

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15043

研究課題名(和文)脳形成に關与する選択的オートファジー制御分子Alfyの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Alfy, a selective autophagy related molecule involved in brain formation

研究代表者

蔭山 俊 (Kageyama, Shun)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30624225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：標的分子を選択的にリソソームにて分解する選択的オートファジーの障害は疾患発症の要因になりうるが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本課題では、選択的オートファジー関連タンパク質の一つであり、自閉症スペクトラム症の原因遺伝子として同定されているAlfyに焦点を絞り、細胞機能ならびにマウス個体での生理機能を解析した。その結果、Alfyはオートファジーに必須ではなく、小胞輸送経路の制御から神経突起形成に關与することを明らかにした。さらに、神経特異的Alfy欠損脳は形成不全を示すことを見出した。これらの結果は、Alfyが胎生期の脳形成に關与することを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的オートファジーの破綻に起因する疾患発症の分子病態を明らかにすることは、新規治療法の開発の上で必要不可欠である。本課題の研究対象であるAlfyは、近年、自閉症スペクトラム症の原因遺伝子として同定されたが、疾患発症とオートファジーとの関連は明らかにされていない。本課題では、Alfyが小胞輸送経路への関わりから、神経突起形成ならびに胎生期の脳形成に關与することを明らかにした。本研究により得られた結果は、Alfyの機能の全貌を明らかにするための基礎的知見となり、今後の病態発症機序の解明に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Impairment of selective autophagy that selectively degrades target molecules in lysosomes may contribute to disease development. However, its molecular mechanism is still largely unknown. In this study, we focused on Alfy, which is one of the selective autophagy-related protein and identified as the causative gene of autism spectrum disease, and analyzed its cellular function and physiological function. As a result, it was revealed that Alfy is not essential for autophagy and is involved in neurite formation by controlling the vesicle transport pathway. Furthermore, we found that the nerve-specific Alfy-deficient brain showed hypoplasia. These results imply that Alfy is involved in fetal brain formation.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：オートファジー Alfy 小胞輸送経路 自閉症スペクトラム症 神経突起

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内タンパク質などを囲い込んだオートファゴソームがリソソームと融合することで、その内容物を分解する機構である。近年、標的分子を選択的に分解する選択的オートファジーの障害が疾患発症の要因になりうるということが明らかになりつつある。選択的オートファジーには、選択的基質とオートファゴソームを繋ぐアダプタータンパク質の存在が必要不可欠であり、本課題の研究対象である *Alfy* タンパク質もその一つである。*Alfy* は、オートファジーのみならず細胞内小胞輸送経路への関連が報告され、自閉症スペクトラム症の原因遺伝子としても同定されているタンパク質であるが、未だその機能は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、選択的オートファジー関連タンパク質の一つであり、自閉症スペクトラム症の原因遺伝子として同定されている *Alfy* に焦点を絞り、1) *Alfy* の制御する細胞機能とその分子機構、2) 個体レベルにおける *Alfy* の生理機能、そしてこれらを統合することで 3) *Alfy* とヒト疾患との関連の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Alfy* のオートファジー経路への関与の検証

*Alfy* 欠損細胞におけるオートファジー活性を検証した。具体的には、*Alfy* 欠損マウス胎児線維芽細胞ないしは CRISPR-Cas9 システムにて作出した *Alfy* 欠損培養細胞株におけるオートファジー活性を定量的に調べた。選択的オートファジーでは、亜硫酸誘導性ユビキチン化タンパク質凝集体分解、サルモネラ菌排除を評価した。

#### (2) *Alfy* の細胞機能の分子機構の解明

*Alfy* の制御する細胞機能を探索するため、*Alfy* と相互作用するタンパク質を質量分析法を用いた解析により網羅的に同定した。同定した遺伝子から、*Alfy* と小胞輸送経路ならびに神経突起形成との関連を調べた。加えて、約 400 kDa と巨大なタンパク質である *Alfy* 全長を細胞で発現させるため、特殊なアデノウイルスを用いた細胞発現実験系を構築した。このアデノウイルスを用いて *Alfy* の細胞内局在を観察した。

#### (3) 個体レベルにおける *Alfy* の生理機能の解析

*Alfy* は中枢神経系に強く発現することから、神経特異的 *Alfy* 欠損マウスを作出した。*Alfy* 欠損マウスの脳の形態学、組織学的解析ならびに表現型解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *Alfy* のオートファジー経路への関与の検証

*Alfy* 欠損マウス胎児線維芽細胞を用いてオートファジー活性を検証した結果、*Alfy* 欠損細胞においても野生型と同程度の飢餓誘導性オートファジー活性を認めた (図 1)。さらに、選択的オートファジーとして亜硫酸処理下での凝集体の分解ならびにサルモネラ菌の排除を検証したが、いずれも野生型と *Alfy* 欠損細胞で差を認められなかった。これらの結果は、*Alfy* はオートファジーに必須ではないことを意味する。

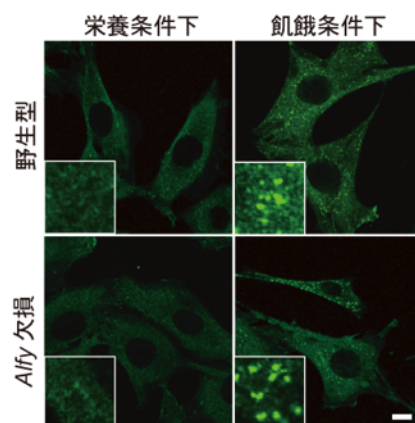


図 1. *Alfy* 欠損マウス胎児線維芽細胞の免疫染色

野生型ならびに *Alfy* 欠損細胞を飢餓処理し、LC3 抗体にて免疫染色した。

#### (2) *Alfy* の細胞機能の分子機構の解明

*Alfy* 相互作用タンパク質の質量分析解析から、複数の小胞輸送経路関連タンパク質群を同定した。同定したタンパク質の一つに、細胞内小胞輸送経路を制御する *Rab35* タンパク質のエフェクタータンパク質を見出した。*Rab35* は神経突起形成に関わることが報告されていたことから、*Alfy* 全長の過剰発現させた培養神経細胞での神経突起形成を調べた結果、*Alfy* の過剰発現により、神経突起の形成が促進された (図 2)。そこで、*Alfy* の細胞内局在を調べたところ、初期エンドソームや *Rab35* との共局在が認められた (図 3)。これらの結果は、*Alfy* が *Rab* タンパク質を制御し、神経突起形成に関与することを示唆する。

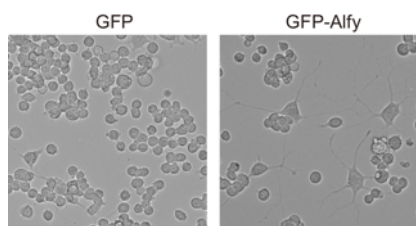


図 2. *Alfy* 過剰発現による神経突起形成  
培養神経細胞に GFP ないしは GFP-*Alfy* を過剰発現し、60 時間後に観察した。

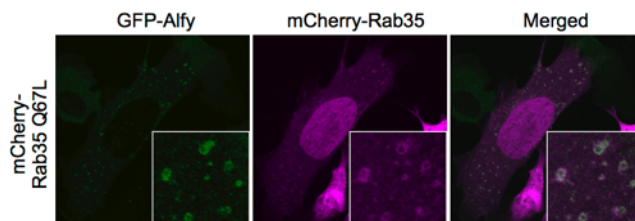


図 3. *Alfy* の細胞内局在  
マウス線維芽細胞に GFP-*Alfy* ならびに mCherry-*Rab35* 変異体を過剰発現させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) 個体レベルにおける *Alfy* の生理機能の解析  
*Alfy* の個体での生理的意義を解析するため、神経特異的 *Alfy* ノックアウトマウス (*Alfy<sup>fllox/fllox</sup>;Nestin-cre*) を作成した。出生したマウスは、出生後 18 日において成長遅延を示し、振戦や反射異常等の神経変性疾患様の行動異常を認めた (図 4、図 5)。さらに、*Alfy* 欠失脳は嗅球、前頭葉、後頭葉、小脳の発達不全を示した (図 6)。これらの結果は、*Alfy* が胎生期からの脳形成に必須であることを示唆する。

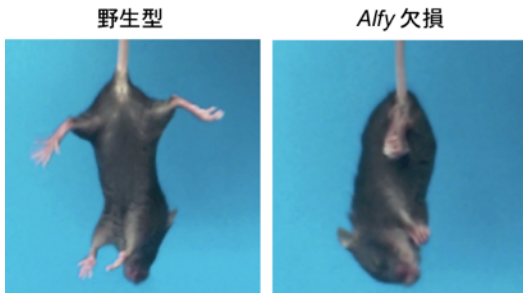


図 5. 神経特異的 *Alfy* 欠損マウスの表現型解析  
 クラスピング試験。

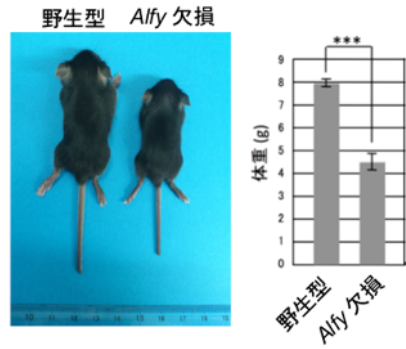


図 4. 神経特異的 *Alfy* 欠損マウスの  
 体格比較

出生後 18 日の野生型と神経特異的 *Alfy* 欠損マウスの体格ならびに体重の比較。

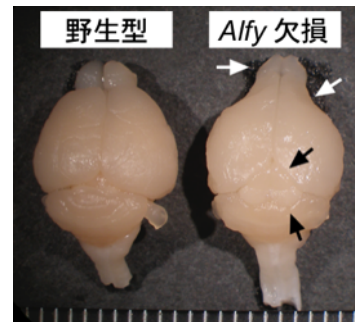


図 6. 神経特異的 *Alfy* 欠損脳の形態観察  
 出生後 18 日の野生型と神経特異的 *Alfy* 欠損マウスの脳。白矢印は嗅球と前頭葉、黒矢印は後頭葉と小脳を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhou Li, Hossain M. Ibrahim, Yamazaki Maya, Abe Manabu, Natsume Rie, Konno Kohtaro, Kageyama Shun, Komatsu Masaaki, Watanabe Masahiko, Sakimura Kenji, Takebayashi Hirohide	4. 巻 147
2. 論文標題 Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 557 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Naoki, Kageyama Shun, Komatsu Masaaki, Waguri Satoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Hyperosmotic Stress Induces Unconventional Autophagy Independent of the Ulk1 Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00024-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sanchez Martin Pablo, Sou Yu shin, Kageyama Shun, Koike Masato, Waguri Satoshi, Komatsu Masaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 NBR 1 mediated p62 liquid droplets enhance the Keap1 Nrf2 system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔭山俊、Sigurdur Gudmundsson、Eeva-Liisa Eskelinen、小松雅明
2. 発表標題 p62液滴の超微形態解析
3. 学会等名 第11回 オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔭山俊、Sigurdur Gudmundsson、一村義信、野田展生、和栗聡、Eeva-Liisa Eskelinen、小松雅明
2. 発表標題 p62/SQSTM1液滴のオートファジー
3. 学会等名 検索結果 ウェブ検索結果 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔭山俊、Sanchez-Martin Pablo、小松雅明
2. 発表標題 Nbr1 modulates the activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway during oxidative stress
3. 学会等名 第12回 オートファジー研究会 第1回 新学術領域研究「マルチモードオートファジー」班会議
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考