

# 研究助成金交付申請書

一般財団法人 伊藤忠兵衛基金 御中

本申請者は「オートファジーにおける膜形成分子機構の解明に関する研究」を行っています。

今般、貴法人が研究奨励助成金の交付を計画されていることを知り、ここにその交付申請を致したく存じます。

宜しくお願い致します。

2021 年 11 月 22 日

ふりがな            たばた けいすけ  
申請者                田端 桂介

添付資料

1. 経歴書
2. 研究の概要
3. 研究業績書・著書

## 経歴書

姓 名	田端 桂介
生年月日	1980年 5月 19日
現住所	大阪府豊中市西緑丘 2-2-6-612
現職	大阪大学大学院生命機能研究科 助教
学位	2006年 修士（農学）東京大学 2009年 3月 博士（理学）大阪大学
略歴	2004年 3月 東京農工大学 農学部 卒業
略歴 連絡先	2004年 4月 東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 修士課程 入学
	2006年 3月 東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 修士課程 修了
	2006年 4月 大阪大学大学院生命機能研究科 博士後期課程 3年次編入
	2009年 3月 大阪大学大学院生命機能研究科 博士後期課程 修了
	2009年 4月-2010年 3月 大阪大学微生物病研究所細胞制御分野 特任研究員
	2010年 4月-2010年 12月 大阪大学大学院医学系研究科 遺伝学教室 特任研究員
	2011年 1月-2012年 9月 大阪大学大学院医学系研究科 遺伝学教室 特任助教
	2012年 10月-2015年 3月 大阪大学微生物病研究所 ウイルス研究グループ 特任助教
	2015年 4月-2019年 8月 ドイツ留学 Heidelberg University, Department of Infectious diseases, Molecular virology, Postdoc
	2019年 9月-現在 大阪大学大学院生命機能研究科 細胞内膜動態研究室 助教
	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝学教室／生命機能研究科 細胞内膜動態研究室 TEL: 06-6879-4858, E-Mail: keisuke.tabata@fbs.osaka-u.ac.jp

## 研究の概要

研究題目：オートファジーにおける膜形成分子機構の解明

### 研究目的

オートファジーは、タンパク質や細胞小器官などの細胞内物質を分解しリサイクルするシステムであり、真核生物の細胞に普遍的に備わっている。細胞の恒常性維持に重要であり、多数の疾患と老化の抑制に働く。オートファジーにおける膜動態は複雑であり、研究分野は急速に発展したとはいえ分子機構には多くの謎が残されている。

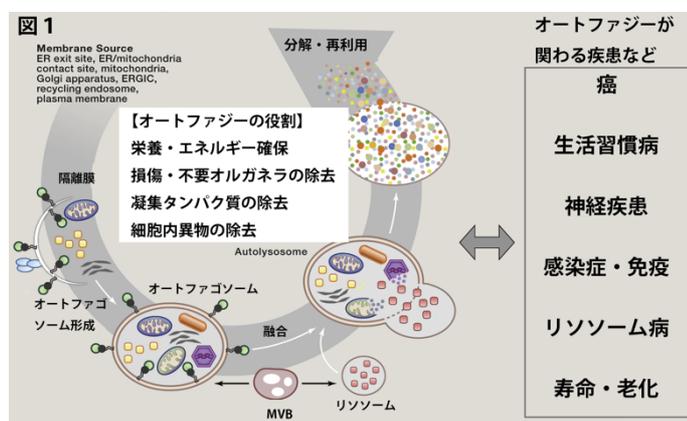
本研究では、オートファジーにおける最大の謎である**膜形成の分子機構の解明**を目指す。申請者は、15年にわたりオートファジー基礎研究を行っており、オートファジー関連因子の発見とその機能を明らかにしてきた（研究業績\_学術論文 3, 5, 12, 14-17）。本課題についても独自に重要な手がかりを既に得ており、それらに基づいた多面的で他の追従を許さない研究を展開し、オートファジーの更なる理解を進めることを目的とする。

### 本研究の学術的背景と研究課題の核心をなす学術的「問い」

オートファジー（マクロオートファジー）は細胞内分解系であり、1) 飢餓などのストレス時の栄養源確保、2) 新陳代謝（代謝回転）機能、3) 細胞内に出現した有害物の選択的隔離除去という主要な3つの機能に関わることで細胞の恒常性維持に貢献している。酵母 *ATG* を手がかりに哺乳類オートファジーの分子機構と生理的意義の解析が行われ、オートファジーが生体に不可欠な多彩で重要な機能を持つことが明らかになってきた。大隅博士は、このオートファジーの基本的仕組みを解き明かした功績により2016年ノーベル生理学医学賞を受賞している。

オートファジーの膜動態では、まず細胞質に隔離膜と呼ばれる扁平な膜構造が現れることで始まる（図1）。この膜が伸展・湾曲し、そこにある物質や構造を包み込んで

直径約 1  $\mu\text{m}$  の球状のオートファゴソームと呼ばれる膜構造が形成される。その後オートファゴソームは消化酵素を含むリソソームと融合し、内容物が分解され、アミノ酸などの分解産物は新たなタンパク質合成のために再利用される。この一連の過程をオートファジーと呼ぶ。



大隈博士による *ATG* 遺伝子群の発見を機に全く不明だった分子機構の一部が明らかになったとはいえ、今現在でも多くの本質的な謎が残されている。その中でも中心的な問いである、「オートファジーにおける膜形成分子機構の解明」を本研究で明らかにすることを目指す。

## **本研究の意義と展望**

オートファゴソームが形成される分子機構は依然として多くの謎に包まれており、その解明は細胞生物学上重要である。またオートファジーは、ヒトの健康に密接に関わることから、オートファジーをターゲットとした創薬等の応用研究が活発化しており、応用に向けた分子基盤の創出が期待される。

## **研究計画・方法**

### **オートファジーにおける膜形成分子機構の解明**

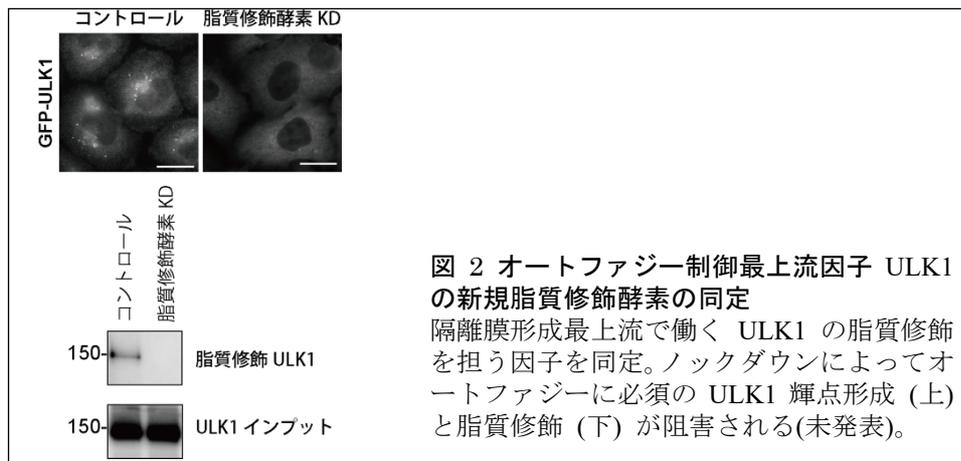
他のオルガネラと異なり、オートファゴソームは必要に応じて新規に細胞質で形成される。膜の成分はどこ由来か、どのようにして形成されるかは細胞生物学上の大きな謎として長年論争的となってきた。申請者の研究室では、電子顕微鏡を用いた 3D イメージングにより隔離膜が小胞体とつながっていることを発見し(Hayashi-Nishino et al., 2009)、さらにオートファゴソームが小胞体とミトコンドリアが接触する部位で形成されることを明らかにした(Hamasaki et al., 2013)。残された次の課題は、どのようにしてオートファゴソームが形成されるかであり、その問いのために申請者らは、膜形成に関わる新規因子の同定とその機能解析を行っている。

### **膜形成に関わる新規因子の同定**

小胞体-ミトコンドリア接触部位を細胞から分離精製し、分画に含まれるタンパク質を質量分析にて解析した。また siRNA を用いてオートファゴソーム膜形成に関わる因子をスクリーニンし、候補因子の同定を試みた。それらの解析から、オートファゴソーム膜形成に必要だと思われる新規制御因子を複数同定した。

### **膜形成に関わる新規因子の機能解析**

同定した複数の候補因子の中でも特に注目して研究を進めているのが、脂質修飾に関わる酵素である。この酵素は、隔離膜形成の最上流で働くことが知られている ULK1 の特定の脂質修飾を担うことを明らかにし、この修飾がオートファゴソーム形成に必須であるという予備的知見を得ている (図 2) (未発表)。そこで本申請では、最先端の解析機器を用いて生化学的、細胞生物学的に以下の点を中心に解析する予定である。



- オートファジーにおけるこの脂質修飾の重要性の確認
  - 酵素遺伝子欠損細胞における非選択的、選択的オートファジー活性の測定
- この酵素による脂質修飾がどのように制御されているか？
  - 上流のシグナル伝達経路による制御の可能性を検討
  - 基質である ULK1 のリン酸化など翻訳後修飾による酵素活性変化の可能性を検討
- この酵素による脂質修飾が起こる場所は、オートファゴソーム形成部位か？
  - 顕微鏡による生細胞イメージング技術を用いた解析
  - オートファゴソーム形成部位単離による生化学的な解析
- オートファゴソーム形成部位への酵素の空間的移動はどのように制御されているか？
  - 酵素と結合するタンパク質を介した小胞輸送の可能性を検討

### 資金使用計画

以下の理由により、研究助成金は研究に必要な消耗品購入に使う予定である。

(消耗品) 本研究は、哺乳類動物培養細胞を材料にした多面的なアプローチを骨子としており、各種消耗品、とくに細胞培養に要するディッシュ類や培養液、血清などを必要とする。細胞培養、分子生物学的解析、生化学的解析、顕微鏡を用いた解析、ウイルス感染実験、動物実験を行う際に、各種抗体や実験試薬を購入することが研究遂行に不可欠である。

(設備備品) 必要な設備は研究室に既に保有しているかもしくは大阪大学の共同実験施設を利用できるので、新たな備品購入の予定はない。

## 引用文献

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393. 10.1038/nature11910.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437. 10.1038/ncb1991.

## 研究業績一覧

田端 桂介

**Keisuke Tabata, PhD**

Assistant Professor

Laboratory of Intracellular Membrane Dynamics,

Graduate School of Frontier Biosciences,

OSAKA UNIVERSITY

2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

keisuke.tabata@fbs.osaka-u.ac.jp

+81 6 6879 4858

### 学術論文

1. **Tabata, K.**, Prasad, V., Paul, D., Lee, JY., Pham, MT., Twu, WI., Neufeldt1, CJ., Cortese, M., Cerikan, B., Stahl, Y., Joecks1, S., Tran, CS., Lüchtenborg, C., V'kovski, P., Hörmann5, K., Müller, AC., Zitzmann, C., Haselmann, U., Beneke, J., Kaderali, L., Erfle, H., Thiel, V., Lohmann, V., Superti-Furga, G., Brügger, B., and Bartenschlager R. (2021) Convergent use of phosphatidic acid for Hepatitis C virus and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Nature Communications*. (in press)
2. Twu, WI., Lee, JY., Kim, H., Prasad, V., Cerikan, B., Haselmann, U., **Tabata, K.** and Bartenschlager, R. (2021) Contribution of autophagy machinery factors to HCV and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Cell Reports* (in press)
3. Yoshida, G., Kawabata, T., Takamatsu, H., Saita, S., Nakamura, S., Nishikawa, K., Enokidani, Y., Yamamuro, T., **Tabata, K.**, Hamasaki, M., Ishii, M., Kumanogoh, A., and Yoshimori T. (2021) Elevated autophagy degrading Notch intracellular domain in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis. *Autophagy* (in press)
4. **Tabata, K.**\*, Arakawa, M.\*, Ishida, K.\*, Kobayashi, K., Nara, A., Sugimoto, T., Okada, T., Mori, K., and Morita, E. (2021) Endoplasmic reticulum-associated degradation controls virus protein homeostasis that is required for the flavivirus propagation. *J. Virol.* 95, e0223420. \*These authors contributed equally.
5. Yamanuro, T., Kawabata, T., Fukuhara, A., Saita, S., Nakamura, S., Takeshita, H., Fujiwara,

- M., Enokidani, Y., Yoshida, G., **Tabata, K.**, Hamasaki, M., Kuma, A., Yamamoto, K., Shimomura, I. and Yoshimori, T. Age-dependent loss of adipose Rubicon promotes metabolic disorders via excess autophagy. (2020) *Nature Communications*. 11, 4150.
6. Bhargava, HK., **Tabata, K.**, Byck, JM., Hamasaki, M., Farrell, DP., Anishchenko, I., DiMaio, F., Im, YJ., Yoshimori, T. and Hurley JH. (2020) Structural basis for autophagy inhibition by the human Rubicon-Rab7 complex. *PNAS* 117, 17003-17010
  7. Colpitts, C., Rindewood, S, Schneiderman, B., Warne, J., **Tabata, K.**, Ng, CF., Bartenschlager, R., Selwood, D. and Towers GJ. (2020) Hepatitis C virus exploits cyclophilin A to evade PKR. *eLife* 9, e52237.
  8. Neufeldt, JC., Cortese, M., Scaturro, P., Cerikan, B., Wideman, J., **Tabata, K.**, Moraes, T., Oleksiuk, O., Pichlmir, A., and Bartenschlager R. (2019) ER-shaping Atlantin Proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. *Nature Microbiology* 4, 2416-2429.
  9. Lee, JS., **Tabata, K.**, Twu, WI., Rahman, MS., Kim HS., Yu, JB, Jee, MH., Bartenschlager, R., and Jang SK. (2019) Rack1 Mediates Rewiring of Intracellular Networks Induced by hepatitis C virus infection. *PLoS Pathogens* 15, e1008021
  10. Lee, JY., Cortese, M., Haselmann, U., **Tabata, K.**, Romero-Brey, I., Funaya, C., Rohr, K., Qiang, Y., Ritter, C., Schwab, Y., Schieber, N., Bartenschlager, M., Kallis, S., Ruggieri, A., and Bartenschlager, R. (2019). Spatio-Temporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creation of a Lipid Droplet Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Reports*. 27, 3602-3617
  11. Stoeck, I.K., Lee, J.Y., **Tabata, K.**, Romero-Brey, I., Paul, D., Schult, P., Lohmann, V., Kaderali, L., and Bartenschlager, R. (2018). Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *J Virol* 92. e01196-17
  12. Tanaka, S., Hikita, H., Tatsumi, T., Sakamori, R., Nozaki, Y., Sakane, S., Shiode, Y., Nakabori, T., Saito, Y., Hiramatsu, N., **Tabata, K.**, Kawabata, T., Hamasaki, M., Eguchi, H., Nagano, H., Yoshimori, T., and Takehara, T. (2016). Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 64, 1994-2014.
  13. **Tabata, K.**, Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., Konishi, E., Suzuki, R., Matsuura, Y., and Morita, E. (2016). Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports* 16, 2339-2347.
  14. Suzuki, H., **Tabata, K.**, Morita, E., Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R.C., Yoshimori, T., and Wakatsuki, S. (2014). Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure* 22, 47-58.

15. Kira, S., **Tabata, K.**, Shirahama-Noda, K., Nozoe, A., Yoshimori, T., and Noda, T. (2014). Reciprocal conversion of Gtr1 and Gtr2 nucleotide-binding states by Npr2-Npr3 inactivates TORC1 and induces autophagy. *Autophagy* 10, 1565-1578.
16. **Tabata, K.**, Matsunaga, K., Sakane, A., Sasaki, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol Biol Cell* 21, 4162-4172.
17. Matsunaga, K., Saitoh, T., **Tabata, K.**, Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11, 385-396.

### 著書

1. **Tabata, K.**, and Bartenschlager R. (2020) Hepatitis C Virus. *Encyclopedia of Virology, 4<sup>th</sup> edition*. 2, 386-396
2. **Tabata, K.\***, Neufeldt, JC.\*, Bartenschlager, R. (2019) Hepatitis C Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. pii: a037093. \*These authors contributed equally.
3. **Tabata, K.**, Nara, A., Omori, H., and Morita, E. (2019) Immuno-localization of ESCRT Proteins in Virus-Infected Cells by Fluorescence and Electron Microscopy. *Methods Mol Biol*. 1998, 73-92.
4. **Tabata, K.**, Hayashi-Nishino, M., Noda, T., Yamamoto, A., and Yoshimori, T. (2013). Morphological analysis of autophagy. *Methods Mol Biol* 931, 449-466.

### 和文総説

1. 田端桂介、森田英嗣 (2016) ウイルス感染とオートファジー 臨床免疫、アレルギー科、66 巻、4 号、324-329
2. 田端桂介、吉森保 (2012) 細菌感染とオートファジー、オートファジーと疾患、医学のあゆみ、241 巻、4 号、251-254

### 学位論文

**Tabata K. (2009)** PLEKHM1 INTERACTS WITH RAB7 AND NEGATIVELY REGULATES ENDOCYTIC PATHWAY (PLEKHM1はRab7と結合し、エンドサイトーシス経路を負に制御する)

## 国際会議発表

1. **Tabata K.** and **Bartenschlager R.** (2020) Perturbation of autophagy and intracellular lipids by hepatitis C virus – implication for liver cancer development. International Liver Cancer Research Conference 2020, **Poster presentation, Heidelberg, Germany**
2. **Tabata K.**, Paul D., Brügger B., Sperti-Furga G. and Bartenschlager R. (2019) Identification of host cell factors involved in hepatitis C virus replication. 35th Annual Conference of the GASL 2019, **Poster presentation, Heidelberg, Germany**
3. **Tabata K.** and Bartenschlager R. (2018) Cellular and viral determinants of the hepatitis C virus replication and assembly compartment. Transregional Collaborative Research Centre 83, **Oral presentation, Bonn, Germany**
4. **Tabata K.**, Eu S.M. and Bartenschlager R. (2018) Cellular and viral determinants of the hepatitis C virus replication and assembly compartment. Transregional Collaborative Research Centre 83, **Poster presentation, Bonn, Germany**
5. **Tabata K.**, Stoeck I., Paul D. and Bartenschlager R. (2017) Cellular and viral determinants of the hepatitis C virus replication and assembly compartment. Transregional Collaborative Research Centre 83, **Poster presentation, Dresden, Germany**
6. **Tabata K.**, Paul D. and Bartenschlager R. (2016) Role of autophagy in the formation of double-membrane vesicles in HCV-infected cells. 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, **Poster presentation, Kyoto, Japan**
7. **Tabata K.** and Morita E. (2014) Involvement of ESCRT factors in Flavivirus propagation. The Ins and Outs of Viral Infection: Entry, Exit, and Spread, Keystone Symposium, **Oral presentation, Colorado, USA**
8. **Tabata K.** and Yoshimori T. (2009) 7th Scientific Meeting - ARC Centre of Excellence in Biotechnology and Development, **Oral presentation, Melbourne, Australia**

## 国内招待講演

1. **田端桂介** (2020) 第 93 回日本生化学会大会 (横浜\_オンライン開催) シンポジウム、口頭発表
2. **田端桂介**、吉森保 (2009) 第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、シンポジウム、口頭発表

## 受賞

1. 第 61 回日本細胞生物学会大会/若手最優秀賞 (2009)

## 研究費、助成金獲得

1. 2021.09.-2023.8. Solv-RD project, European Rare Disease Models & Mechanisms Network (RDMM-Europe), The impact of Rubicon variants on human brain neurodevelopment, NO. 779257, 総額 20,000 EUR
2. 2021年度-2024年度 基盤 (C)、研究課題: Rubicon を介したオートファジー制御機構と神経発達における役割の解明\_21K06169 (研究代表)、416 万
3. 2021年度 科学技術振興機構 (JST) CREST 若手チャレンジ (細胞外微粒子) 細胞外微粒子により誘導されるリソファジー制御因子の新規同定と機能解析 (研究代表)、120 万円
4. 2020.11.06-2021.3.31 UCL-Osaka University - Collaborative Projects and Exchange Activities, The impact of Rubicon variants on human brain neurodevelopment, 総額 £10,000 (大阪大学側 50%: £5,000)
5. 2021年度 大阪大学大学院医学系研究科・医学部附属病院産学連携・クロスイノベーションイニシアティブ\_「令和2年度新型コロナウイルス対策研究開発助成事業」、新型コロナウイルスによるオートファジー制御機構の解析 (研究代表)、100 万円
6. 2021年度-2024年度 大阪大学未来基金\_新型コロナウイルス感染症に対するチーム阪大研究、SARS-CoV-2 によるオートファジー阻害機構の解明とそれを応用した治療戦略の開発 (研究代表)、500 万円
7. 2020年度 科学技術振興機構 (JST) CREST 若手チャレンジ (細胞外微粒子) 2020年7月-2021年3月 (9ヶ月) 細胞外微粒子により誘導されるオートファジーに関わる制御因子の新規同定と機能解析 (研究代表)、270 万円
8. 2015年度 細胞科学研究財団育成助成 (海外)、研究課題: フラビウイルスの宿主細胞内増殖機構の解明 (研究代表)、120 万円
9. 2014年度 第31回内藤記念海外研究留学助成金、研究課題: インフルエンザウイルス出芽機構の解明 (研究代表)、450 万円、採択後、留学先受入研究者の変更のため助成金辞退
10. 2013年度-2015年度 科研費若手 (B)、研究課題: プラス鎖 RNA ウイルス感染時におけるオートファジーの役割と分子基盤の解明\_25860339 (研究代表)、429 万円
11. 2011年度 オルガネラネットワーク医学創成プログラム分野融合若手プロジェクト、研究課題: オートファジー制御化合物の大規模スクリーニング (研究代表)、50 万円

## (学生) 研究指導

2010-2012 : 三好良幣、大阪大学医学部遺伝学教室  
2010-2012 : Shiou-Lin LU、大阪大学医学部遺伝学教室  
2012-2013 : 有本大、泉田響、大阪大学微生物病研究所ウイルス研究分野  
2013-2014 : 鶴飼洋史、小林万希子、大阪大学微生物病研究所ウイルス研究分野  
2015-2021 : 荒川将志、弘前大学農学生命科学部分子生命科学科細胞分子生物学分野  
2016 : Severina Klaus, Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, University of Heidelberg  
2016-2019 : Woan-Ing Twu, Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, University of Heidelberg  
2018-2021 : 石田幸太郎、弘前大学農学生命科学部分子生命科学科細胞分子生物学分野  
2019-2020 : 清村菜々子、大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室  
2019-2021 : 中谷美友、大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室  
2019-2021 : 八緒陸心、大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室  
2020-現在 : 北川大貴、佐伯麻里花、Fangze Duan, Shiqi Wang 大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室  
2020-現在 : 西理香子、大阪大学大学院生命機能研究科細胞内膜動態研究室  
2020-現在 : 南実華、臨床医、研究生  
2020-現在 : Giovanni Bravin、技術補佐員

### 教育経験 (担当授業科目等)

1. 2021年4月-7月:大阪大学 学問への扉 (生命現象を支える"タンパク質"の働き)
2. 2021年4月-7月:大阪大学 生物科学概論 B
3. 2021年1月:大阪大学 機能系実習、生化学実習
4. 2020年4月-7月:大阪大学 生物科学概論 B
5. 2020年1月:大阪大学 機能系実習、生化学実習
6. 2012年9月:大阪大学 分子細胞生物学ゲノム科学コース、オートファジーについての解説と学術論文討議、実習
7. 2012年2月:大阪大学 機能系実習、分子生物学実習
8. 2011年10月:大阪大学 MD 研究者養成プログラム、細胞内小器官およびオートファジーについての講義と光学顕微鏡実習
9. 2011年9月:大阪大学 分子細胞生物学ゲノム科学コース、オートファジーについての総合解説と学術論文討議、実習

### 研究成果公開活動およびその他

1. 細胞生物学会会報において学会レポート(第84回 日本生化学会大会)を寄稿(2011)
2. 細胞生物学会ホームページに実験プロトコルを寄稿(2011)
3. 細胞生物学会会報において吉森研究室紹介を寄稿(2008)

### 学術論文査読者

2020-現在 *Cell Death & Disease* (IF 6.5)

2018-現在 *PLoS Pathogens* (IF 6.2)

### 特許

なし