

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19043

研究課題名(和文)新規オートファジー制御因子Rufy4の機能と免疫応答における意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the functions and physiological relevance of novel autophagy regulator Rufy4 in immune regulation systems

研究代表者

寺脇 正剛 (TERAWAKI, Seigo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60437217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御を担う免疫システムにおいては、オートファジーは単なる分解機構ではなく免疫システムそのものを調節する役割があることが示唆されている。我々は免疫細胞においてのみ機能するオートファジー制御因子Rufy4を同定しているが、今回その役割を明らかにするためRufy4遺伝子を破壊したマウスを作製し、解析をおこなった。このマウスを用いて気管支炎モデルを作製したところ、野生型と比較し肺における炎症応答が減弱している事が明らかとなった。この結果はRufy4が炎症応答をコントロールする新たな免疫制御システムを担っている事を示しており、オートファジーがより広範な免疫応答に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an indispensable degradation system for organisms by degrading and facilitating metabolism of intracellular components. In addition, it's suggested that autophagy functions not merely as degradation system but also as regulator in immune system. We have previously identified a gene; Rufy4 which regulates autophagy especially in immune competent cells. This time, we established Rufy4 knockout mouse and analyzed its phenotype. We established bronchitis model and found that less inflammation response in Rufy4 deficient setting. These results suggested that Rufy4 function as a novel inflammation regulator and revealed that autophagy has more extensive role in immune regulations.

研究分野：分子細胞生物学、免疫学

キーワード：オートファジー 免疫制御 炎症疾患

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、隔離膜と呼ばれる脂質二重膜によって細胞質内のタンパク質やオルガネラを取り込み、リソソームと融合することによってその内容物を消化する細胞内の分解機構のひとつであり、通常は細胞の恒常性維持機構として機能している。一方、免疫応答を担う細胞群においても、オートファジーは重要な機能を持っている。T細胞を活性化させる抗原提示細胞において細胞質内のタンパク抗原(すなわち内在性抗原)がオートファジーによって分解されると、分解によって生じた抗原ペプチドは主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子(MHC II)に提示され、CD4陽性T細胞を活性化させる。また細胞内の自己抗原に限らず、細胞内に寄生する細菌や原虫もオートファジーのメカニズムによって排除されるゼノファジーが知られている。これらの機構は細胞内に存在する外来抗原やがん抗原に対して抗体応答を惹起するために必須の機構である。

われわれは免疫系でもっとも抗原提示機能の高い樹状細胞におけるオートファジー制御機構について研究を行ってきた。その過程において、抗体産生やアレルギー応答において主要な働きをもつサイトカイン、インターロイキン 4(IL-4)の存在下で誘導した樹状細胞ではオートファジーが亢進することを見いだした。さらにわれわれはIL-4によって樹状細胞に発現誘導される遺伝子からオートファジーを促進する新規の分子Rufy4を同定した。興味深いことにRufy4を細胞に強制発現させると、導入したRufy4を中心としてオートファゴソームが集積し、さらにその周囲を多数のリソソームが取り囲むという極めてユニークな細胞内構造が形成された。この構造体にはLC3やRab7、STX17などオートファジー制御に関わる分子群が局在するものの、Rufy4とこれらの分子との間に機能的な相関があるのか、またRufy4がオルガネラのトラフィッキングをどのように制御しているのかについての研究は進んでおらず、オートファジー活性化におけるRufy4の機能は解明されていなかった。

そこでわれわれは免疫制御機構におけるオートファジーの役割とRufy4遺伝子の生理学的意義、さらにはRufy4によるオートファジー活性化の分子機構を明らかにするため、Rufy4の機能解析を中心とした研究をおこなった。

## 2. 研究の目的

われわれはこれまでにIL-4存在下で誘導された樹状細胞におけるオートファジーの活性化により①内在性抗原特異的なCD4陽性T細胞の活性化を惹起すること、②Rufy4を発現する細胞では細胞内寄生細菌であるブルセラ菌のゼノファジーによる排除が促

進されること、③IL-4によりミトコンドリアの分解機構であるマイトファジーも活性化され、損傷ミトコンドリア由来の活性酸素によるインフラマソームを介した炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ の産生が抑制されること、④樹状細胞以外にも好中球や肺マクロファージにおいて発現が認められることなどを明らかにしてきた。これらの知見によって、Rufy4が幅広い免疫応答に関与するオートファジー制御因子であることが示唆されていた。

しかし複雑な免疫系においてRufy4遺伝子の機能を明らかにするには、細胞株を用いた*in vitro*の解析では不十分で、実際の免疫担当細胞やさらには個体レベルでの免疫応答について解析する必要があった。そこで本研究では、Rufy4が介在するオートファジーの分子機構、およびそれが生体内での免疫応答においてどのような機能を果たしているかについてRufy4欠損マウスを用いて詳細に検討し、オートファジーを介した新たな免疫応答制御機構を解明することを目的として研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1) Rufy4欠損マウスの解析

われわれはこれまでにCRISPR/Cas9システムにより作製したRufy4全身欠損マウスを樹立している。このマウスを用い免疫応答におけるRufy4の機能について検討をおこなった。野生型、およびRufy4欠損マウスの骨髄細胞をGM-CSFで刺激すると共にIL-4の存在下および非存在下で培養して樹状細胞を誘導し、*ex vivo*におけるこの樹状細胞のオートファジー活性、サイトカイン産生などの機能性についてRufy4遺伝子が与える影響について検討した。

### (2) 炎症モデルにおいてRufy4欠損が与える影響

炎症応答におけるRufy4遺伝子の機能について解析するため、LPSの気道暴露による気管支炎モデルマウスを作製し、Rufy4の欠損が与える影響について検討をおこなった。

### (3) イメージングによるRufy4の機能解析

Rufy4によるオートファジー活性化機構を解明するため、蛍光タグをつけたRufy4分子を培養細胞に導入し、オートファジー関連分子や細胞骨格との局在関係、阻害剤の効果からRufy4の機能について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Rufy4欠損マウスの解析

CRISPR/Cas9によって作製されたRufy4全身欠損マウスは、欠失する塩基数の異なる4ラインが作製されたが、いずれも正常に出生し、出生後の体長や体重など生育にも大きな影響は認められなかった。オートファジーに

必須の分子が欠損したマウスは出生後の発育に異常が認められる事が報告されているが、Rufy4 の発現が免疫系に限局しているためと考えられる。IL-4 存在下で誘導した樹状細胞における Rufy4 遺伝子の転写産物は欠損マウスにおいても大きく変化しなかったが、タンパクレベルでの発現は完全に消失しており、作製したマウスではフレームシフト変異により、Rufy4 の実質的な機能が失われていると考えられた。この Rufy4 欠損樹状細胞では IL-4 刺激によるオートファジーフラックスの増加、および LPS 刺激によるオートファジー抑制に対する耐性が失われていた。これらは IL-4 により樹状細胞に認められていたオートファジーの活性化は IL-4 によって誘導される Rufy4 遺伝子の機能によるものである事が改めて実証された。IL-4 で誘導した樹状細胞は LPS とナイジェリシン刺激によるインフラマソームを介した炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の産生が抑制されることがわかっているが、これは Rufy4 遺伝子の発現でオートファジーの活性化と共にマイトファジー活性が高まったためと考えられる。実際 Rufy4 欠損マウス由来の樹状細胞では IL-4 存在下で誘導した細胞においても IL-1 $\beta$  産生の減少が認められなかった。以上の知見は Rufy4 がオートファジーを活性化することによりインフラマソームを介した炎症応答に対して抑制的に機能することを示唆している。

### (2) 炎症モデルマウスにおける Rufy4 遺伝子欠損の影響

われわれのこれまでの解析により、粘膜面に多く存在する CD11b 陽性の樹状細胞において Rufy4 の高発現が誘導されることが明らかとなっている。そこでわれわれはマウスの気道に LPS を暴露させて気管支炎モデルマウスを作製し、*in vitro* において認められたような炎症応答に対する Rufy4 の抑制効果が *in vivo* においても認められるか検討した。その結果、LPS 曝露によって誘導される肺胞血管周縁への炎症性細胞の浸潤が、Rufy4 欠損マウスでは増悪していた。この結果から Rufy4 はインフラマソームを介した炎症応答を抑制し、過剰な炎症から組織を保護する機能があると推察される。

### (3) イメージングによる Rufy4 の機能解析

Rufy4 はメンブレントラフィックに関与するとされる小分子 G タンパク Rab ファミリーと相互作用するとされる RUN ドメインを持っており、Rufy4 は Rab 分子のエフェクターとして機能している事が予想された。そこでオートファジー制御に関連する Rab7 との相互作用を免疫沈降により検討したところ、RUN ドメイン依存的な Rab7 との結合が認められた。一方でオートファジーに関連する Rab9 については相互作用が認められなかった。Rufy4 を発現させるオートファゴソーム周辺にリ

ソソームの劇的な局在変化をもたらす事がわかっている (図 1)。Rufy4 と同様に Rab のエフェクターであり、RUN ドメインと PI3P の結合ドメインである FYVE ドメインをもつ FYCO1 は、微小管を介したオートファゴソームのトラフィッキングを制御している事が報告されていることから、Rufy4 の細胞骨格を介したリソソームのトラフィッキングをおこなっている可能性について検討した。細胞内の微小管を蛍光標識により可視化するとともに、細胞を重合阻害剤であるノコダゾールで処理し、Rufy4 によるリソソームのトラフィッキングに与える影響について調べた。その結果、予想外にも微小管重合阻害による細胞骨格を破壊した場合でも Rufy4 によるリソソームの局在変化に異常は認められなかった (図 1, 2)。一方、Rufy4 はアクチン線維と共局在しており、Rufy4 は FYCO1 とは異なり、アクチン線維を介したトラフィッキングをおこなっている事が示唆された。(図 3)

図 1

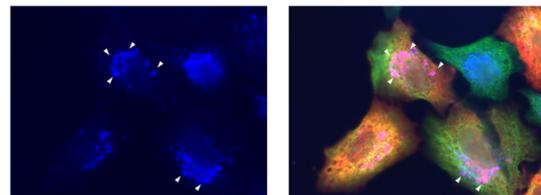
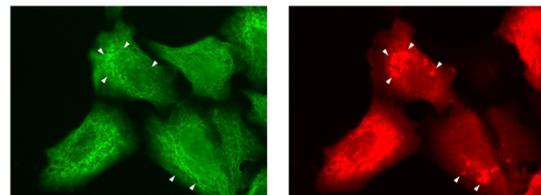


図 2

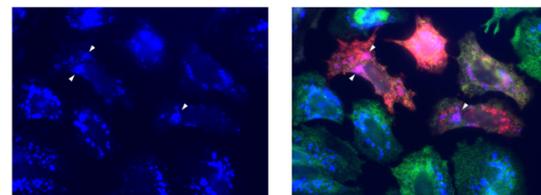
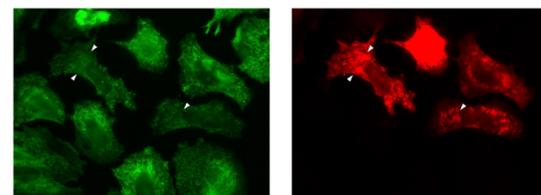


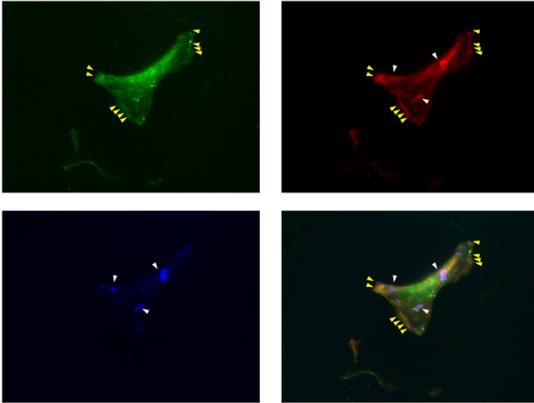
図 1, 2

緑：微小管

赤：Rufy4

青：Lamp1 (リソソーム)

図 3



緑：アクチン線維  
赤：Rufy4  
青：Lamp1（リソソーム）

これらの結果は、Rufy4 を介した免疫細胞におけるオートファジーの亢進が、細胞内細菌の排除や抗原の分解のみならず、幅広い免疫応答に関与していることを示しており、今後は分解を超えたオートファジーの新たな機能の側面が、免疫系においてさらに明らかにされて行くと期待される。

#### 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 1 件）

Terawaki S, Camosseto V, Pierre P, Gatti E.

RUFY4: Immunity piggybacking on autophagy? (Review) 査読なし  
Autophagy, 2016;12(3):598-600.

DOI: 10.1080/15548627.2015.1136772.

〔学会発表〕（計 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

寺脇 正剛 (TERAWAKI Seigo)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60437217

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

廣井 隆親 (HIROI Takachika)  
東京都医学総合研究所・  
プロジェクトリーダー

Philippe PIERRE  
Centre d'Immunologie de  
Marseille-Luminy・Director