.40>.
 78. Burnett, S.F., Farré, J.C., Nazarko, T.Y., and Subramani, S. (2015). Peroxisomal Pex3 activates selective autophagy of peroxisomes via interaction with the pexophagy receptor Atg30. *Journal of Biological Chemistry* 290, 8623–8631. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619338>.
 79. Motley, A.M., Nuttall, J.M., and Hettima, E.H. (2012). Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 31, 2852–2868. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.151>.
 80. Tanaka, C., Tan, L.J., Mochida, K., Kirisako, H., Koizumi, M., Asai, E., Sakoh-Nakatogawa, M., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2014). Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *Journal of Cell Biology* 207, 91–105. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402128>.

81. Zhang, J., Tripathi, D.N., Jing, J., Alexander, A., Kim, J., Powell, R.T., Dere, R., Tait-Mulder, J., Lee, J.H., Paull, T.T., et al. (2015). ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nat Cell Biol* *17*, 1259–1269. <https://doi.org/10.1038/ncb3230>.
82. Deosaran, E., Larsen, K.B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci* *126*, 939–952. <https://doi.org/10.1242/jcs.114819>.
83. Zheng, J., Chen, X., Liu, Q., Zhong, G., and Zhuang, M. (2022). Ubiquitin ligase MARCH5 localizes to peroxisomes to regulate pexophagy. *Journal of Cell Biology* *221*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103156>.
84. Mochida, K., Yamasaki, A., Matoba, K., Kirisako, H., Noda, N.N., and Nakatogawa, H. (2020). Super-assembly of ER-phagy receptor Atg40 induces local ER remodeling at contacts with forming autophagosomal membranes. *Nat Commun* *11*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17163-y>.
85. Chandra, S., Mannino, P.J., Thaller, D.J., Ader, N.R., King, M.C., Melia, T.J., and Lusk, C.P. (2021). Atg39 selectively captures inner nuclear membrane into luminal vesicles for delivery to the autophagosome. *Journal of Cell Biology* *220*. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103030>.
86. Mochida, K., Otani, T., Katsumata, Y., Kirisako, H., Kakuta, C., Kotani, T., and Nakatogawa, H. (2022). Atg39 links and deforms the outer and inner nuclear membranes in selective autophagy of the nucleus. *Journal of Cell Biology* *221*, e202103178.
87. Marshall, R.S., McLoughlin, F., and Vierstra, R.D. (2016). Autophagic Turnover of Inactive 26S Proteasomes in Yeast Is Directed by the Ubiquitin Receptor Cue5 and the Hsp42 Chaperone. *Cell Rep* *16*, 1717–1732. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.015>.
88. Lu, K., Psakhye, I., and Jentsch, S. (2014). Autophagic Clearance of PolyQ Proteins Mediated by Ubiquitin-Atg8 Adaptors of the Conserved CUET Protein Family. 549–563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.048>.
89. Zellner, S., Schifferer, M., and Behrends, C. (2021). Systematically defining selective autophagy receptor-specific cargo using autophagosome content profiling. *Mol Cell* *81*, 1337–1354.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.009>.
90. Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* *139*, 1687–1695. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1687>.

91. Kageyama, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2009). Lap3 is a selective target of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* *378*, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.084>.
92. Yamasaki, A., Alam, J.M., Noshiro, D., Hirata, E., Fujioka, Y., Suzuki, K., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2020). Liquidity Is a Critical Determinant for Selective Autophagy of Protein Condensates. *Mol Cell* *77*, 1163–1175.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.026>.
93. Sun, D., Wu, R., Zheng, J., Li, P., and Yu, L. (2018). Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res* *28*, 405–415. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0017-7>.
94. Kageyama, S., Gudmundsson, S.R., Sou, Y.S., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., Ueno, T., Miura, Y., Noshiro, D., Abe, M., et al. (2021). p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nat Commun* *12*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20185-1>.
95. François, J., and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* *25*, 125–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00059-0).
96. Raben, N., Schreiner, C., Baum, R., Takikita, S., Xu, S., Xie, T., Myerowitz, R., Komatsu, M., Van Der Meulen, J.H., Nagaraju, K., et al. (2010). Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder - Murine Pompe disease. *Autophagy* *6*, 1078–1089. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13378>.
97. Sun, T., Yi, H., Yang, C., Kishnani, P.S., and Sun, B. (2016). Starch binding domain-containing protein 1 plays a dominant role in glycogen transport to lysosomes in liver. *Journal of Biological Chemistry* *291*, 16479–16484. <https://doi.org/10.1074/jbc.C116.741397>.
98. Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V.S., Zhai, L., Irimia, J.M., DePaoli-Roach, A.A., Wells, C.D., Skurat, A. V., and Roach, P.J. (2010). Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 34960–34971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150839>.
99. Wilson, W.A., Wang, Z., and Roach, P.J. (2002). Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Mol Cell Proteomics* *1*, 232–242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M100024-MCP200>.
100. Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., and Roach, P.J. (2001). Antagonistic Controls of Autophagy and Glycogen Accumulation by Snf1p, the Yeast Homolog of AMP-

- Activated Protein Kinase, and the Cyclin-Dependent Kinase Pho85p. *Mol Cell Biol* *21*, 5742–5752. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.17.5742-5752.2001>.
101. Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2019). Vacuolar hydrolysis and efflux: current knowledge and unanswered questions. *Autophagy* *15*, 212–227. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1545821>.
 102. Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., and François, J. (1999). Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 191–203. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199902\)15:3<191::AID-YEA358>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199902)15:3<191::AID-YEA358>3.0.CO;2-O).
 103. Baba, M. (2009). *Electron microscopy in yeast*. 1st ed. (Elsevier Inc.) [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03210-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03210-2).
 104. Wilson, W.A., Wang, Z., and Roach, P.J. (2002). Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Mol Cell Proteomics* *1*, 232–242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M100024-MCP200>.
 105. Iwama, R., and Ohsumi, Y. (2019). Analysis of autophagy activated during changes in carbon source availability in yeast cells. *J Biol Chem* *294*, 5590–5603. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005698>.
 106. Gasch, A.P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol Biol Cell* *11*, 4241–4257. <https://doi.org/10.1063/1.1734046>.
 107. Yamashita, I., and Fukui, S. (1985). Transcriptional control of the sporulation-specific glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *5*, 3069–3073. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.11.3069-3073.1985>.
 108. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G.J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* *43*, W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>.
 109. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008). HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics* *24*, 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.
 110. Gim, M. (2018). The Many Faces of Amphipathic Helices. 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom8030045>.
 111. Williams, R.M., Primig, M., Washburn, B.K., Winzeler, E.A., Bellis, M., De Menthère, C.S., Davis, R.W., and Esposito, R.E. (2002). The Ume6 regulon coordinates

- metabolic and meiotic gene expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 13431–13436. <https://doi.org/10.1073/pnas.202495299>.
112. Hopper, A.K., Magee, P.T., Welch, S.K., Friedman, M., and Hall, B.D. (1974). Macromolecule Synthesis and Breakdown in Relation to Sporulation and Meiosis in Yeast. *J Bacteriol* *119*, 619–628. <https://doi.org/10.1128/jb.119.3.952-960.1974>.
 113. Barve, G., and Manjithaya, R. (2021). Cross-talk between autophagy and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *38*, 401–413. <https://doi.org/10.1002/yea.3556>.
 114. Suzuki, K., Nakamura, S., Morimoto, M., Fujii, K., Noda, N.N., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2014). Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* *9*, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091651>.
 115. Lam, C., Santore, E., Lavoie, E., Needleman, L., Fiacco, N., Kim, C., and Neiman, A.M. (2014). A visual screen of protein localization during sporulation identifies new components of prospore membrane-associated complexes in budding yeast. *Eukaryot Cell* *13*, 383–391. <https://doi.org/10.1128/EC.00333-13>.
 116. Bezborodkina, N.N., Chestnova, A.Y., Vorobev, M.L., and Kudryavtsev, B.N. (2018). Spatial Structure of Glycogen Molecules in Cells. *Biochemistry (Moscow)* *83*, 467–482. <https://doi.org/10.1134/S0006297918050012>.
 117. Liu, Q., Li, J., Zhang, W., Xiao, C., Zhang, S., Nian, C., Li, J., Su, D., Chen, L., Zhao, Q., et al. (2021). Glycogen accumulation and phase separation drives liver tumor initiation. *Cell* *184*, 5559–5576.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.001>.
 118. Agudo-Canalejo, J., Schultz, S.W., Chino, H., Migliano, S.M., Saito, C., Koyama-Honda, I., Stenmark, H., Brech, A., May, A.I., Mizushima, N., et al. (2021). Wetting regulates autophagy of phase-separated compartments and the cytosol. *Nature* *591*, 142–146. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2992-3>.
 119. Lytridou, A.A., Demetriadou, A., Christou, M., Potamiti, L., Mastroiannopoulos, N.P., Kyriacou, K., Phylactou, L.A., Drousiotou, A., and Petrou, P.P. (2020). Stbd1 promotes glycogen clustering during endoplasmic reticulum stress and supports survival of mouse myoblasts. *J Cell Sci* *133*. <https://doi.org/10.1242/jcs.244855>.
 120. Zirin, J., Nieuwenhuis, J., and Perrimon, N. (2013). Role of Autophagy in Glycogen Breakdown and Its Relevance to Chloroquine Myopathy. *PLoS Biol* *11*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001708>.
 121. Huang, H., Kawamata, T., Horie, T., Tsugawa, H., Nakayama, Y., Ohsumi, Y., and Fukusaki, E. (2015). Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J* *34*, 154–168. <https://doi.org/10.15252/embj.201489083>.
 122. Teste, M.-A., Duquenne, M., François, J.M., and Parrou, J.-L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in

- Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol* 10, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-99>.
123. Herskowitz, I., and Jensen, R.E. (1991). [8] Putting the HO gene to work: Practical uses for mating-type switching. *Methods Enzymol* 194, 132–146. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94011-Z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94011-Z).
 124. Hamasaki, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2003). The early secretory pathway contributes to autophagy in yeast. *Cell Struct Funct* 28, 49–54. <https://doi.org/10.1247/csf.28.49>.

表

表 1. 本研究に用いた出芽酵母株

株名	遺伝子型	ソース
X2180-1B	MATa <i>SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>	YGSC* ¹
BY4741	MATa <i>his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0</i>	Brachmann et al. (1998)
SEY6210	MAT α <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 suc2-Δ 9 lys2-801; GAL</i>	Robinson et al. (1988)
SEY6211	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 ade2-101 suc2-Δ 9; GAL</i>	NBRP* ²
HSY292	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD861	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 PGK1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD862	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::kanMX6 PGK1-GFP-natNT2</i>	本研究
MMY209	X2180-1B <i>atg15Δ::kanMX6</i>	本研究
SMY105	X2180-1B <i>atg15Δ::kanMX6 atg2Δ::natNT2</i>	本研究
ISD439	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GLC3-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD441	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GPH1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD447	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 atg2Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD471	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 glg2Δ::kanMX6 glg1Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD511	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 glg1Δ::zeoNT3 glgΔ::kanMX6 GPH1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD515	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::kanMX6 GLC3-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD527	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::kanMX6 GSY2-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD730	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 crp1Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD732	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 mdg1Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD763	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 atg24Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD919	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 SIP1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD921	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 SIP2-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD923	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 GAL83-GFP-natNT2</i>	本研究

ISD925	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 GLC3-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD927	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 GPH1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD943	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 PMA1-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD946	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 CRP1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD947	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 MDG1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD964	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 ATG45-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD970	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 PMA1-mScarlet-hphNT1 mdg1Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD972	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 PMA1-mScarlet-hphNT1 crp1Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD980	X2180-1B <i>sga1Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD996	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 OM45-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD997	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 SEC63-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD998	X2180-1B <i>GSY2-mScarlet-hphNT1 NDC1-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1001	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1003	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACT1pr-ATG45</i>	本研究
ISD1021	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 atg11Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1023	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 atg17Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1035	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACT1pr-ATG45 atg2Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1037	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACT1pr-ATG45 atg11Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1039	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACTpr1-ATG45 atg24Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1047	X2180-1B <i>atg45Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1053	X2180-1B <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45</i>	本研究
ISD1093	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACT1pr-ATG45 atg17Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1097	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 ATG45-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1099	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 ATG45-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1101	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 kanMX6-ACT1pr-ATG45-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1105	X2180-1B <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45 sga1Δ::hphNT1</i>	本研究
ISD1115	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 kanMX6-ACT1pr-ATG45-GFP-natNT2</i>	本研究

ISD1123	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45Δ(165-189)-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1125	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45Δ(124-189)-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1128	X2180-1B <i>GFP-ATG8-hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45-mScarlet-natNT2</i>	本研究
ISD1133	X2180-1B <i>GFP-ATG8-hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔC-mScarlet-natNT2</i>	本研究
ISD1147	X2180-1B <i>SGA1-GFP-hphNT1</i>	本研究
ISD1153	X2180-1B <i>natNT2-GDPpr-SGA1</i>	本研究
ISD1157	X2180-1B <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45 natNT2-GDPpr-SGA1</i>	本研究
ISD1167	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔC-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1193	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔN-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1198	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔN-mScarlet-hphNT1</i>	本研究
ISD1218	X2180-1B <i>natNT2-GDPpr-SGA1-GFP-hphNT1</i>	本研究
ISD1239	SEY6210 SEY6211	本研究
ISD1253	SEY6210 <i>atg45 Δ::kanMX6</i> SEY6211 <i>atg45 Δ::kanMX6</i>	本研究
yet2909	SEY6210 MATa SEY6211	本研究
yet2931	SEY6210 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2 vph1::VPH1-mCherry::hphNT1</i>	本研究
yet2932	SEY6210 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2 vph1::VPH1-mCherry::hphNT1</i> SEY6211 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2</i>	本研究
yet2933	SEY6210 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2 vph1::VPH1-mCherry::hphNT1</i> MATa SEY6211 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2</i>	本研究
yet2934	SEY6210 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2 atg45 Δ::kanMX6 vph1::VPH1-mCherry::hphNT1</i> SEY6211 <i>gsy2::GSY2-GFP:natNT2 atg45 Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1257	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6 pRS416</i>	本研究
ISD1271	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔC-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1293	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> <i>pRS416-ATG45pr-ATG45-3xFLAG</i>	本研究

ISD1336	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1pr-ATG45-3xFLAG</i>	本研究
ISD1337	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1pr-ATG45(AIMm)-3xFLAG</i>	本研究
ISD1340	X2180-1B <i>ATG45-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1342	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ATG45pr-ATG45(AIMm)-3xFLAG</i>	本研究
ISD1354	X2180-1B <i>glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45ΔN-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1356	X2180-1B <i>glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1pr-ATG45-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1360	X2180-1B <i>atg45Δ::GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1368	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 PGK1-GFP-natNT2</i> <i>atg2Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1370	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 PGK1-GFP-natNT2</i> <i>atg11Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1372	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 PGK1-GFP-natNT2</i> <i>atg17Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1374	X2180-1B <i>VPH1-2xmCherry-hphNT1 PGK1-GFP-natNT2</i> <i>atg24Δ::kanMX6</i>	本研究
ISD1384	X2180-1B <i>ATG8-PGKter-zeoNT3</i> <i>VPH1-2xmScarlet-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1385	X2180-1B <i>ATG8^{P52A R67A}-PGKter-zeoNT3</i> <i>VPH1-2xmScarlet-hphNT1 GSY2-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1388	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>PMA1-mScarlet-hphNT1 crp1Δ::kanMX6 mdg1Δ::zeoNT3</i>	本研究
ISD1403	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::hphNT1</i>	本研究
ISD1405	X2180-1B <i>glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::kanMX6</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::hphNT1</i>	本研究
ISD1447	X2180-1B <i>GSY2-GFP-natNT2</i> <i>PMA1-mScarlet-hphNT1 kanMX6-GDPpr-CRP1</i>	本研究
ISD1459	BY4741 <i>atg45Δ::hphNT1 atg15Δ::zeoNT3</i> pRS416- <i>ACT1pr-ATG45-3xFLAG</i>	本研究
ISD1460	BY4741 <i>GFP-ATG8-natNT2 atg45Δ::hphNT1</i> <i>atg15Δ::zeoNT3 pRS416-ACT1pr-ATG45-3xFLAG</i>	本研究
ISD1461	BY4741 <i>GFP-ATG8-natNT2 atg45Δ::hphNT1</i> <i>atg15Δ::zeoNT3 pRS416-ACT1pr-ATG45(AIMm)-3xFLAG</i>	本研究

ISD1478	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> (6A)-3xFLAG	本研究
ISD1480	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm, 6A)-3xFLAG	本研究
ISD1490	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>C25-GFP</i>	本研究
ISD1492	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry:hphNT1</i> <i>atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>C25</i> (6A)- <i>GFP</i>	本研究
ISD1496	X2180-1B <i>glg1Δ::zeoNT3 glg2Δ::hphNT1</i> <i>kanMX6-ACT1</i> pr- <i>ATG45ΔC-GFP-natNT2</i>	本研究
ISD1498	BY4741 <i>atg45Δ::hphNT1 atg15Δ::zeoNT3</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> -3xFLAG	本研究
ISD1499	BY4741 <i>GFP-ATG8-natNT2 atg45Δ::hphNT1 atg15Δ::zeoNT3</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> -3xFLAG	本研究
ISD1500	BY4741 <i>GFP-ATG8-natNT2 atg45Δ::hphNT1 atg15Δ::zeoNT3</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm)-3xFLAG	本研究
ISD1527	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (6A)-3xFLAG	本研究
ISD1529	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 VPH1-2xmCherry-hphNT1</i> <i>GSY2-GFP-natNT2 atg45Δ::kanMX6</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm, 6A)-3xFLAG	本研究
yet3438	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 atg8::GFP-ATG8:hphNT1</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> -mScarlet	本研究
yet3439	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 atg8::GFP-ATG8:hphNT1</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> AIMm-mScarlet	本研究
yet3440	X2180-1B <i>ura3Δ::zeoNT3 atg8::GFP-ATG8:hphNT1</i> pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (6A)-mScarlet	本研究

*1 YGSC: Yeast Genetic Stock Center

*2 NBRP: National BioResource Project

表2. 本研究に用いたプラスミドリスト

プラスミド名	プラスミド詳細	ソース
pRS416	pRS416	研究室ストック
pTA1	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> -3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA2	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA3	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (6A)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA4	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm, 6A)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA5	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> -3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA6	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA7	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> (6A)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA8	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>ATG45</i> (AIMm, 6A)-3x <i>FLAG</i>	本研究
pTA9	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>C25</i> - <i>GFP</i>	本研究
pTA10	pRS416- <i>ACT1</i> pr- <i>C25</i> (6A)- <i>GFP</i>	本研究
pTA11	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> -mScarlet	本研究
pTA12	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> ^{AIMm} -mScarlet	本研究
pTA13	pRS416- <i>ATG45</i> pr- <i>ATG45</i> ^(6A) -mScarlet	本研究
pHO	pYC50-GAL-HO	123
pET103	PYM-N18- <i>ACT1</i> pr-kanMX4	研究室ストック
p-GFP-natNT2	pFA6a-GFP(A206K)-natNT2	研究室ストック
p-kanMX6	pFA6a-kanMX6	研究室ストック
p-natNT2	pFA6a-natNT2	研究室ストック

AIMm: Y127A L130A, 6A: L130A L176A I179A V183A Y186A W187A,
C25: *ATG45*Δ1-164

表 3. 本研究にオリゴ DNA リスト

No	プライマー名	配列
遺伝子破壊 or タグ付加		
1	GSY2 Ctaghy Fw	GAGTGAATCCTGCAGCTGACGATGACGACGATGGCCCATATGC TGATGACAGTGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
2	gsy2D Rv	TCGTATGTCTTTATGGTAAGATTTTTTAATACTGTTTATATCCT CATAGGATATCGATGAATTCGAGCTCG
3	GSY2 end200R	CCAGGAATGCCAGGTATGAT
4	GSY2 UP200F	TGGCTCATTTTCGATTTTCC
5	gsy2D Fw	GTTTTTTTGATAACTGTGATTGAAGTTTTGACTACCTCAGAGAA AAATTTTGACGTACGCTGCAGGTGCGAC
6	GLC3 UP200F	TGTTTCCAGTGGCGATGATA
7	GLC3 end200R	TCACAATGGAATCCCAACAA
8	GLC3 Ctaghy Fw	TCCTCCAAGTTTATATTCCTAGTAGAGTCGCTTTGGTGCTTGC CTTAAAAGAAGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
9	GLC3 Ctag Rv	AAGAGAAAAAAATTATTGAGTCTTGATTTTCAGTAAGCAATATA GTATAGAGTATCGATGAATTCGAGCTCG
10	GPH1 Ctaghy Fw	ATCGTTGTATCGAGGAATACTCCGATACCATTTGGAACGTTGAA CCAGTGACTGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
11	GPH1 Ctag Rv	GCGCTTACTAGAAATGGGGAGAAGGGTGCCAAAGAGATAAAAA AAACTCCCAGATCGATGAATTCGAGCTCG
12	GPH1 UP200F	GGGGAAGAATACAACGCTCA
13	GPH1 end200R	GTTCTCGCAATATGGCTGGT
14	SGA1 UP200F	ACACGCACAAGCTACAGACG
15	SGA1 end200R	GTCAATTGGGGCAATCTACG
16	sga1D Fw	ATATAGTGATAATCGTGGACTAGAGCAAGATTTCAAATAAGTAAC AGCAGCAAACGTACGCTGCAGGTGCGAC
17	sga1D Rv	ATCTAGGAAATACACTTGTGTATACTTCTCGCTTTCTTTTATTT TTTTTTTTGTATCGATGAATTCGAGCTCG
18	glg1D Fw	ATTCGTGGTGGAGACTTAGTAGGGATTCTATTTTCGCGTACTAG TGTGATGGGACGTACGCTGCAGGTGCGAC
19	glg1D Rv	AAAAGGTCTTTACATAGATATGTCTTTTAATTTTCCTAATATGTG CGTGGAAGTATCGATGAATTCGAGCTCG
20	GLG1 UP200F	CCTACGCTTTGTCCGTTAC
21	GLG1 end200R	CTTGAGCCAAGACATCGTGA
22	glg2D Fw	TACATCGTGTCATTTTTTTGAATATCTATCAGAAGTAAGGTTTG TTACGGAGCTCGTACGCTGCAGGTGCGAC
23	glg2D Rv	TACTATGTAGTAGTTAGTTGAATGATTGATAGCTAAGAGGTAGA GGGATGGCAATCGATGAATTCGAGCTCG

24	GLG2 UP200F	ATCCAGAGGTGAATCCGATG
25	GLG2 end200R	CTTGAGCCAAGACATCGTGA
26	OM45 Ctaghy Fw	TTCAAAGAATGGAATGATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTC GAAAAAGGACGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
27	OM45 Ctag Rv	GTGAATATGTATATATGTTATGCGGGAACCAACCCTTTACAATT AGCTATCTAAATCGATGAATTCGAGCTCG
28	OM45 end 200R	GTCACAACCTGGCACAACCAC
29	PMA1 Ctaghy Fw	GAAGACTTCATGGCTGCTATGCAAAGAGTCTCTACTCAACACGAAAAGGA AACCGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
30	PMA1 Ctaghy Rv	ATCAAGTTGATTAAAAATGTGACAAAAATTATGATTAAATGCTAC TTCAACAGGAATCGATGAATTCGAGCTCG
31	PMA1 end200R	TGTGCGTGTTGTGAATTGTG
32	GAL83 Ctaghy Fw	ATTGTTAGGTATAAAACAAAAATACGTGACCCAAATACTGTATAC ACCATTGCAAGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
33	GAL83 Ctag Rv	GAAACATCTTCGCTTTTATCTAAAAAGATGTAGCTATAAGCTCT ATAATCATATATCGATGAATTCGAGCTCG
34	GAL83 end200R	TTGAGAAGGAGTGGGGATTG
35	crp1D Fw	ACTTACAAAATAAAAGATACAAAAATCACTAAGAAAATAATCT ATCAATAAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
36	CRP1 Ctaghy Fw	GAGCCCAAGAAGAAGAAAAGTGGTTTCTTCGGCAAATTGAAGA AGCTATTTAAGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
37	CRP1 Ctag Rv	ATTTTTTCTTATATTTCTATGATTTCGGCAACATGAGACCAATC CTTAGATAATATCGATGAATTCGAGCTCG
38	CRP1 UP200F	CAATTGACCCTAGCGTTTGC
39	CRP1 end200R	TTAGGCATCAGAGGGGAGAA
40	mdg1D Fw	GTATTTAACTTTCTAAGCATTATAAGATAATATTAAGGGAAAG TGTTTCTAGACGTACGCTGCAGGTCGAC
41	MDG1 Ctaghy Fw	AAGAACCCTGCTAAGAATGGAGGGTTCTTTAAAAAGTTGGCCC AGCTTTTGAAGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
42	MDG1 Ctag Rv	ACATAGTTAGGTATGGCGAGTACGTCATATATTTAGGTATTCT CCTGATTGTTTATCGATGAATTCGAGCTCG
43	MDG1 UP200F	AGGGTTTACACCGCACAAAG
44	MDG1 end200R	ATTTCAACGGGAAACGTGAC
45	SIP1 Ctaghy Fw	CAAGTAGTTTATGCACCTTGTTATTATAAAACACAAAAGTCTCA GATCAGTAATGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
46	SIP1 Ctag Rv	AAAAGAAAAAATTGAATTAATAGAGTTTCGTGAGAATCATTGCGA ATTGAGATTATCGATGAATTCGAGCTCG
47	SIP1 end200R	CTGGTTTTCCATTGGGCATA
48	SIP2 Ctaghy Fw	CGATATAAACAGAAAATATGTCACCCAGATTCTTTATACGCCCAT AGAGTCCTCGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG

49	SIP2 Ctag Rv	GCCATAGCTGCCAAAAATATATACAATACGCCTTTAAAAAGTAG GAATCCCGGAATCGATGAATTCGAGCTCG
50	SIP2 end200R	AAAAAGATCACGCGACTTCC
51	YIL024C Ctaghy Fw	TCTCTAAATGGGCTAATGTGCATTGCCAAGAAAGTCAAGACGT ACTGGAACAAAGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
52	YIL024C Ctag Rv	AGAAAATTGAAATATATATATTTGTCATAAAAGAAACATGTTTGA AAAAGTTGTATCGATGAATTCGAGCTCG
53	YIL024C end200R	TCTTTTGCCGTTGTCTGTTG
54	YIL024CD Fw	ACACAAACAAGAACAGTATTGATCGGTTTAAAGGCGTGACAA CTGTTTAAAGCGTACGCTGCAGGTCGAC
55	YIL024C promoterR	TGCCTTGGAGCAGCCCTTGATCACGTCTTCAGGGATCACAAG TAAAAAATTGGACATCGATGAATTCTCTGTCTCG
56	YIL024C UP200F	TTAAGAAGTGGGCCTTGCAG
57	YIL024C Δ (97- 189) Ctaghy Fw	TGTCACAGACAAGTCAGGTTACACCAACAATATTCTCCACTTT AAGGACAATGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
58	YIL024C Δ (124- 189) Ctaghy Fw	ATCACCACATACACGGTCCAACACCGCAAAAGGGAAACCGGA AGACGACGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
59	YIL024C Δ (165- 189) Ctaghy Fw	TGATATGGAGGACGAAAACATGGATGCAACCATCCAGTGTGAT TTCCATCAGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
60	Yil024c Δ (1-96) promoter Rv	TGTTGGACCGTGTATGTGGTGATAGAGGTATATCCATGAGTTG ACTGGCCTCCATCGATGAATTCTCTGTCTCG
61	Yil024creportGFP Fw	CAAACAAGAACAGTATTGATCGGTTTAAAGGCGTGCAAACT GTTTTAAAGATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC
62	SGA1 promoter Rv	ATCCTACGCTGAGCATGCCGAGTAATTTGTTATAAAACATCTTT TGTCTTGCCATCGATGAATTCTCTGTCTCG
63	SGA1 Ctaghy Fw	TACTTCATTCTGGGATGCCTATCAAATAAGACAAGAAGTTTTAC AGAGTTTGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
64	Yil024c Δ (1-164) promoter Rv	TTTCTTGGCAATGCACATTAGCCCATTAGAGACTCTTTCCTG CTATTGAACGCCATCGATGAATTCTCTGTCTCG
65	NDC1 Ctaghy Fw	GTTGGCGAACTGTTTTCTAGAAGTGTACGCCTCAGGCAACCC TAATGCTACGGGTGGTGCAGCAGGAGGATCG
66	NDC1 Ctag Rv	TGTATTTATCTTACATGAAATGGGAGGAGGGGTGCTCCTCGGT TGAATTGTAATCGATGAATTCGAGCTCG
67	NDC1 end200R	CCCTCTCCGTAACATCGAAA
プラスミド作成		
68	P251_InF-pRS416 -pro YIL024-Fw	CGGTATCGATAAGCTTCGTTCCACAAGCGATAAGAGC
69	T7-promoter -Fw	taatacgactcactataggg

70	P267_Inf -3xFLAG -scPGKterm-Fw	CAAGTAACCCGGGTTAATTAAG
71	P255_yil024 _Y127A/L130A- Fw	ATgcTGTC AACgcGTCGTCACATAGTGACCT
72	P259_T3 promoter-Fw	tttagtgagggttaattgcgcgctt
73	P288_Yil024c -Seq-6aa-Fw	CTTGTGATCCCTGAAGACGTG
74	P274_prACT1-Fw	TCGGATCCTCAAAACCCTTAA
75	P276_Inf-prACT1 -Yil024-Fw	TTTACTGAATTAACAATGTCCAATTTTTTACTTGTGATCCCTG
76	kanSac-ACT1p Bam F	TCGGATCCTCAAAACCCTTAA
77	P369_yil024c _D2-164-Fw	TAACAATGGCGTTCAATAGCAGGAAA
78	P252_Inf-pRS416 -YIL024 ter-Rv	CGGGCTGCAGGAATTCCTCGTCAGAGATGAGAGTAATAGAA
79	P269_Inf-YIL024- 3xFLAG-msPGK- Rv	AACCCGGGTTACTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTCGATGTC GTGGTCCTTGTAGTCACCGTCGTGGTCCTTGTAGTCTCCAC CCCCGCCTCCCCCTTTGTTCCAGTACGTCTTGACTTTC
80	P268_T7-pro US- Rv	TAGTGAGTCGTATTACGCG
81	P256_yil024_Y127 A/L130A-Rv	ACgcGTTGACAgcATCATTTAAAGAGTCGTC
82	P257_T3- promoter-Rv	aattaaccctcactaaaggaac
83	P371_Inf-yil024 _6A-US-prYil-Rv	CGTCTTCAGGGATCACAAGTAAAAAATTGGAC
84	P275_prACT1-Rv	TGTTAATTCAGTAAATTTTCGATCTTGGG
85	P218_Inf-prACT1 -pRS416-Rv	GTTTTGAGGATCCGAGCTTATCGATACCGTCGAC
86	P370_pACT1 -yil024c_D2-164- Rv	TGAACGCCATTGTTAATTCAGTAAA
qPCR		
87	TAF10-qPCR-left	ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC
88	TAF10-qPCR-right	GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTGTTG

89	Yil024c_qPCR_left 3	ACAGAGGAGATAGTGTGCTGGA
90	Yil024c_qPCR_rig ht3_4	TGCTATTGAACGCCTGATGGAAA

表 4 本研究に用いた抗体リスト

No.	抗体名	型番	メーカー	2 次抗体
1 次抗体				
1	抗 GFP 抗体	11814460001	Roche	マウス
2	抗 FLAG 抗体	F-4042	Sigma Aldrich	マウス
3	抗 mCherry 抗体	ab125096	abcam	ラビット
4	抗 Pgk1 抗体	459250	Thermo Fisher Scientific	マウス
5	抗アクチン抗体	011-24554	富士フィルム和光純薬	マウス
6	抗 Ape1 抗体	-	当研究室 ¹²⁴	ラビット
7	抗 Pho8 抗体	ab113688	abcam	マウス
2 次抗体				
1	抗マウス抗体	JIR315-035-003	Jackson Immuno Reseach Laboratories, Inc.	—
2	抗ラビット抗体	JIR111-035-144	Jackson Immuno Reseach Laboratories, Inc.	—



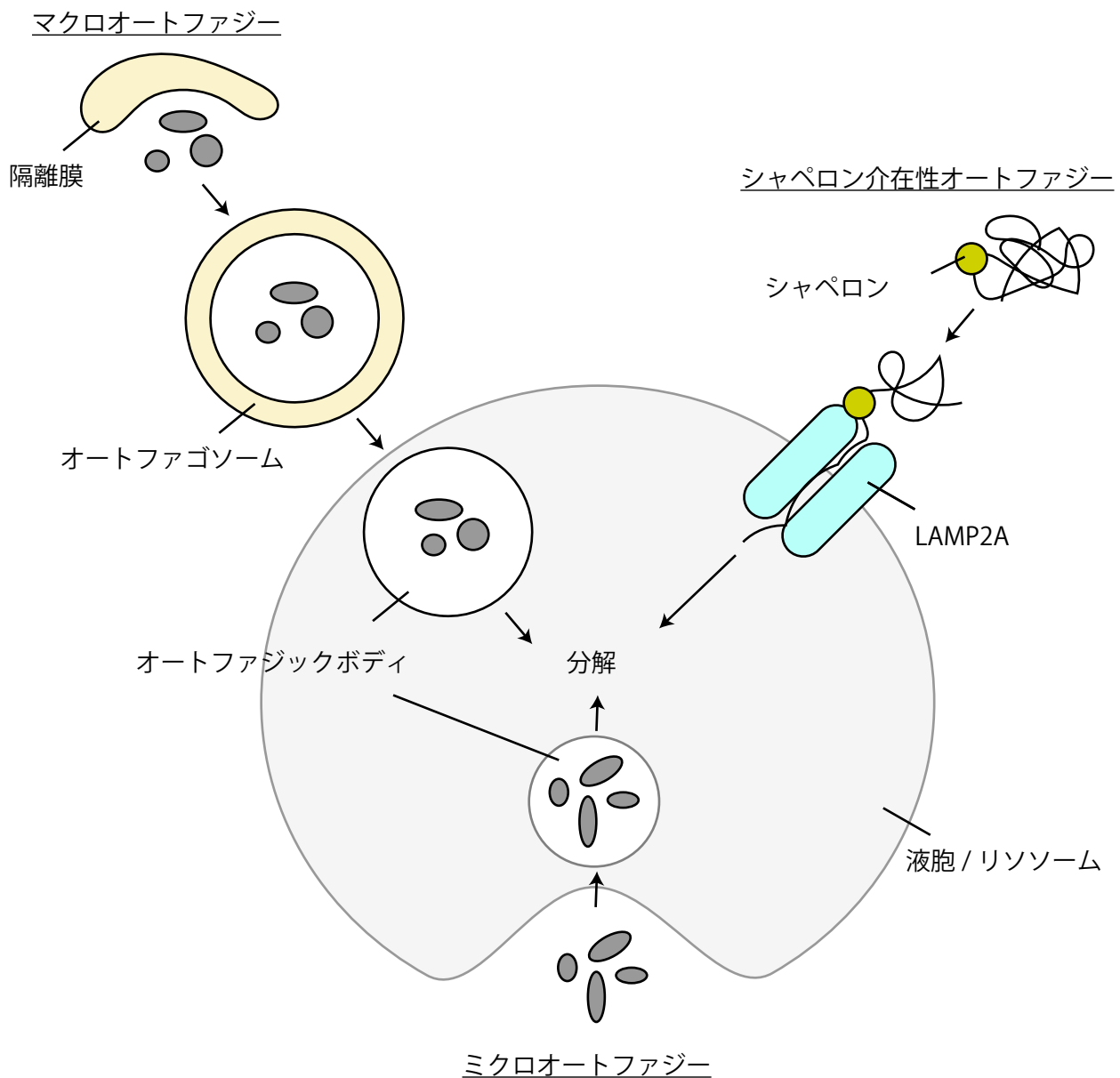


図1 オートファジーの概略図

マクロオートファジーミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーについて図で示した。マクロオートファジーはオートファゴソームで細胞内成分を取り囲んだ後、液胞/リソソームと融合することで基質を分解する。それに対して、ミクロオートファジーでは、液胞やリソソーム膜が陥入し、細胞内成分を包み込み分解する。シャペロン介在性オートファジーでは、HSP70などのシャペロンが基質を解きほぐし、LAMP2Aを介してリソソーム内に基質を輸送し分解する。

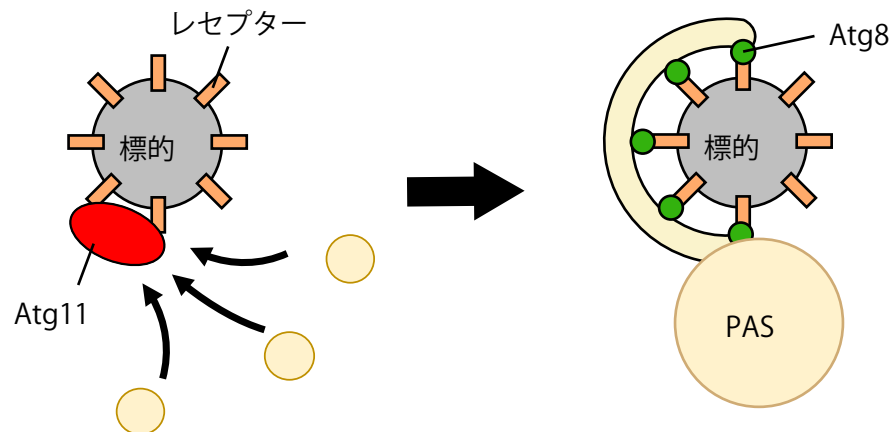


図2 レセプターを介した Atg11 依存的な選択的オートファジーのモデル図

選択的オートファジーの標的基質にレセプターが結合することで、レセプターを介して Atg11 がリクルートされる。その結果、Atg11 を介して隔離膜形成に必要なタンパク質が集積し、PAS が形成され、隔離膜の伸長が始まる。更に、隔離膜上の Atg8 とレセプターが結合することで、標的基質を囲むように隔離膜が伸長する。

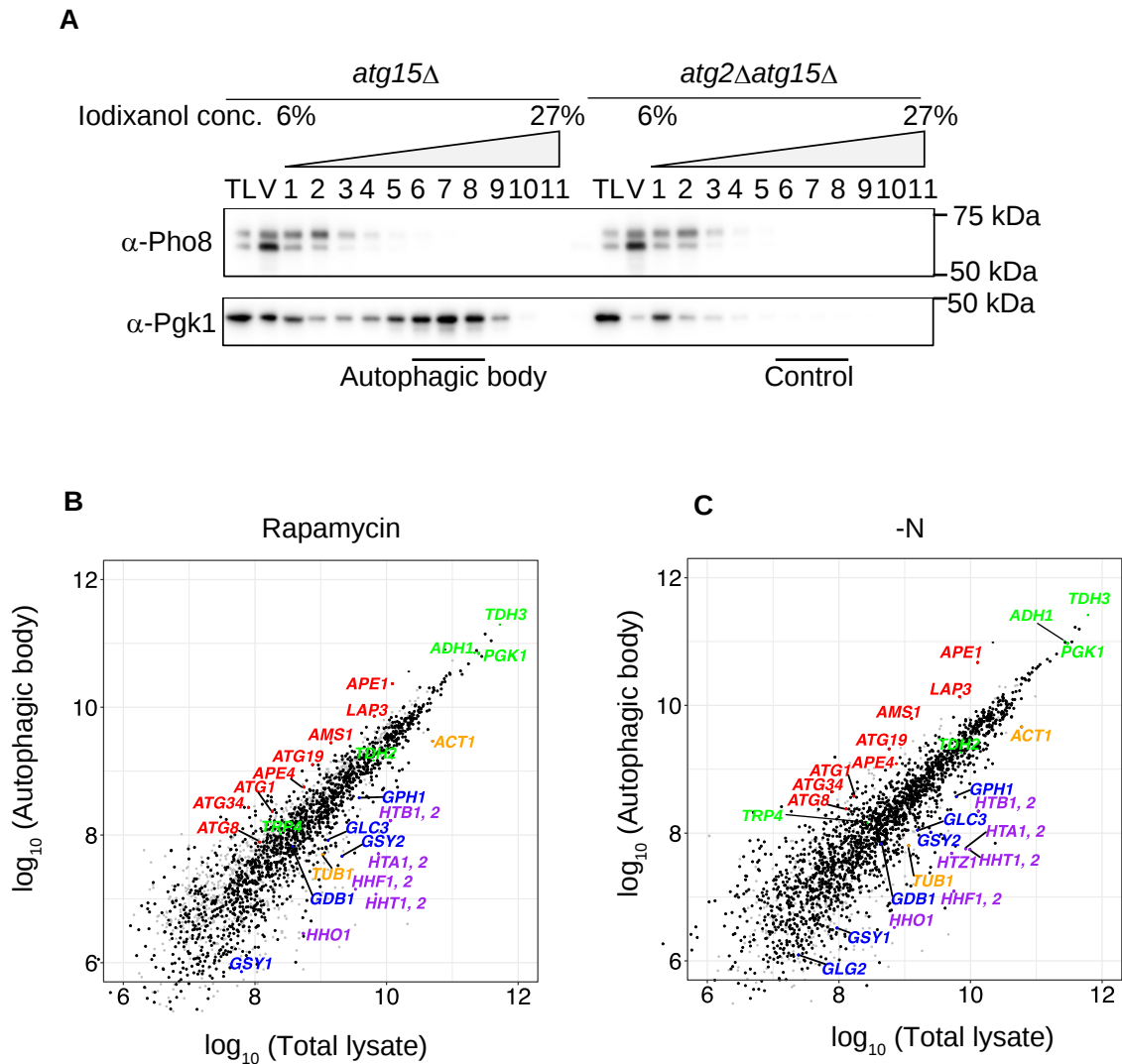


図3 オートファジックボディのプロテオーム解析

(A) *atg15Δ* と *atg15Δatg2Δ* の細胞を Rapamycin で 2 時間処理した後、液胞画分を回収し、密度勾配遠心により 11 のフラクションに分け、イムノブロットングによって、Pho8 と Pgk1 のバンドを検出した。TL: Total lysate、V: 液胞画分

(B-C) *atg15Δ* の Autophagic body フラクションと Total lysate の各タンパク質の存在量の対数値をそれぞれ、y 軸と x 軸にプロットした。赤: Autophagic body フラクションに濃縮されているタンパク質。緑: サイトゾルタンパク質 (Pgk1、Trp4 など) 青: グリコーゲン代謝関連酵素。紫: ヒストン。オレンジ: 細胞骨格。(B) ラパマイシン処理。(C) 窒素源飢餓時。

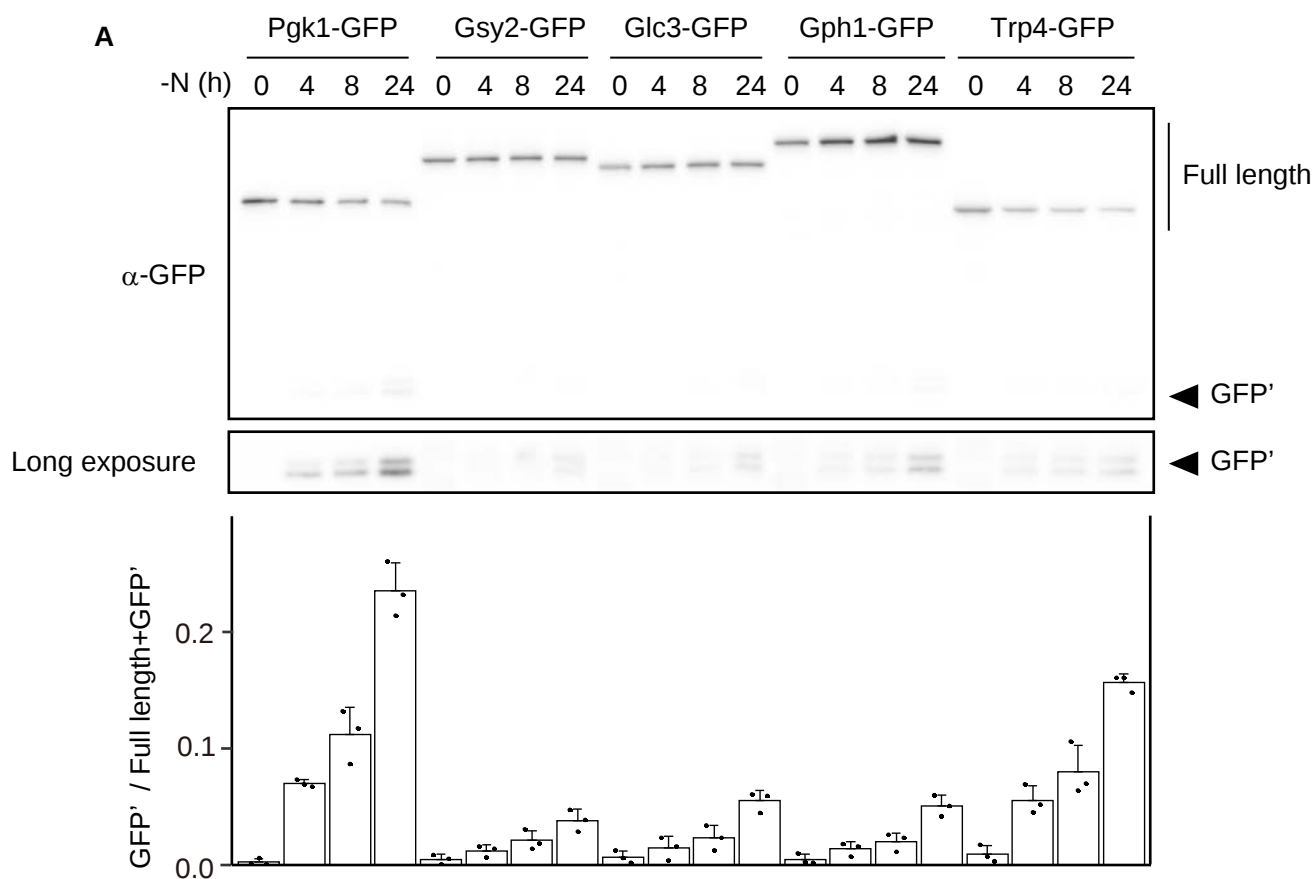


図4 グリコーゲン代謝関連酵素の分解

Pgk1, Gsy2, Glc3, Gph1, Trp4-GFP を発現させた細胞を窒素源飢餓条件で培養し、経時的に細胞を回収した。抗 GFP 抗体を用いたイムノブロットングによって、各時間での GFP 融合タンパク質と遊離 GFP(GFP') のバンドを検出した。各バンドを定量し、GFP' / (GFP 融合タンパク質 +GFP') の比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 $\pm$ S.D

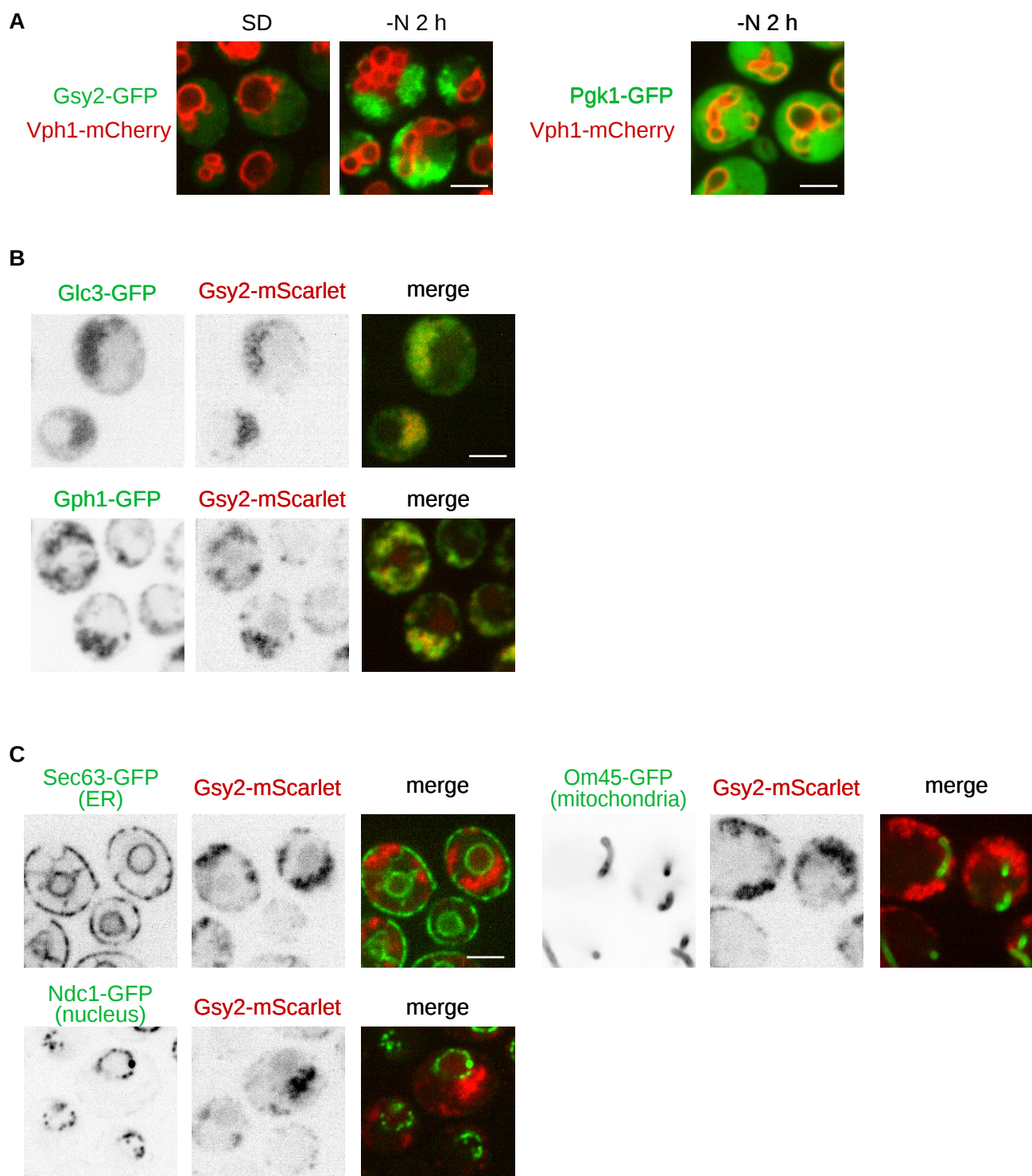


図5 窒素源飢餓時のGsy2の局在

(A) 野生株にGsy2-GFPあるいは、Pgk1-GFPをVph1-mCherryと共発現させ、SD培地あるいは窒素源飢餓培地2時間において蛍光顕微鏡観察を行った。

(B) 野生株にGlc3-GFPあるいは、Gph1-GFPをGsy2-mScarletと共発現させ、窒素源飢餓培地2時間において蛍光顕微鏡観察を行った。

(C) 野生株にSec63(ER膜), Om45(ミトコンドリア外膜), あるいはNdc1(核膜)-GFPをGsy2-mScarletと共発現させ、窒素源飢餓培地2時間において蛍光顕微鏡観察を行った。

スケールバー: 2 μ m。

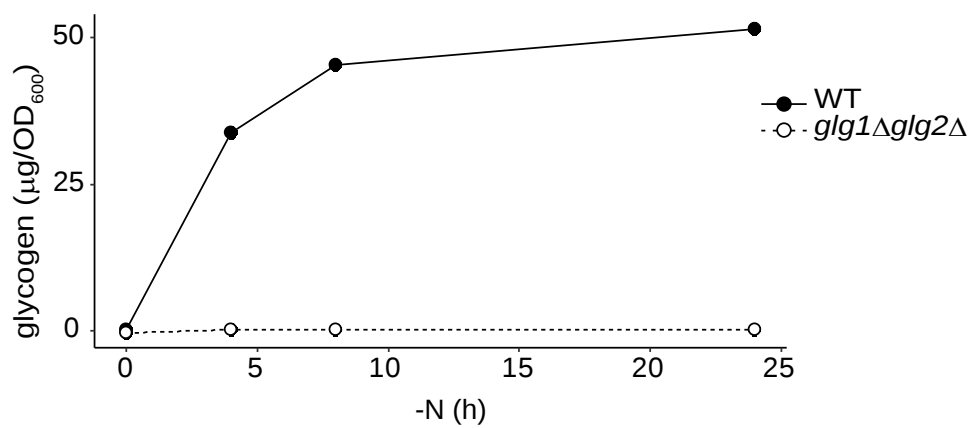


図6 窒素源飢餓時のグリコーゲンの蓄積

野生株と *glg1Δglg2Δ* 株を窒素源飢餓培地で経時的に培養し、各タイムコースで細胞を回収し、細胞内のグリコーゲンをグルコースに分解した後、定量した。細胞 1OD₆₀₀ あたりのグリコーゲン由来のグルコース量 (μg) を算出し、グラフを作成した。

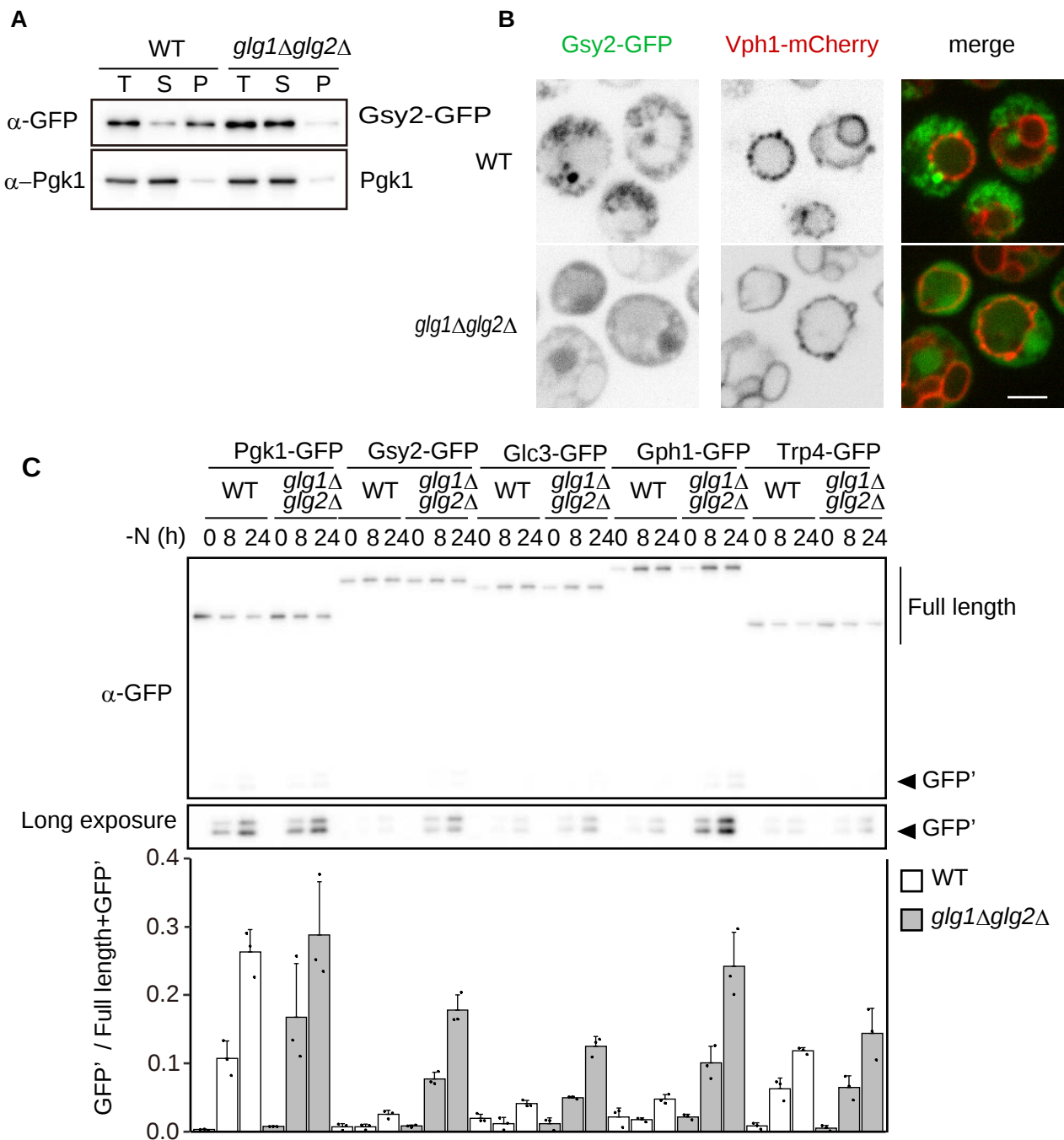


図7 グリコーゲン合成不能株では、グリコーゲン代謝関連酵素の分解が促進する

(A) 野生株と *glg1Δglg2Δ* 株（グリコーゲン合成不能株）に Gsy2-GFP を発現させ、窒素源飢餓培地 6 時間において細胞を回収し、各細胞の細胞破碎液にを遠心して Gsy2-GFP のペレットへの移行をイムノブロッティングによって抗 GFP 抗体を用いて検出し、評価した。また、抗 Pgk1 抗体を用いてグリコーゲン結合能を持たないサイトゾルタンパク質である Pgk1 のペレットへの移行も評価した。T: Total lysate、S: Supernant、P: pellet

(B) 野生株と *glg1Δglg2Δ* 株に Gsy2-GFP と Vph1-mCherry を共発現させて、窒素源飢餓培地 2 時間において蛍光顕微鏡観察を行った。スケールバー：2 μ m

(C) Pgk1, Gsy2, Glc3, Gph1, Trp4-GFP を発現させた野生株及び *glg1Δglg2Δ* 株を窒素源飢餓条件で培養し、経時的に細胞を回収した。抗 GFP 抗体を用いたイムノブロッティングによって、各時間での GFP 融合タンパク質と GFP' のバンドを検出した。各バンドを定量し、GFP' / (GFP 融合タンパク質 + GFP') の比率を算出した後、野生株における Pgk1-GFP の 24 時間の比率を 100 としてグラフに示した。n=3、平均 $\pm$ S.D。

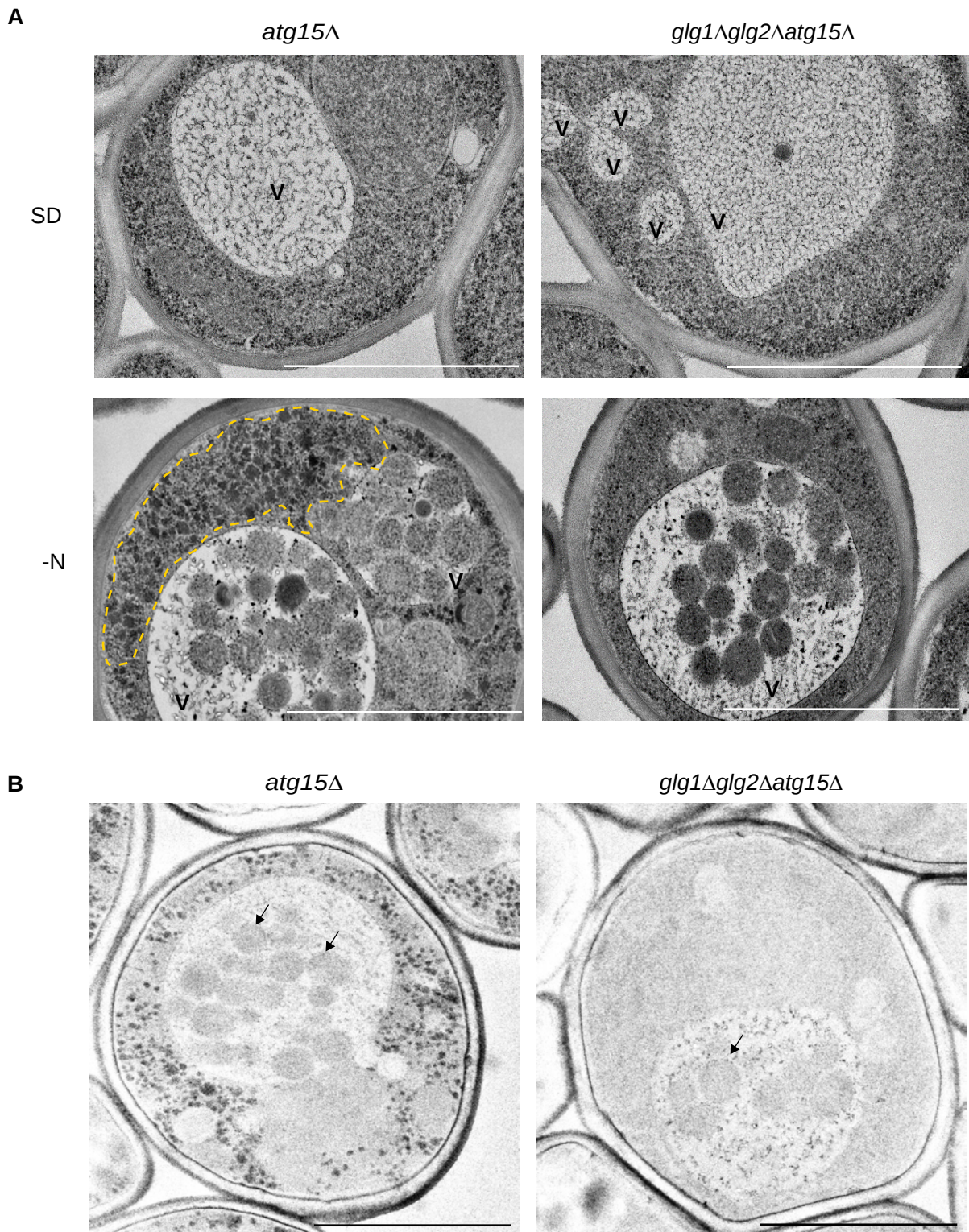


図8 グリコーゲンはオートファジックボディから排除される

(A) *atg15Δ* 株と *glg1Δglg2Δatg15Δ* 株を SD 培地と窒素源飢餓培地 6 時間において細胞を回収し、電子顕微鏡を用いて観察を行った。ダッシュ線で囲んだ領域：グリコーゲン。V：液胞。スケールバー：2 μ m。

(B) *atg15Δ* 株と *glg1Δglg2Δatg15Δ* 株を窒素源飢餓培地 6 時間において細胞を回収し、PATAg 染色後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。オートファジックボディの例を矢印で示した。

スケールバー：2 μ m。

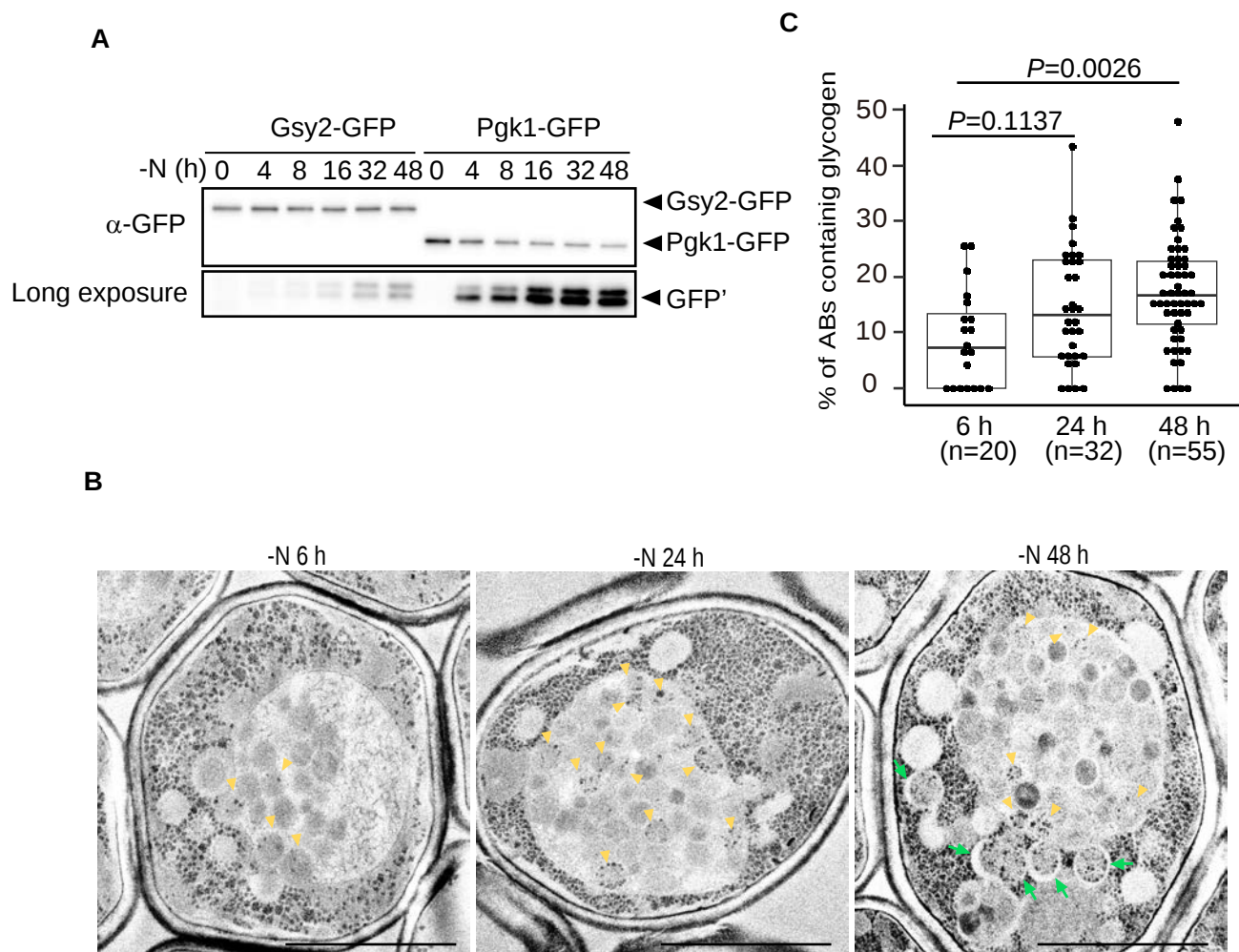


図9 長時間の窒素源飢餓時にはグリコーゲンオートファジーが誘導される

(A) 野生株に Gsy2-GFP あるいは Pgk1-GFP を発現させ、窒素源飢餓培地で培養し細胞を経時的に回収し、イムノブロッティングによって、GFP 融合タンパク質と GFP の量を抗 GFP 抗体を用いて検出した。

(B) *atg15Δ* 株を窒素源飢餓培地 6、24、48 時間において細胞を回収し、PATA g 染色後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。グリコーゲンを含有するオートファジックボディを黄色矢頭で、グリコーゲンを含有するオートファゴソームを緑矢印で示した。スケールバー：2 μ m。

(C) 図 9B の各時間におけるグリコーゲンを取り込んだオートファジックボディ (AB) の割合を算出し、箱ひげ図で示した。P 値は、Steal test により算出し、図中に示した。

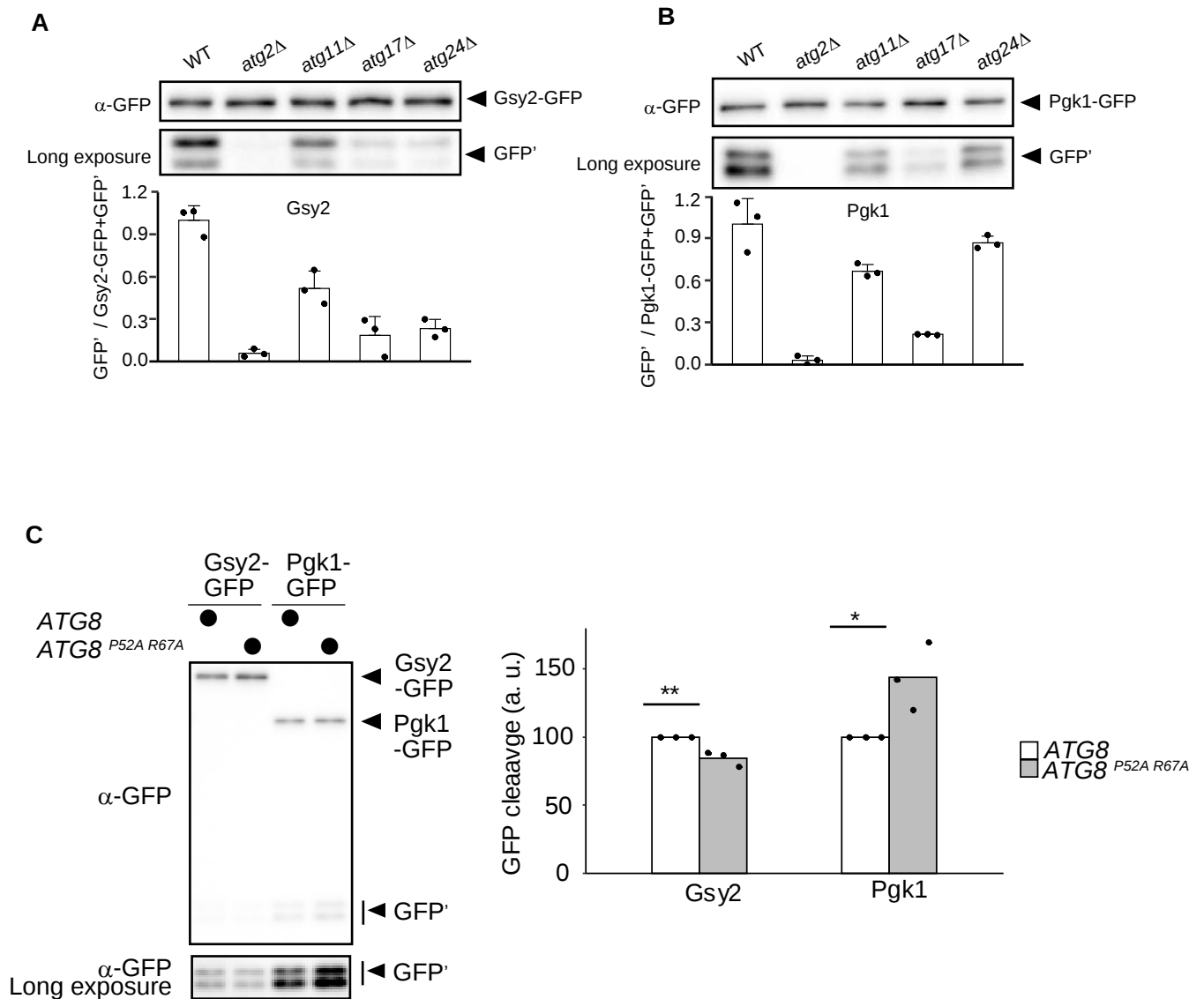


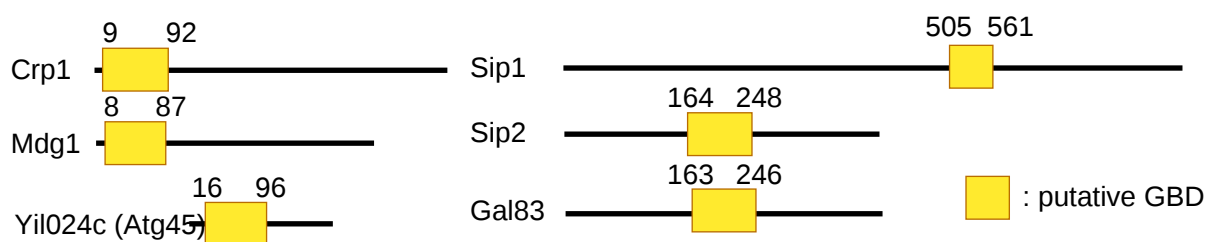
図 10 長時間飢餓時のグリコーゲンのオートファジーは Atg8 の AIMBR に依存する

(A) Gsy2-GFP を発現させた各細胞を窒素源飢餓培地で 48 時間培養後に細胞を回収して、Gsy2-GFP と GFP' をイムノブロットングによって検出した。各バンドを定量し、GFP' / (GFP 融合タンパク質 + GFP') の比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 ± S.D。

(B) Pgk1-GFP を発現させた各細胞を窒素源飢餓培地で 48 時間培養後に細胞を回収して、Pgk1-GFP と GFP' をイムノブロットングによって検出した。各バンドを定量し、GFP' / (GFP 融合タンパク質 + GFP') の比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 ± S.D。

(C) 野生株と Atg8 の 62 番目のプロリンと 67 番目のアルギニンにアラニン置換を導入して株に Gsy2-GFP あるいは Pgk1-GFP を発現させ、窒素源飢餓 48 時間培養後に細胞を回収し、Gsy2-GFP と遊離 GFP をイムノブロットングによって検出した。各バンドを定量し、GFP/GFP 融合タンパク質の比率を算出した後、野生株での比率を 100 としてグラフに示した。P 値は対応のない Student' s t-test により算出した (*: P<0.05, **: P<0.01)。

A



B

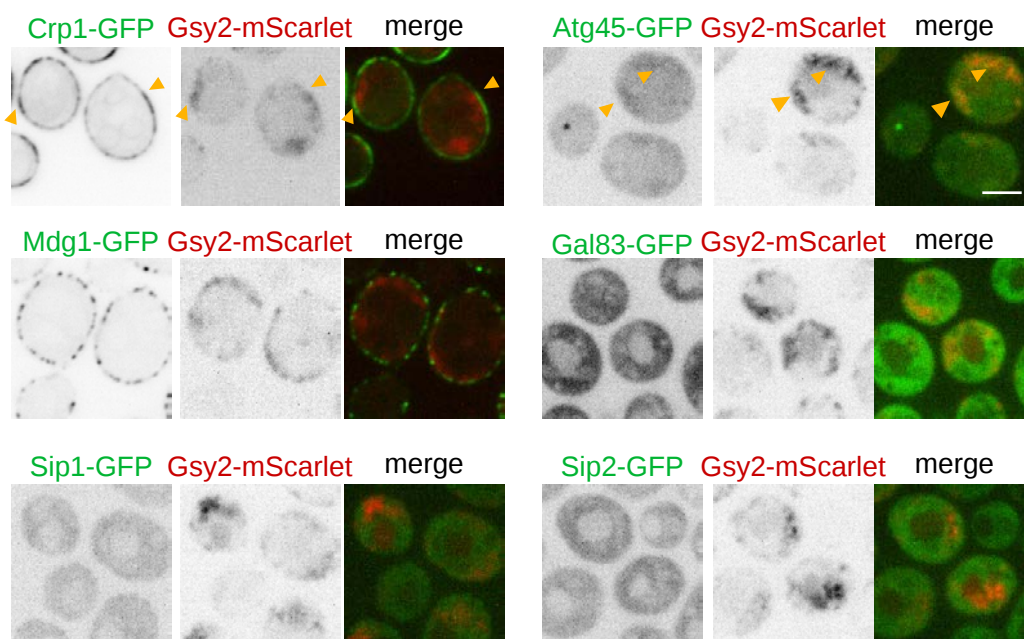


図 11 グリコファジー制御タンパク質候補とその局在

(A) 推定 Glycogen binding domain (GBD、Pfam domain : PF16561) を有しているタンパク質の一覧。

(B) GFP を融合させた (A) のタンパク質と Gsy2-mScarlet を共発現させ、窒素源飢餓 2 時間での局在を観察した。スケールバー：2 μ m。矢頭：Gsy2 と共局在を示している部分。

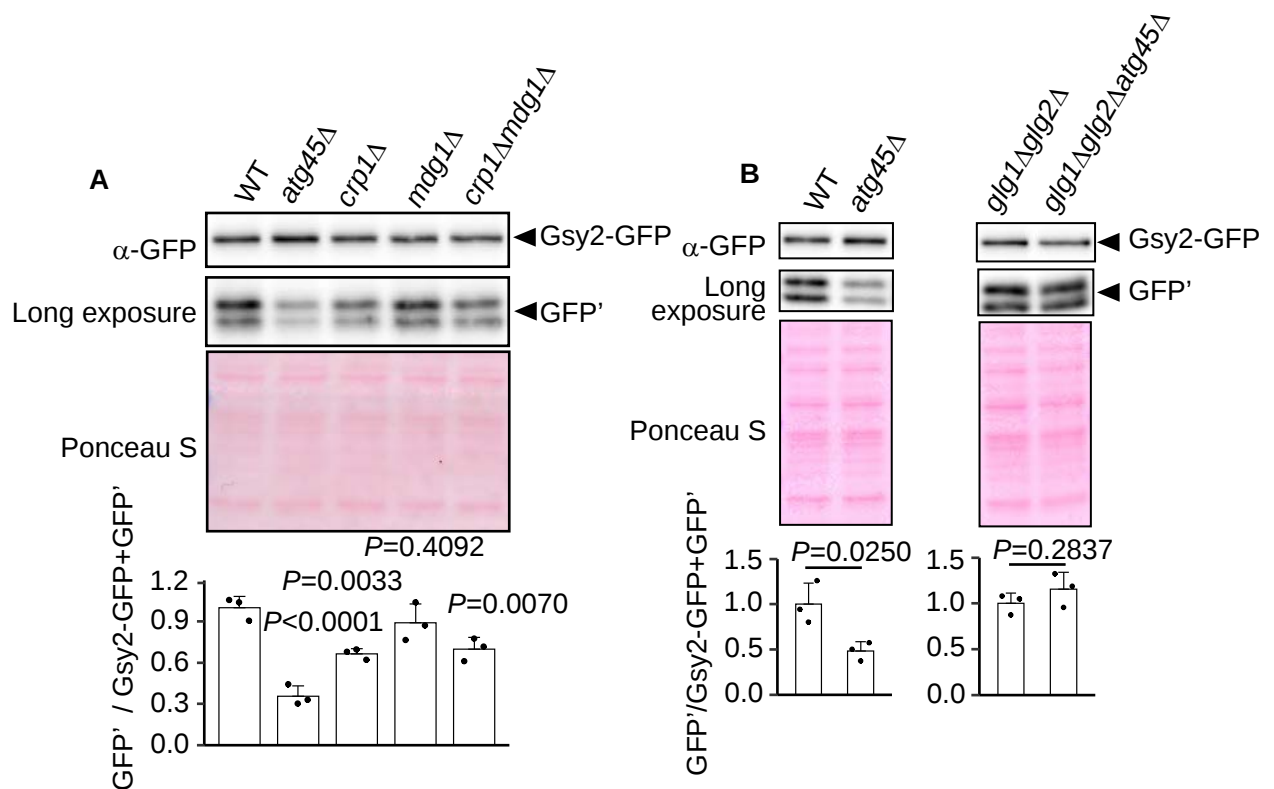


図 12 Atg45(Yil024c) はグリコファジーに関与する

(A) 野生株、*atg45Δ*、*crp1Δ*、*mdg1Δ*、*crp1Δmdg1Δ* 株に Gsy2-GFP を発現させ、窒素源飢餓 48 時間において細胞を回収し、Gsy2-GFP と遊離 GFP をウェスタンブロッティングにより検出した。各バンドを定量し、 $GFP' / (GFP \text{ 融合タンパク質} + GFP')$ の比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 ±S.D. *P* 値はダネット検定により算出し図に示した。

(B) 野生株、*atg45Δ*、*glg1Δglg2Δ*、*glg1Δglg2Δatg45Δ* 株に Gsy2-GFP を発現させ、窒素源飢餓 48 時間において細胞を回収し、Gsy2-GFP と遊離 GFP をイムノブロッティングにより検出した。各バンドを定量し、 $GFP' / (GFP \text{ 融合タンパク質} + GFP')$ の比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 ±S.D. *P* 値は Welch' s *t*-test により算出し図に示した。

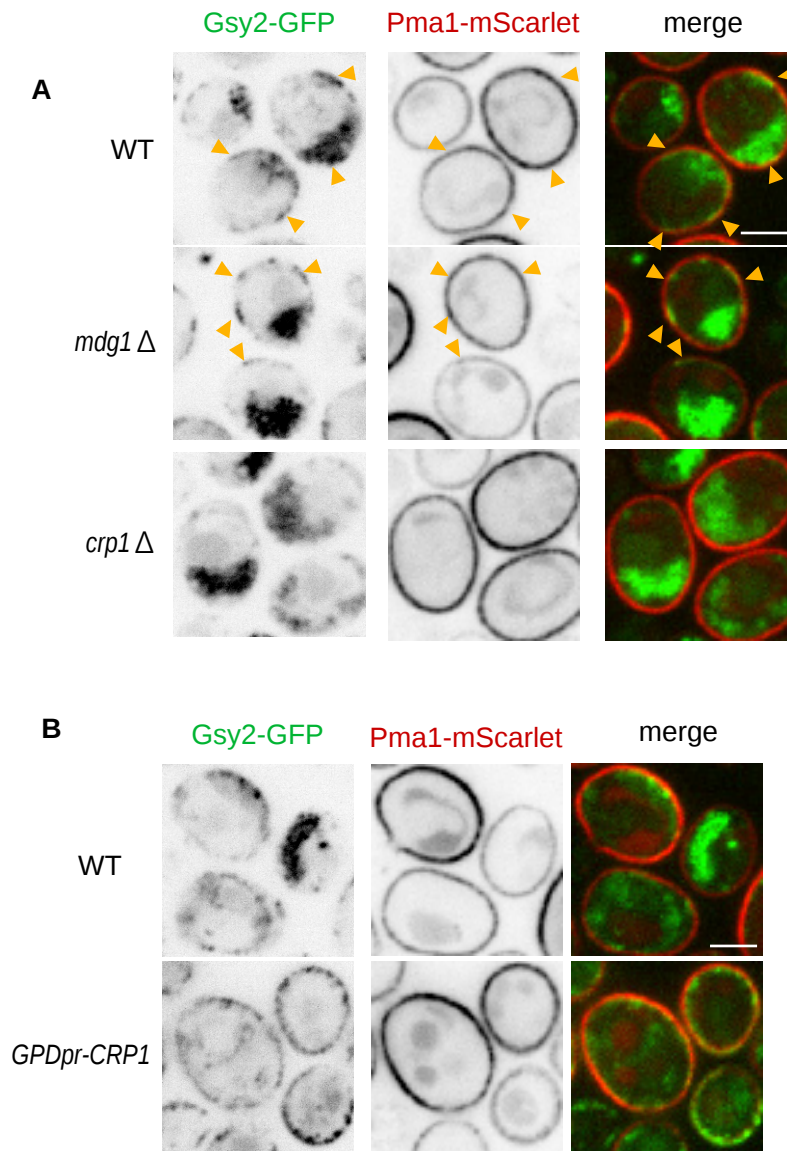


図 13 Crp1 はグリコーゲンを膜にアンカーする

(A) 野生株、*crp1*Δ、*mdg1*Δ、*crp1*Δ*mdg1*Δ 株に Gsy2-GFP と Pma1-mScarlet を共発現させ、窒素源飢餓 2 時間において局在を観察した。矢頭：Gsy2 が細胞膜上に局在している部分。

(B) 野生株と Crp1 を *GPD* プロモーター下で過剰発現した株に Gsy2-GFP と Pma1-mScarlet を共発現させ、窒素源飢餓 2 時間において局在を観察した。

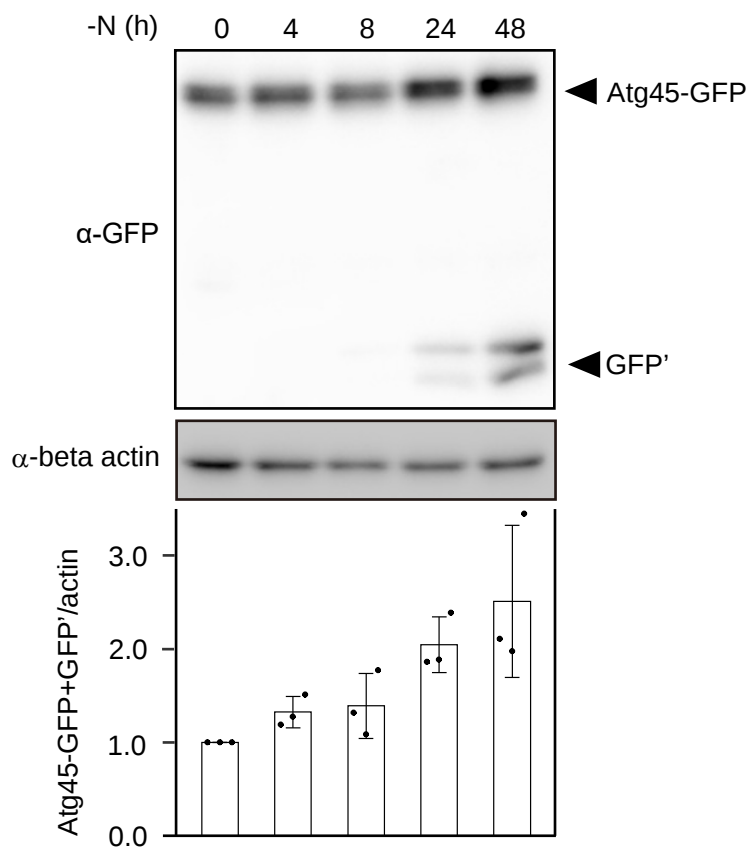
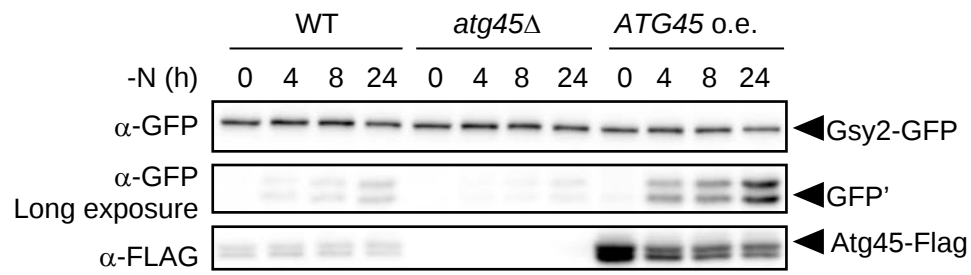


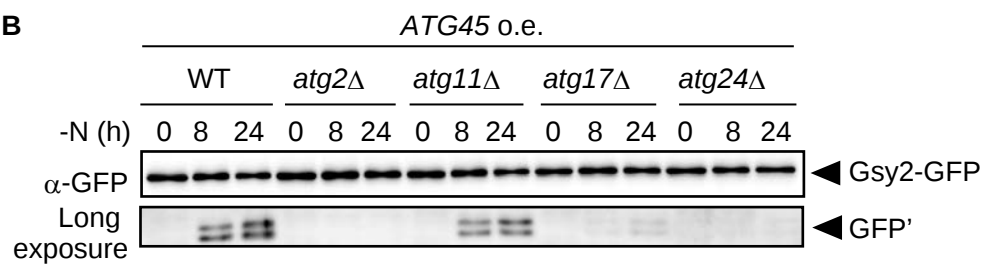
図 14 Atg45 の発現は長時間の窒素源飢餓時に増加する

野生株に Atg45-GFP を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロッティングによって、各時間での Atg45-GFP と β -アクトチンのバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体とアクトチン抗体で検出した。各バンドを定量し、Atg45-GFP+GFP' / β -アクトチンの比率を算出してグラフに示した。n=3、平均 $\pm$ S.D。

A



B



C

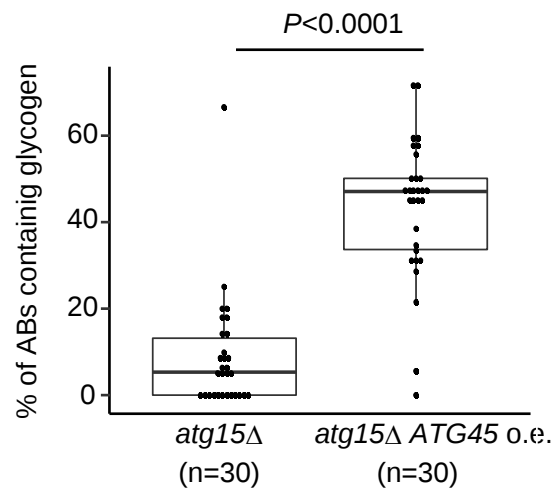
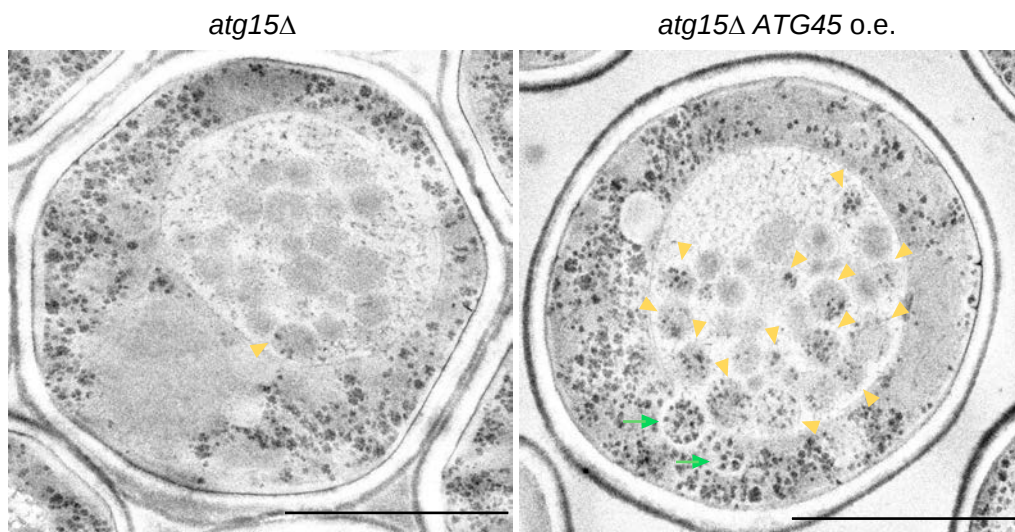


図 15 Atg45 の過剰発現でグリコファジーが促進する

(A) 野生株、*atg45Δ* 株と *ACT1* プロモーター下で、Atg45-Flag を過剰発現させた株 (*ATG45* o.e.) に Gsy2-GFP を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロットングによって、各時間での Gsy2-GFP と GFP のバンドを検出した。また、抗 Flag 抗体を用いて、Atg45-Flag を検出した。

(B) 野生株と Atg2,Atg11,Atg17,Atg24 を欠損させた細胞に Atg45 を過剰発現させるとともに、Gsy2-GFP を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロットングによって、各時間での Gsy2-GFP と GFP のバンドを検出した。

(C) *atg15Δ* 株と *atg15Δ* 株に Atg45 を過剰発現させた株を窒素源飢餓培地で 6 時間培養した後、PATA g 染色後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。各細胞でのグリコーゲンを含む AB の割合を算出し、箱ひげ図で示した。P 値は対応のない Wilcoxon の順位和検定により算出し図に示した。グリコーゲンを含む AB のを黄色の矢頭で示し、グリコーゲンを含むオートファゴソームを緑色の矢印で示した。スケールバー：2 μm。

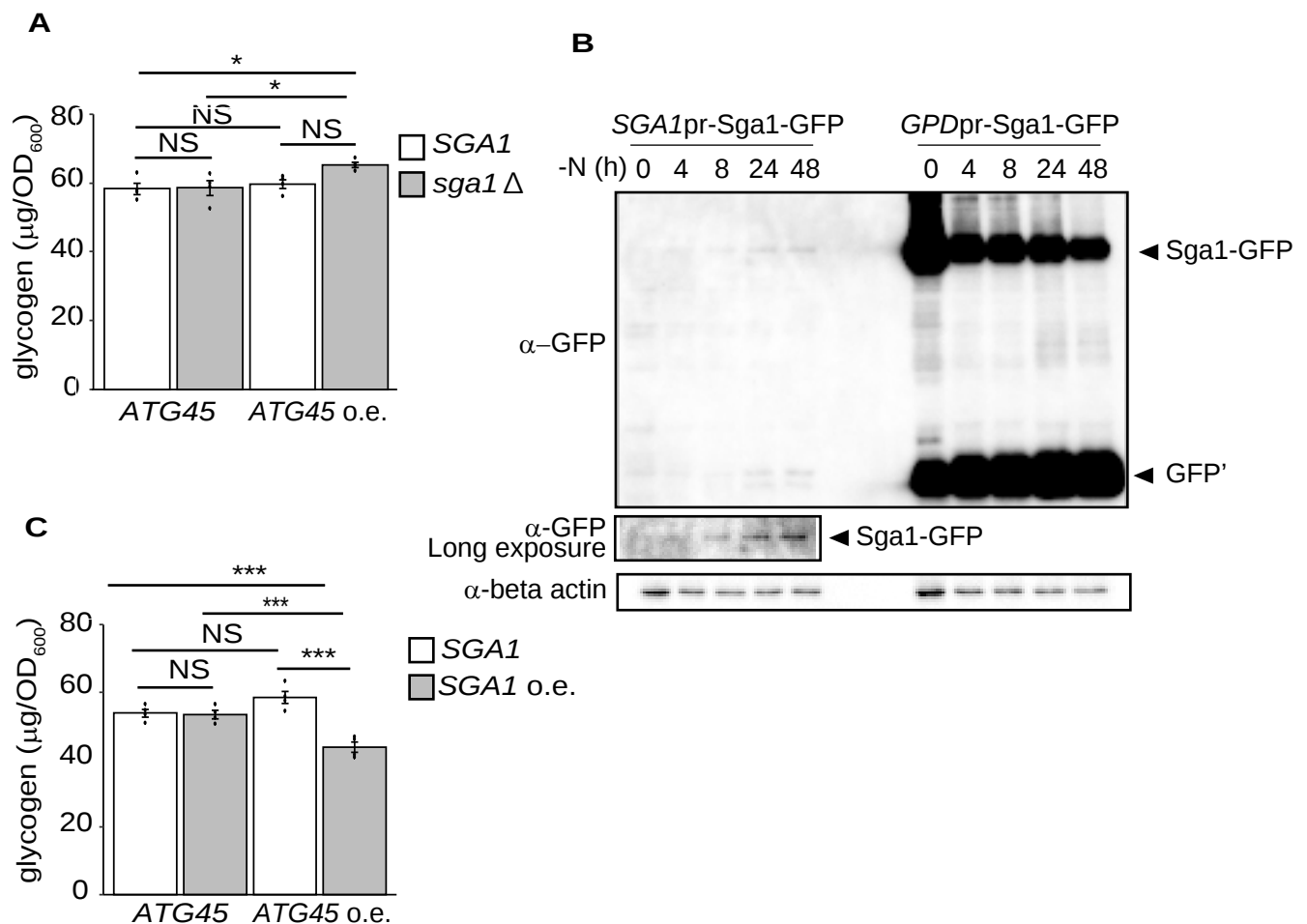


図 16 Atg45 と Sga1 の過剰発現で細胞内グリコーゲン量が低下する

(A) 野生株、ATG45 過剰発現株、sga1Δ 株、sga1Δ 株に Atg45 を過剰発現した株を窒素源飢餓培地で 48 時間培養し、細胞内のグリコーゲン量を定量した。グラフは、1OD₆₀₀ 当たりの細胞のグリコーゲン量 (μg) を示した。

(B) 野生株に Sga1-GFP を発現させた細胞と Sga1 を GPD プロモーター下で発現させた細胞を窒素源飢餓条件で経時的に回収し、Sga1-GFP と GFP の量をイムノブロッティングで抗 GFP 抗体を用いて検出した。また、Actin のタンパク質量も抗アクチン抗体を用いて検出した。

(C) 野生株、ATG45 過剰発現株、SGA1 過剰発現株 (GPD プロモーター下)、ATG45 と SGA1 の両方の過剰発現株を窒素源飢餓培地で 48 時間培養し、細胞内のグリコーゲン量を定量した。グラフは、1OD₆₀₀ 当たりの細胞のグリコーゲン量 (μg) を示した。

P 値はテューキーの検定により算出した (***: P<0.001、**: P<0.01、*: P<0.05、NS: not significant)。

n=4, 平均 ± S.E.

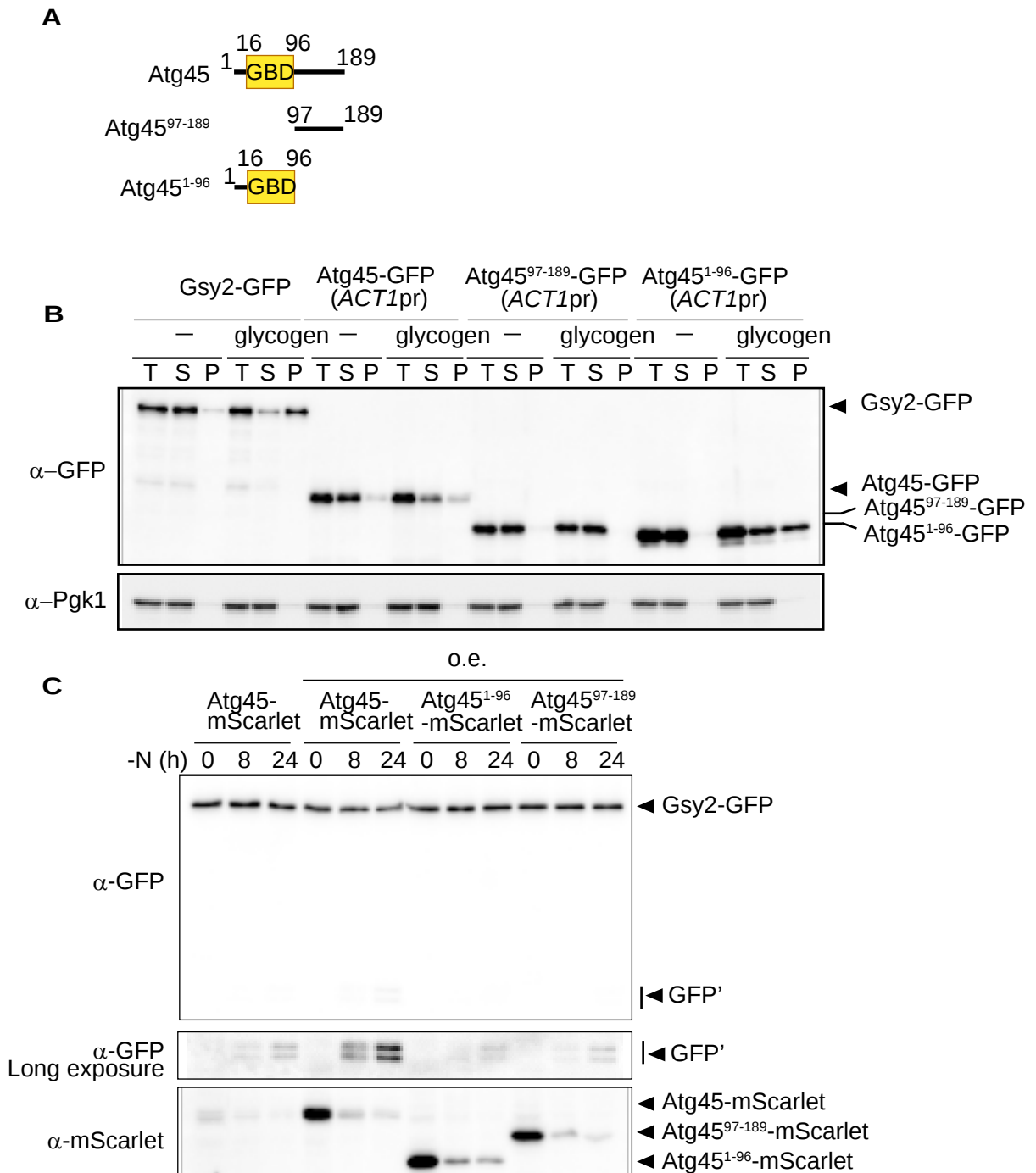


図 17 Atg45 の機能には GBD とそれ以外の領域の両方が必要である

(A) Atg45 と GBD を欠損させた Atg45(Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹)、GBD 以外を欠損させた Atg45(Atg45¹⁻⁹⁶) のモデル図

(B) *glg1Δglg2Δ* 株に Gsy2-GFP, Atg45-GFP, Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-GFP、Atg45¹⁻⁹⁶-GFP を発現させた細胞を回収し、各細胞の細胞破碎液にグリコーゲンを添加した後、遠心して各 GFP 融合タンパク質のペレットへの移行をイムノブロッティングによって抗 GFP 抗体を用いて検出し、評価した。また、抗 Pgk1 抗体を用いてグリコーゲン結合能を持たないサイトゾルタンパク質である Pgk1 のペレットへの移行も評価した。

T: Total lysate、S: Supernant、P: pellet

(C) Atg45-mScarlet を発現させた細胞と Atg45-mScarlet、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-mScarlet、Atg45¹⁻⁹⁶-mScarlet を過剰発現させた細胞に Gsy2-GFP を導入し、窒素源飢餓培地で経時的に各細胞を回収し、イムノブロッティングによって、各時間での GFP と mScarlet のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 mCherry 抗体で検出した。

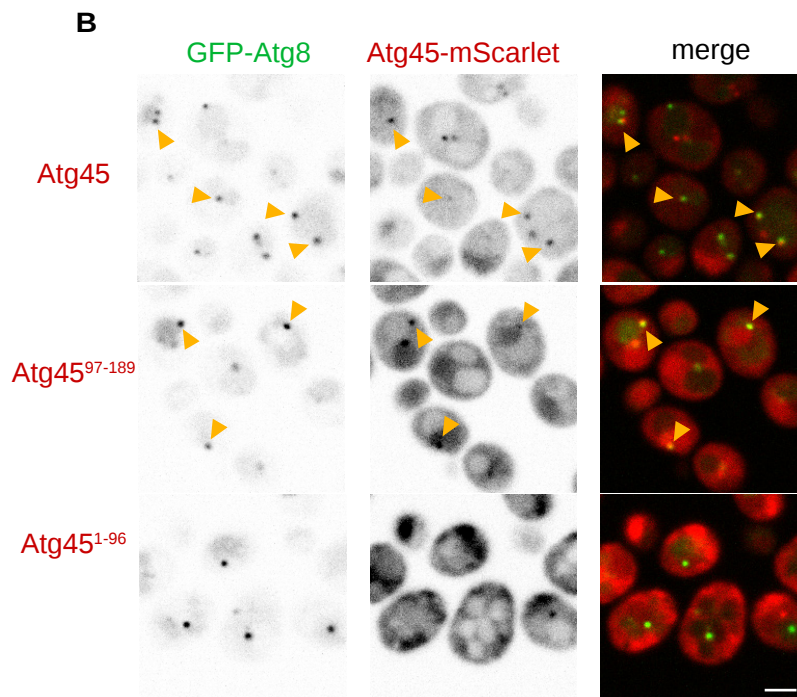
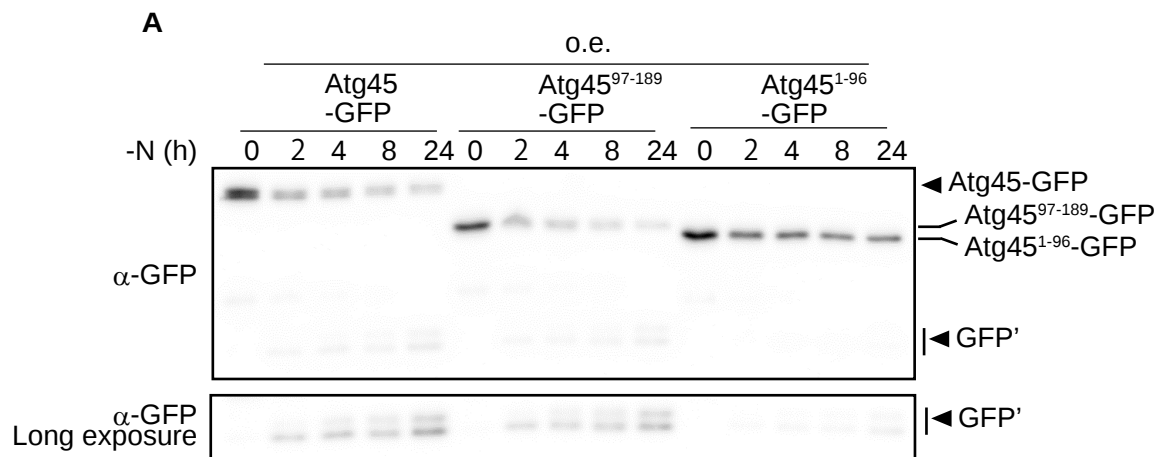


図 18 Atg45 の GBD 以外の領域は Atg45 の分解されやすさを決定する

(A) Atg45-GFP、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹-GFP、Atg45¹⁻⁹⁶-GFP を過剰発現させた細胞を、窒素源飢餓培地で経時的に回収し、イムノブロットングによって、各時間での Atg45-GFP と GFP のバンドを検出した。

(B) GFP-Atg8 および *ACT1* プロモーター下で Atg45-mScarlet、Atg45⁹⁷⁻¹⁸⁹mScarlet、Atg45¹⁻⁹⁶-mScarlet を発現させた細胞を窒素源飢餓培地で 2 時間培養し、蛍光顕微鏡を用いて局在を観察した。

GFP-Atg8 と各 Atg45-mScarlet が共局在している輝点を矢頭で示した。スケールバー：2 μm。

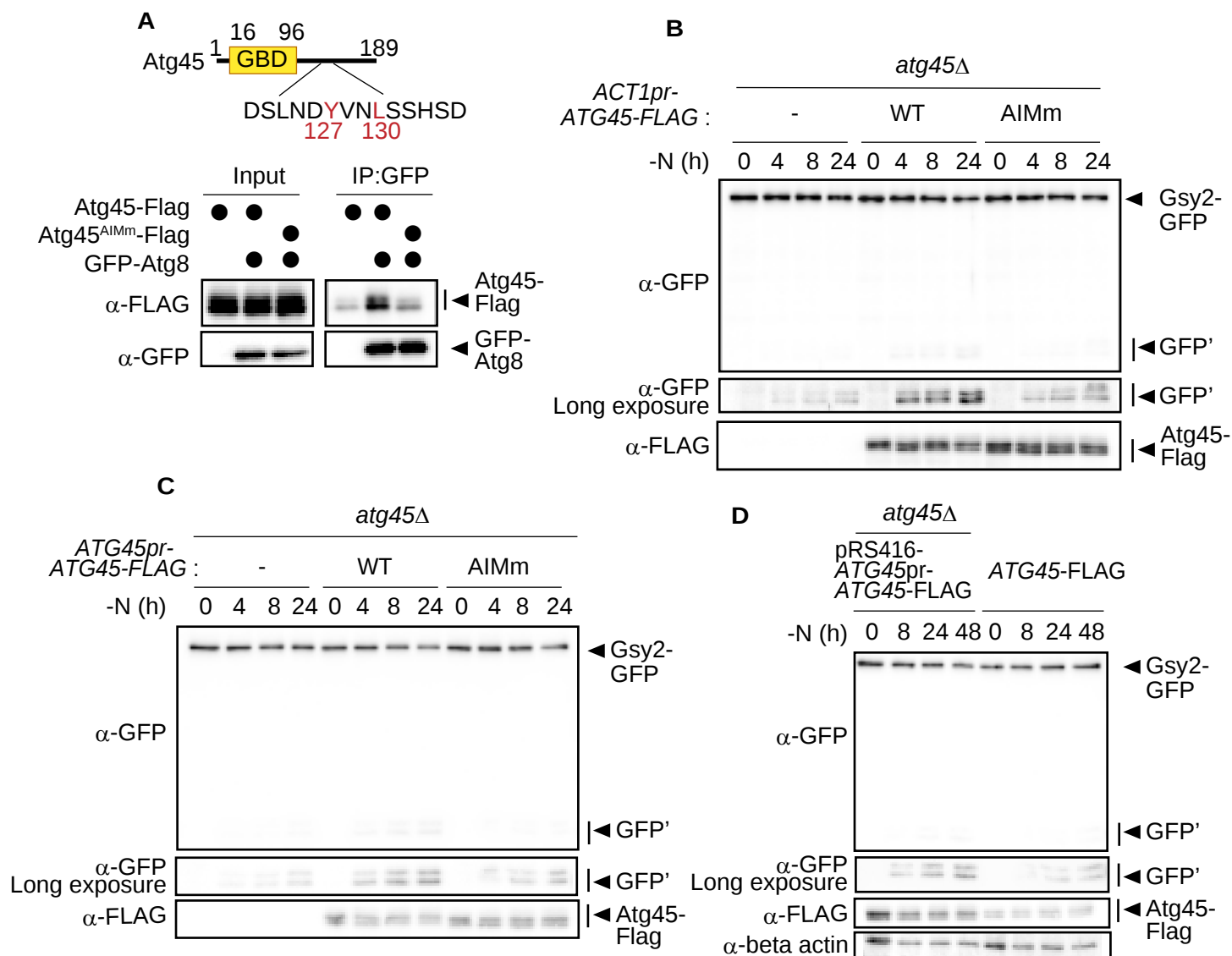


図 19 Atg45 と Atg8 の結合がグリコファジーに重要

(A) 上 : Atg45 と推定 AIM 領域。W サイトと L サイトを赤色で示した。下 : *atg45Δatg15Δ* 株に GFP-Atg8 とプラスミドを用いて *ACT1* プロモーター下で、Atg45-Flag あるいは AIM に変異 (AIMm) を導入した Atg45-Flag を発現させ、窒素源飢餓培地 1 時間で細胞を回収し、GFP トラップを用いて、GFP-Atg8 から共免疫沈降 (IP) を行った。その後、イムノブロッティングによって、GFP-Atg8 と Atg45-Flag のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(B) Atg45 を欠損させ、プラスミドを用いて *ACT1* プロモーター下で Atg45-Flag あるいは Atg45^{AIM}-Flag を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロッティングによって、各時間での Gsy2-GFP 及び GFP と Atg45-Flag のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(C) *atg45Δ* 株に Gsy2-GFP を発現させた株に、プラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で Atg45-Flag あるいは Atg45^{AIM}-Flag を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロッティングによって、各時間での Gsy2-GFP 及び GFP と Atg45-Flag のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(D) Atg45 を欠損させ、Gsy2-GFP を発現させた株にプラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で Atg45-Flag を発現させた細胞と野生株に Gsy2-GFP と Atg45-Flag を発現させた株を窒素源飢餓条件で培養し、経時的に細胞を回収して、イムノブロッティングにより、Gsy2-GFP 及び GFP と Atg45-3xFlag、Actin の量をそれぞれ抗 GFP 抗体、抗 Flag 抗体、抗 Actin 抗体を用いて検出した。

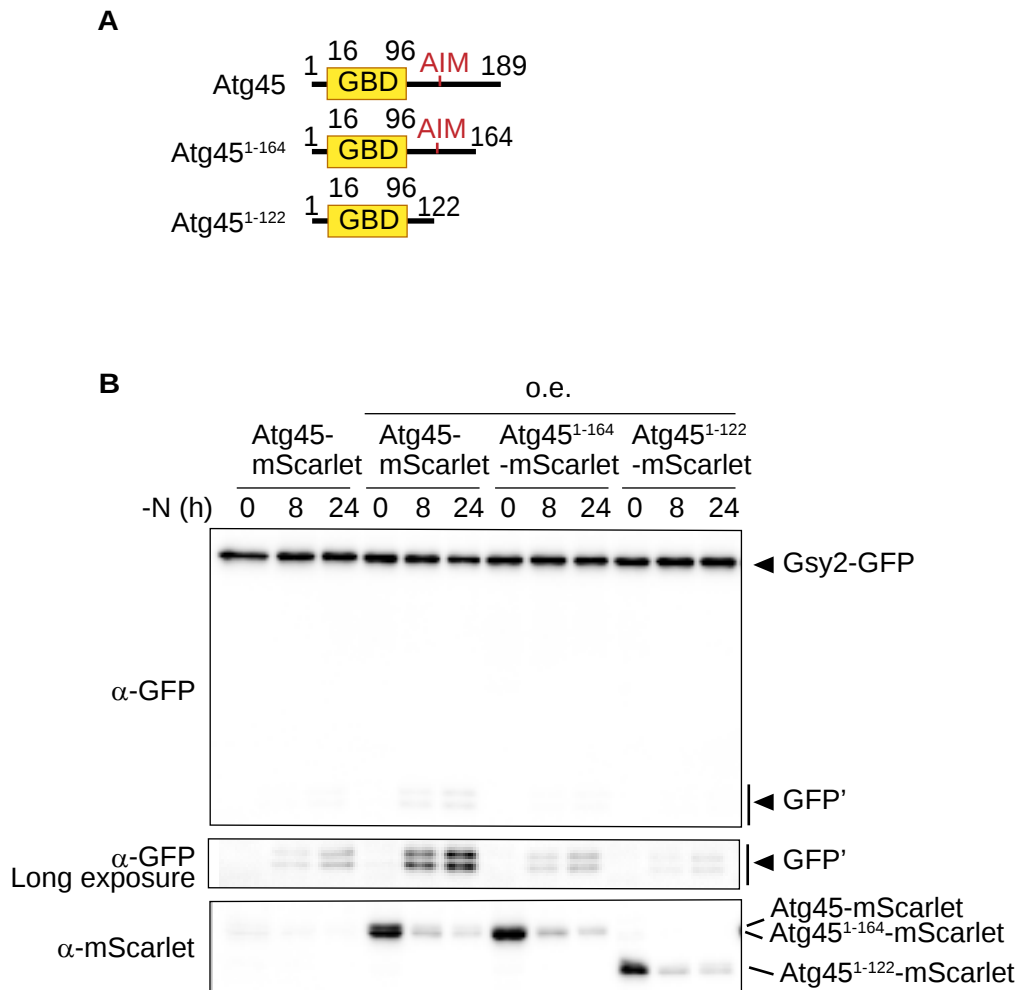


図 20 Atg45 の C 末端領域もグリコファジーに必要

(A) Atg45 の全長と C 末端 25 残基を欠損させた Atg45(Atg45¹⁻¹⁶⁴) 及び、C 末端側から 67 残基を欠損させた Atg45(Atg45¹⁻¹²²) を図に示した。

(B) Atg45-mScarlet を発現させた細胞と Atg45-mScarlet、Atg45¹⁻¹⁶⁴-mScarlet、Atg45¹⁻¹²²-mScarlet を *ACT1* プロモーター下で発現させた細胞に Gsy2-GFP を導入し、窒素源飢餓培地で経時的に各細胞を回収し、イムノブロッティングによって、各時間での GFP と mScarlet のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 mCherry 抗体で検出した。

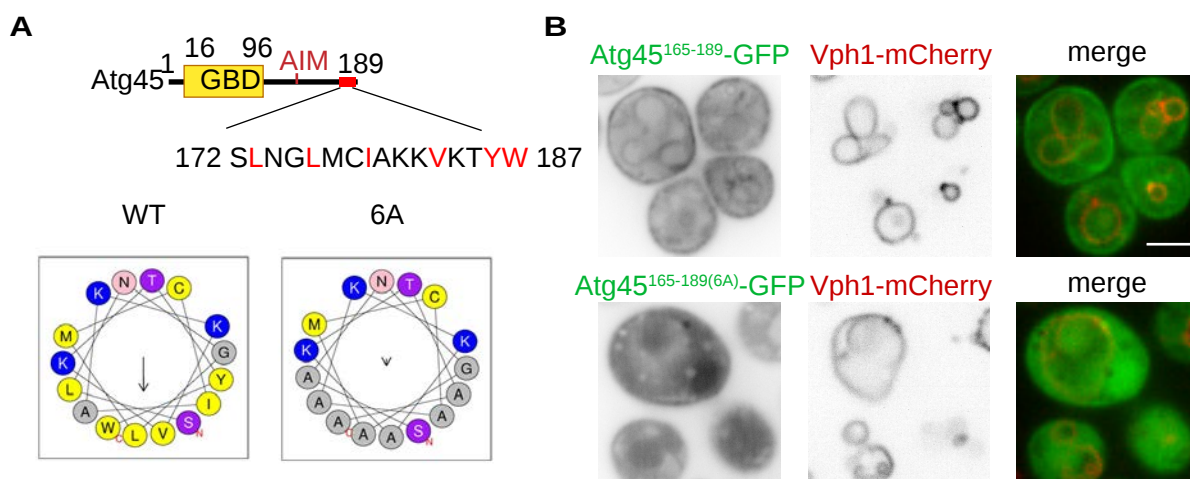


図 21 Atg45 の C 末端領域には膜結合領域が存在する

(A) Atg45 の全長と C 末端の推定 helix 領域の配列と共に図に示した。また、推定 helix 領域のヘリカルホイールを HeliQuest を用いて予測し、図示した。左が野生型、右が疎水面の疎水性アミノ酸 6 個にアラニン置換を導入したもの (6A) の予測結果。推定ヘリックス配列中のアラニン置換を導入したアミノ酸は赤で示した。

(B) 推定 helix を含む Atg45 の C 末端 25 アミノ酸領域 (Atg45¹⁶⁵⁻¹⁸⁹) とその疎水面にアラニン置換を導入した変異体 (Atg45^{165-189(6A)}) に GFP を融合させ、*ACT1* プロモーター下でプラスミドを用いて発現させ、窒素源飢餓 2 時間の局在を Vph1-mCherry とともに蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー：2 μ m。

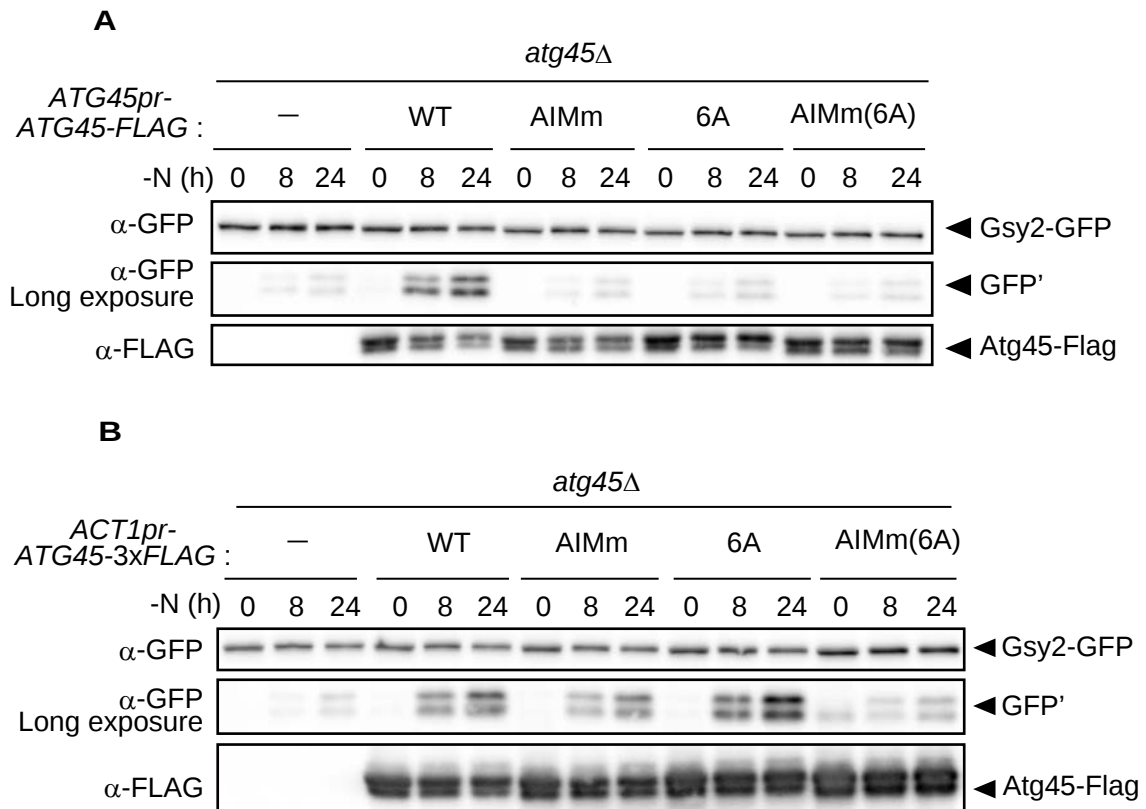


図 22 Atg45 の膜結合能がグリコファジーに重要である

(A) *atg45Δ* 株に Gsy2-GFP を発現させた株に、プラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で野生型あるいは各変異体の Atg45-Flag を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロットングによって、各時間での Gsy2-GFP 及び GFP と Atg45-Flag のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 Flag 抗体を用いて検出した。

(B) *atg45Δ* 株に Gsy2-GFP を発現させた株に、プラスミドを用いて *ACT1* プロモーター下で野生型あるいは各変異体の Atg45-Flag を発現させ、窒素源飢餓培地で経時的に細胞を回収し、イムノブロットングによって、各時間での Gsy2-GFP 及び GFP と Atg45-Flag のバンドをそれぞれ抗 GFP 抗体と抗 Flag 抗体を用いて検出した。

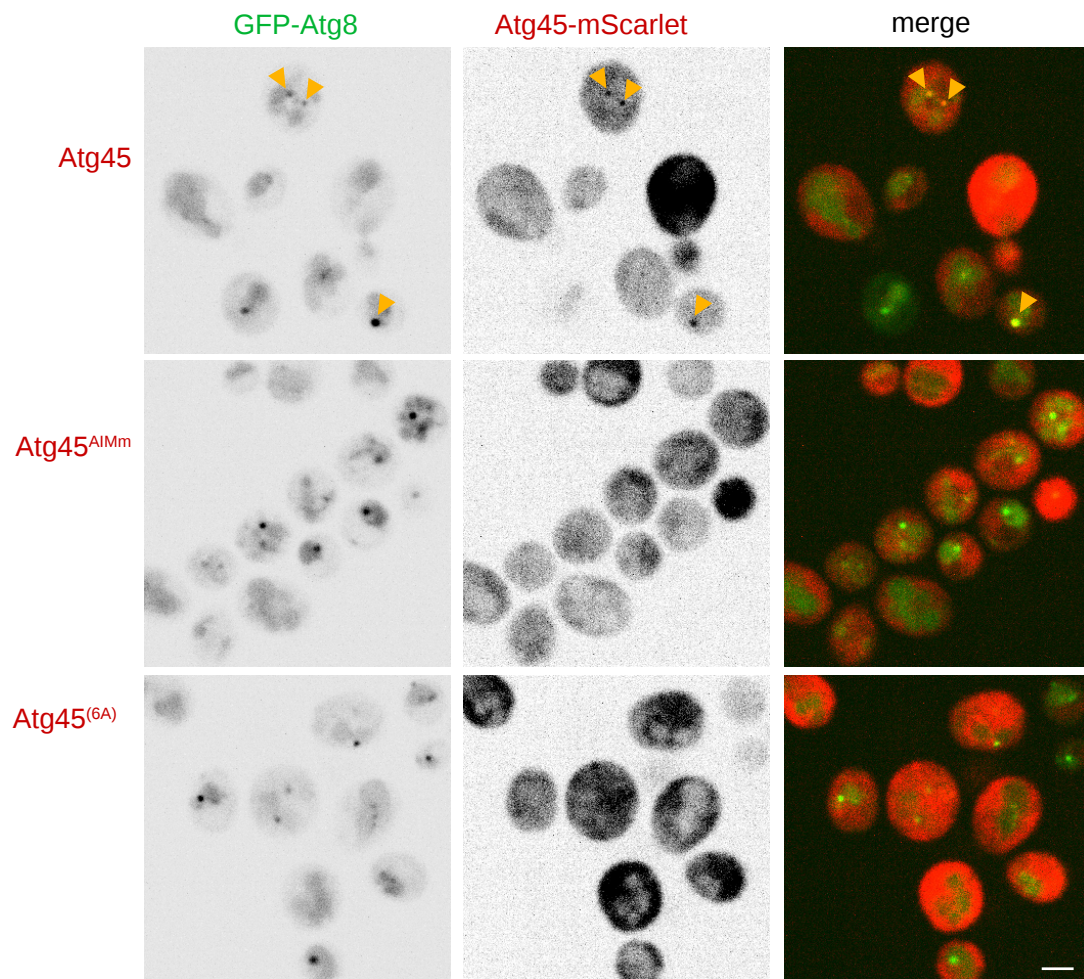


図 23 Atg45 の膜結合能は Atg45 の Atg8 との共局在に必要

*atg45*Δ 株に GFP-Atg8 とプラスミドを用いて *ATG45* プロモーター下で野生型あるいは各変異体の Atg45-mScarlet を発現させ、窒素源飢餓培地 2 時間で窒素源飢餓 2 時間の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。矢頭：Gsy2 が細胞膜上に局在している部分。

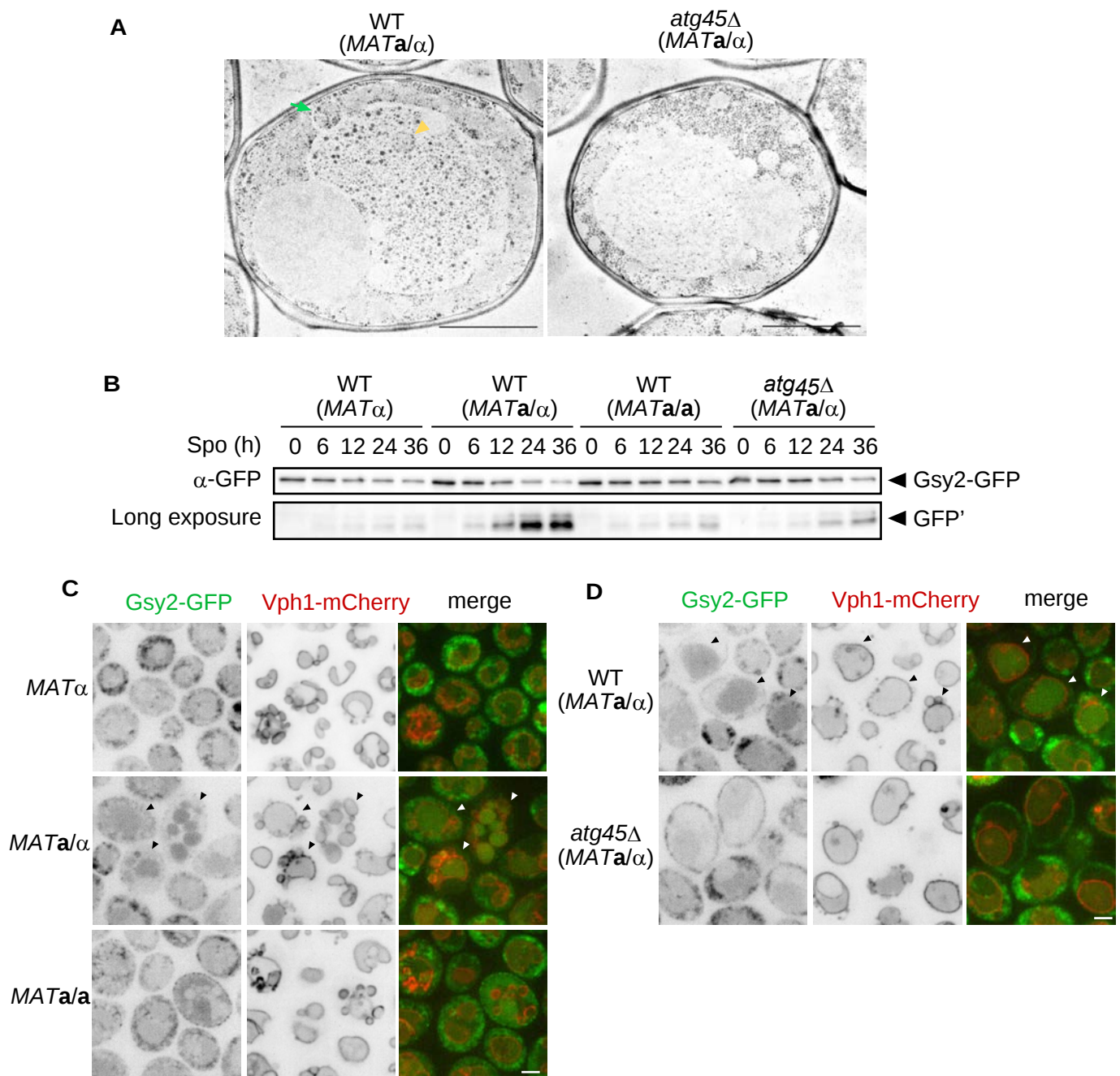


図 24 Atg45 は胞子形成時のグリコファジーにも重要

(A) 野生株 (*MATa/α*)、*atg45Δ*(*MATa/α*) 株を胞子形成培地 (KAc) で 12 時間培養した後、PATA g 染色後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。オートファゴソームを緑色の矢印で、AB を黄色の矢頭で示した。スケールバー：2 μ m。

(B) 野生株 (*MATα*)、野生株 (*MATa/α*)、野生株 (*MATa/a*)、*atg45Δ*(*MATa/α*) 株を胞子形成培地 (KAc) で経時的に回収し、イムノブロッティングによって、各時間での Gsy2-GFP と GFP のバンドを検出した。

(C) 野生株 (*MATα*)、野生株 (*MATa/α*)、野生株 (*MATa/a*) に Gsy2-GFP と Vph1-mCherry を発現させ、胞子形成培地 (KAc) で 12 時間培養した後、Gsy2-GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。GFP が濃縮している液胞を矢頭で示した。スケールバー：2 μ m

(D) 野生株 (*MATa/α*)、*atg45Δ*(*MATa/α*) 株に Gsy2-GFP と Vph1-mCherry を発現させ、胞子形成培地 (KAc) で 12 時間培養した後、Gsy2-GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。GFP が濃縮している液胞を矢頭で示した。スケールバー：2 μ m

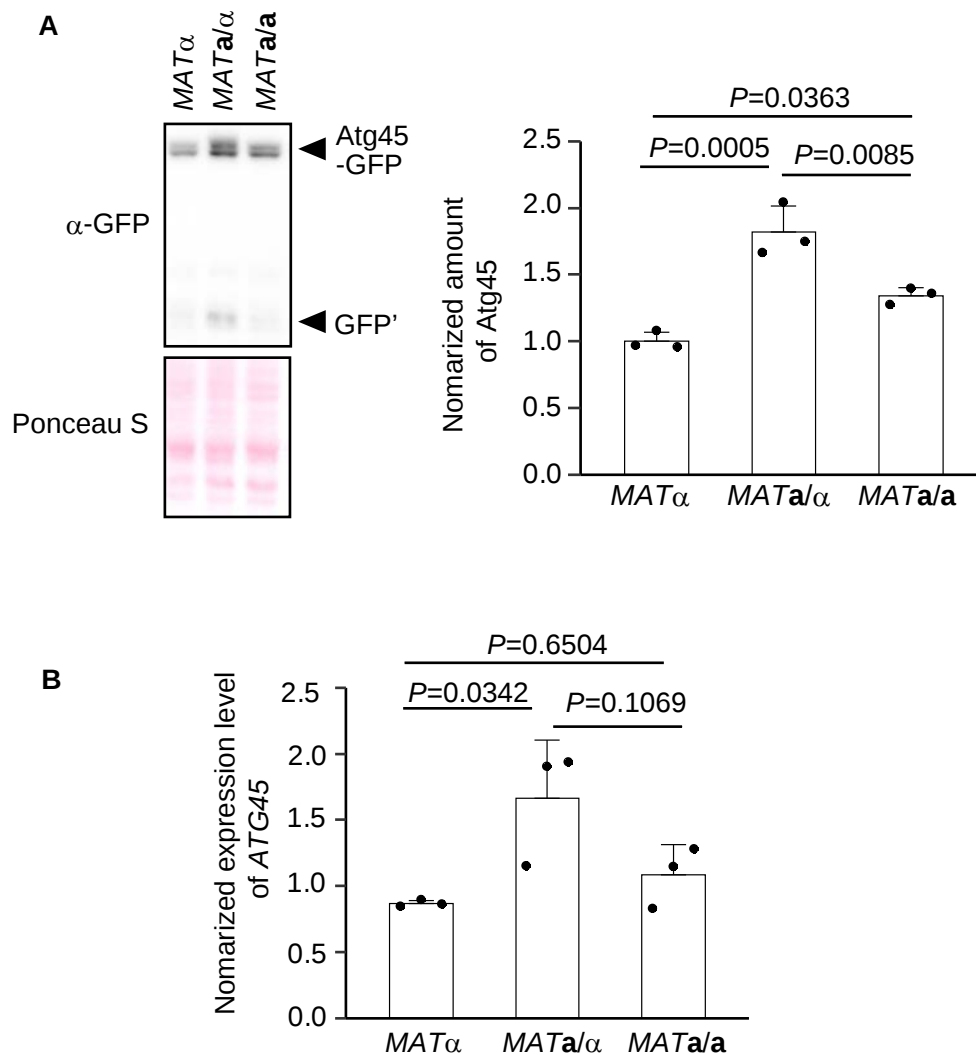


図 25 Atg45 の発現は胞子形成時に増加する

(A) 野生株 (*MATα*)、野生株 (*MATa/α*)、野生株 (*MATa/a*) に Atg45-GFP を発現させ、胞子形成培地 (KAc) で 12 時間培養後回収し、イムノブロッティングによって、Atg45-GFP と GFP' のバンドを検出した。各バンドを定量し、Atg45-GFP+GFP' の相対量を *MATα* での発言を 1.0 としてを算出してグラフに示した。*P* 値は Tukey' s test により算出し図に示した。n=3、平均 ±S.D.

(B) 野生株 (*MATα*)、野生株 (*MATa/α*)、野生株 (*MATa/a*) 胞子形成培地 (KAc) で 12 時間培養後回収し、mRNA 量を qPCR によって測定した。*MATα* での発言を 1.0 として相対量を算出し、グラフに示した。*P* 値は Tukey' s test により算出し図に示した。n=3、平均 ±S.D.

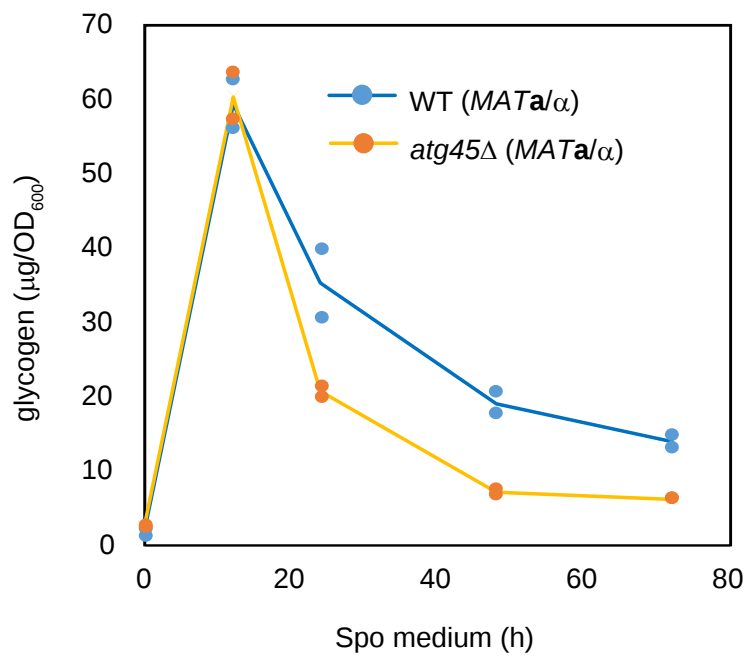


図 26 Atg45 は孢子形成時のグリコーゲン蓄積に関与する

生株 (MATa/α)、*atg45Δ*(MATa/α) 株を孢子形成培地 (KAc) で培養し、経時的に細胞を回収し、細胞内のグリコーゲンをグルコースに分解した後、定量した。細胞 1OD₆₀₀ あたりのグリコーゲン由来のグルコース量 (μg) を算出し、グラフを作成した。

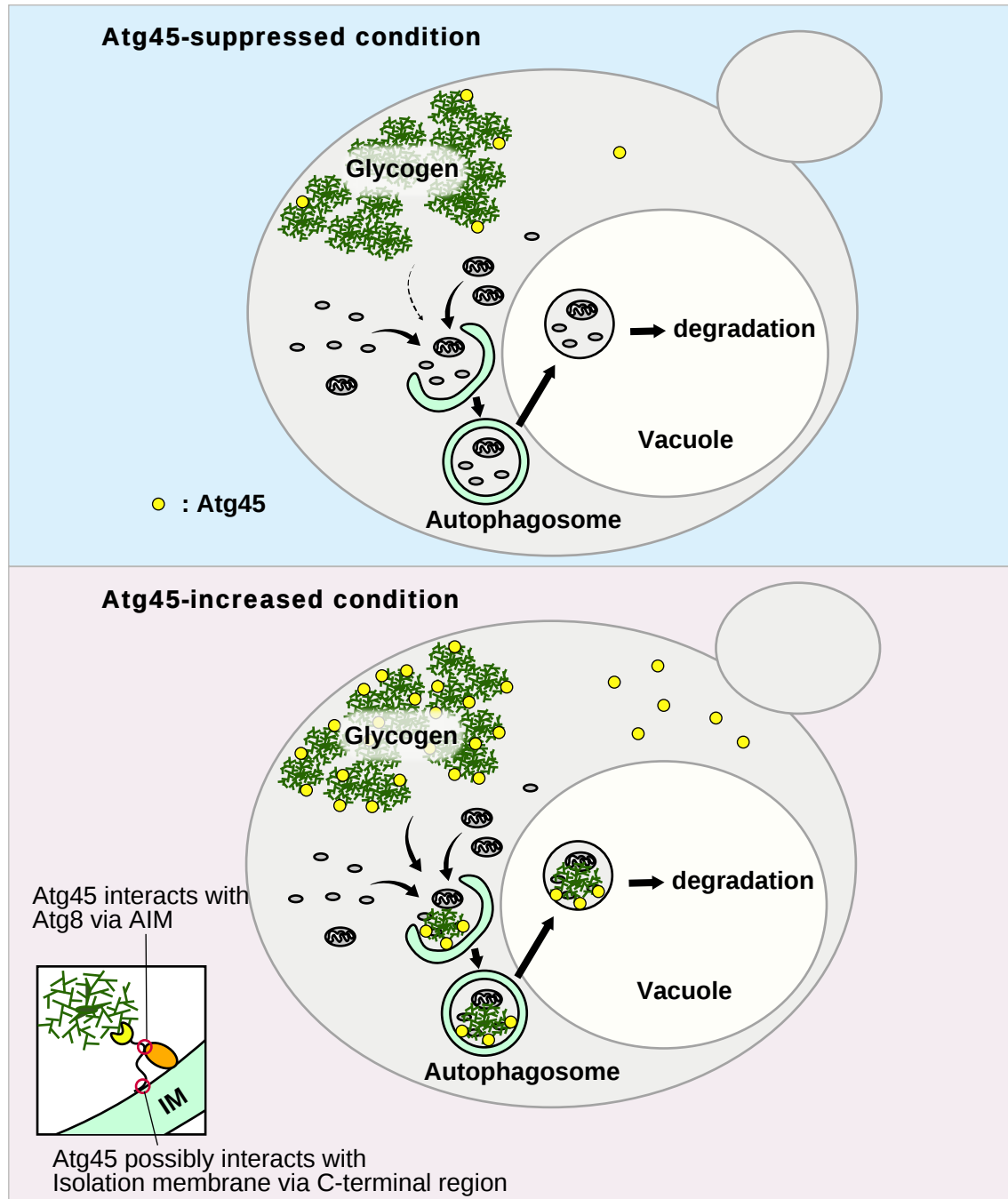


図 27 Atg45 によるグリコファジーの制御機構のモデル図

上：短時間の窒素飢餓時など Atg45 の発現が低レベルである条件では、オートファジーが誘導されてもグリコーゲンがオートファゴソーム内に取り込まれず、液胞に輸送されない。

下：長時間の窒素源飢餓時などの Atg45 の発現が増加した条件では、Atg45 の作用によりグリコファジーが進行する。Atg45 は、Atg8 と隔離膜にそれぞれ、AIM と C 末端の膜結合領域を介して結合することで、グリコーゲンを隔離膜に効率よくアンカーしていると考えられる。