

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15062

研究課題名(和文)オートファジー必須酵素ATG7の活性制御メカニズムの解析

研究課題名(英文)Activation control mechanism of autophagy essential enzyme ATG7

研究代表者

中谷 真子 (NAKAYA, MAKO)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60538552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ゲノムワイド関連解析や、遺伝子変異マウスを用いた解析から、癌、クローン病、潰瘍性大腸炎、神経変性疾患などの病因としてオートファジーに関与する遺伝子の異常が報告されている。我々が着目している腸管上皮細胞に特異的に発現するホメオボックス蛋白質CDX2がオートファジーの必須酵素であるATG7に結合することを見出した。さらに、ATG7制御候補因子を30個スクリーニングした中から、ATG7と結合する3個の遺伝子を同定した。また、Cdx2遺伝子変異マウスを用いた*Citrobacter rodentium*感染腸炎において、CDX2が腸管での細菌増殖を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In recent years, abnormality of genes involved in autophagy has been reported as a cause of cancer, Crohn's disease, ulcerative colitis and neurodegenerative diseases from genome-wide association analysis. We found that the homeobox protein CDX2 specifically expressed in the intestinal epithelial cells we are interested in binds to ATG7, an essential enzyme of autophagy. Furthermore, three genes that bind to ATG7 were identified among 30 screening candidates for ATG7. We also clarified that CDX2 suppresses bacterial growth in the intestine in *Citrobacter rodentium* infection using Cdx2 gene mutant mice.

研究分野：感染免疫

キーワード：オートファジー ATG7

1. 研究開始当初の背景

細胞内にできた異常な蛋白質、小器官、不溶物質、細胞外からの侵入物(細菌やウイルス)などを分解するシステムとしてオートファジーがある。近年、ゲノムワイド関連解析や、遺伝子変異マウスを用いた解析から、癌、クローン病、潰瘍性大腸炎、神経変成疾患、心筋症、糖尿病、感染症、腎臓病などの病因としてオートファジーに関与する遺伝子の異常が報告されている。これらの疾患の誘発におけるオートファジーの役割を明らかにすることは、病因の解明や治療戦略に重要であると考えられる。

一方で、我々が着目している CDX2 は、腸管の上皮細胞に局限して発現して機能することにより、腸管上皮細胞の発生、分化、恒常性を維持するために不可欠の因子として働く。腸管上皮細胞に特異的なホメオボックス蛋白質 CDX2 がオートファジーの必須酵素である ATG7 に結合することを見出した。また、*in vitro*における細菌感染実験において、CDX2 はオートファジーを活性化し、細菌増殖を抑制することを見出した。CDX2 による ATG7 の活性の制御メカニズムを明らかにすることにより、腸管上皮細胞における新たなオートファジーの制御メカニズムの解明を計画した。

2. 研究の目的

これまでに、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子である CDX2 の大腸癌発症における役割の解析を進めてきた。一連の解析から CDX2 が転写因子である一方で、転写活性に依存しない機能を有していることを見出した。そこで、CDX2 の結合分子を質量分析法により解析したところ、結合分子の一つにオートファジーの必須酵素である ATG7 を見出した(図1)。この結果と一致して、CDX2 が腸管上皮細胞においてオートファジーを活性化することを見出した。本申請課題では、CDX2 が ATG7 への結合を介して、ATG7 を活性化する分子メカニズムを解明することを目的とする。

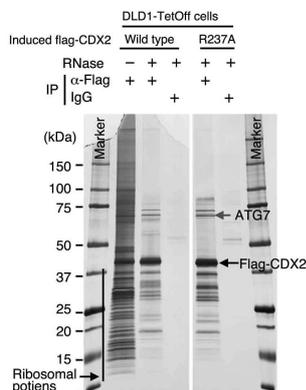


図1: flag-CDX2 を IP して銀染色した。

ATG7 はオートファジーの ATG 融合反応を司る中心的酵素であるが、その活性の制御機構は分かっていない。本申請課題では、CDX2 がホメオボックス転写因子であるにも関わらず、転写以外の機能をもつという仮説を基に解析を進めた。また、これまで CDX2 とオートファジーの関係についての報告はなく、新たなオートファジーの制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

計画 ATG7 制御因子を同定するために以下の実験を行う。

- ・ATG7 結合因子を質量分析により同定して遺伝子クローニングした後、flag 標識を行った上で、それらの因子を発現する Tet 制御性細胞を作成する。

- ・作成した Tet 制御性細胞を用いて、質量分析により同定した ATG7 結合因子と CDX2、および ATG7 との結合を確認する。結合が確認できた因子を ATG7 制御候補因子として解析する。

- ・ATG7 制御候補因子による ATG7 の活性への影響について、培養細胞を用いて解析する。また、ATG7 の活性の測定には、我々が開発した Tet-ATG7:C572S 細胞を用いる。ATG7:C572S 変異体は、ATG7 融合反応の際に、ATG12 や ATG8 (LC3) と結合して解離しなくなる。この ATG7-ATG12 融合体や ATG7-LC3 融合体を定量化することにより、ATG7 がその基質である ATG と融合する反応を ATG7 の酵素活性として定量する。

計画 抽出した ATG7 制御因子による ATG7 の活性制御メカニズムを明らかにする。さらに、重要と思われる因子の遺伝子変異マウスの作成を進める。

4. 研究成果

これまでに、CDX2 による ATG7 の活性制御機構を解明するために、DLD1-TetOff 細胞を用いて flag-CDX2 と myc-ATG7 を同時に Tet 制御性に発現誘導を行い、anti-flag 抗体と anti-myc 抗体を用いて、2段階の免疫沈降法により CDX2-bound ATG7 複合体に含まれているタンパク質を回収後、網羅的質量分析(ショットガン解析)を行った。その結果、約 30 個の候補因子を同定した。同定した 30 個の分子を遺伝子クローニングし、それらの 30 個のタンパク質に flag 標識配列の導入を行った。そして、Flag 配列を導入したそれぞれの ATG7 制御候補因子の発現を誘導できる Tet 誘導細胞を作成した。

ヒト腸上皮細胞由来 DLD1 細胞を用いて Tet 制御性に ATG7 制御候補因子の発現を誘導し、

それらの ATG7 制御候補因子と内在性の CDX2 や ATG7 との結合を免疫沈降法により解析した。その結果、30 個の候補遺伝子の中から、3 個の遺伝子が ATG7 と結合することが分かった。そのうちの一つはミトコンドリアに存在してオートファジーの主要因子である BECLIN 1 を活性化するとともに、オートファゴソーム形成の開始に重要で、オートファジーを促進させる機能を有する因子であった。これまでに、*in vitro*において CDX2 と ATG7 がオートファジーの活性化を介して、腸上皮細胞に感染した細菌の細胞内増殖を抑制することを明らかにしている。今回同定した ATG7 制御候補因子は、ATG7 または CDX2-ATG7 複合体をオートファゴソームの形成開始点にリクルートし、オートファジーを促進する可能性が考えられる。そこで、ATG7 制御候補因子、および ATG7 と CDX2 の細胞内局在について電子顕微鏡を用いた解析により検討を行っている。さらに、候補因子の発現を shRNA でノックダウンし、同様の解析を行うため、レンチウイルスベクター-pLK0.1 を用いて新規 ATG7 結合分子に対する shRNA を発現するベクターおよび細胞の作成を進めている。これらの解析から、ATG7 制御因子を同定する。今後さらに、ATG7、ATG12、ATG5、ATG7 制御候補因子が形成する複合体をクロマトグラフィーを用いて解析し、得られた結果から ATG7 の活性制御モデルを考察する予定である。

ATG7:C572S 変異型は、一度 LC3B や ATG12 と融合すると安定となるため、一定時間において ATG7 が融合した LC3B や ATG12 の量を調べることができる (図 2)。Tet 制御性細胞で ATG7:C572S を発現し、ATG7:C572S を免疫沈降すると内在性の LC3B や ATG12 との結合が観察された。そこで、これらの細胞で ATG7 制御候補因子を shRNA でノックダウンし、ATG7:C572S に結合する LC3B や ATG12 の量を western blotting により解析している。

これまでに、*Cdx2* 遺伝子変異マウスにおいて、*Citrobacter rodentium* 感染腸炎モデルを用いて経口細菌感染を行い、糞便中の細菌数をカウントし、腸管での細菌増殖への影響を *in vivo* により検討した。SPF 飼育環境下では *C. rodentium* を経口感染させても常在細菌により排除され、糞便中の細菌をカウントすることは出来なかった。そこで、抗生物質であるアンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンを感染前 3 日間、自由飲水させ、常在細菌の排除を行った。感染前日は絶食させ、経口感染の 2 時間後に食餌を与えた。また、*C. rodentium* をこれら 3 種の抗生物質耐性菌にすることにより、感染中も抗生物質を自由飲水させて常在細菌の増殖を抑制させた。その結果、*Cdx2* 遺伝子変異マウスでは細菌数が野生型マウスに比べて多い結果が得られた。野生型マウスでは、細菌感染の 1

週間後には腸管から排除されているのに対し、*Cdx2* 遺伝子変異マウスでは 2 週間後においても細菌が増殖していた。この結果から、CDX2 が腸管内での細菌増殖および排除に重要であることが示唆される。今後、ATG7 制御候補因子の遺伝子変異マウスを作成し、細菌感染への関与を明らかにする。

近年、炎症性腸疾患の原因としてオートファジータンパク質の遺伝子異常が見つかった。また、腸管上皮細胞のオートファジーが腸炎の発症の抑制に重要な働きをすることが分かった。本申請課題において、ATG7 制御候補因子を同定した。また、CDX2 が ATG7 を介して細菌増殖抑制に働くことを明らかにし、*in vivo*においても CDX2 が腸管において細菌感染による細菌増殖を抑制することを明らかにした。これらの研究成果が、腸管上皮細胞におけるオートファジーの制御メカニズムの解明の一助となり、炎症性腸疾患の発症の原因の一つとなっているオートファジーの活性低下の分子メカニズムの理解に貢献できると考えている。また、ATG7 の活性の制御メカニズムの解明が、炎症性腸疾患を初めとするオートファジーの異常が原因となり得る疾患の分子治療標的の提案に貢献できることが期待できる。

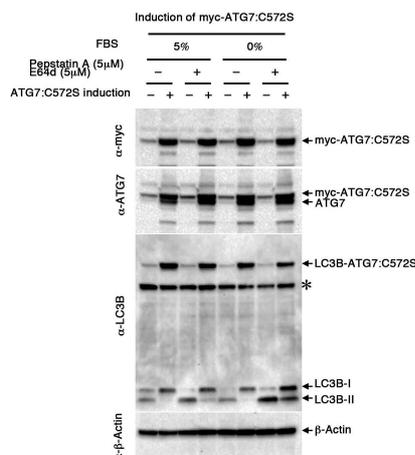


図 2. ATG7:C572S を発現し、LC3B の状態を WB により解析

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中谷 真子 (NAKAYA, Mako)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号：60538552

(2)研究分担者

青木 耕史 (AOKI, Koji)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：40402862

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし