

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06637

研究課題名（和文）オートファジー欠損マウス脳を用いたオートファジー制御因子の探索

研究課題名（英文）Search for Autophagy Regulators by Mass Spectrometry of Autophagy-Deficient Mouse Brains

研究代表者

久万 亜紀子（KUMA, AKIKO）

大阪大学・医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：30392377

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、Atg5欠損マウス脳の質量分析によりオートファジー関連候補因子を同定し、これらの解析によりオートファジーの分子機構解明に取り組んだ。解析の結果、同定した候補因子がオートファジーと小胞体のコンタクトサイトで働くこと、損傷リソソーム選択的オートファジーに関わるE3リガーゼとして働くこと、などが明らかとなった。本解析により、選択的オートファジーの分子機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーの生理機能が次々と明らかになる一方で、その分子機構の詳細は未だ不明な点が多い。とくにオートファゴソームの形成メカニズムについては、オートファゴソームの形成始動機構やオートファゴソーム膜の曲率維持の仕組みなど、未解決な問題が数多く残されている。本研究では、独自のスクリーニングにより同定したオートファジー関連候補因子の解析により、オートファジーの分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research, we identified autophagy-related candidate factors by mass spectrometry in Atg5-deficient mouse brains and analyzed them to elucidate the molecular mechanism of autophagy. We revealed that one of the identified candidate factors act at the contact site between autophagosome and the endoplasmic reticulum, and that another act as E3 ligase involved in autophagy specific for damaged lysosomes. This research revealed one aspect of the molecular mechanism of selective autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物に普遍的な細胞内分解系である。オートファジーは1 μ mほどの大きさの小胞(オートファゴソーム)で細胞質成分を包み込み、これをリソソームへ運び込んで分解する、膜動態を伴う分解システムである(図1)。この現象は1960年代に観察され、1990年代に入ってから大隅良典博士ら(現・東京工業大学)による出芽酵母を用いたオートファジー不能株のスクリーニングにより、多数のオートファジー遺伝子(*Atg* 遺伝子)が同定された。しかしながら、オートファジーの分子機構の詳細は未だよく分かっていない点が多い。とくにオートファゴソームの形成メカニズムについては、オートファゴソーム膜の起源、オートファゴソームの形成始動機構、オートファゴソーム膜の曲率維持、膜供給の仕組みなど、未解決な問題が数多く残されている。オートファジーは膜動態・膜輸送・タンパク質分解・栄養代謝など研究分野と密接に関連するため、その分子機構の解明は学術的観点からも重要であり、また、疾患やオートファジーを標的とした治療戦略という社会的観点からも非常に重要な課題のひとつである。

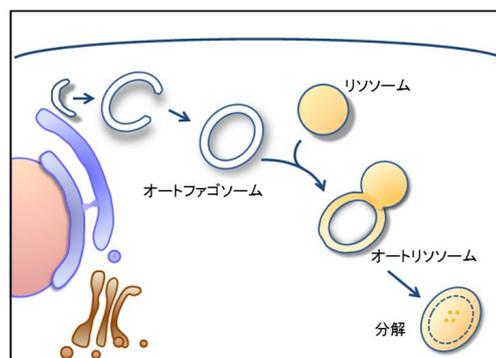


図1 オートファジーの模式図

細胞質を取り囲みながら二重膜が伸張し、オートファゴソームを形成する。続いてオートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム中の分解酵素によってその内容物が分解される。

2. 研究の目的

本研究課題では、*Atg5* 欠損マウス脳抽出液のMS解析により同定されたオートファジー関連候補因子の解析により、オートファジーの分子機構の解明に取り組む。申請者らは、基盤C(平成28年度~平成30年度)の研究課題におけるオートファジーの選択的基質探索の過程で、オートファジー関連因子 *Atg5* ノックアウトマウスの脳抽出液には、選択的分解基質のみならず、既知のオートファジー制御因子・オートファゴソーム形成関連因子・オートファジーレセプターなどが高度に蓄積していることを見出した。よって、今回同定された蓄積タンパク質の中に、新たなオートファジー制御因子が含まれている可能性が高い。これらの候補因子には、小胞体成形因子、プロテインキナーゼA複合体、オートファジーレセプター類似タンパク質、小胞体局在ホスホリパーゼなどが含まれ、一部についてはオートファジーに関わることを示す予備的データを得ている。これら候補因子のオートファジーへの関与を明らかにし、オートファジーの分子機構の理解を目指す。

3. 研究の方法

質量分析により *Atg5* 欠損マウス脳で蓄積したタンパク質のうち上位の因子について、オートファジー誘導時の局在およびノックダウンによるオートファジー活性への影響を調べる。オートファジー活性については、飢餓で誘導されるオートファジーのみならず、オルガネラ選択的オートファジーへの影響も調べる。特にリソファジーについては、糖鎖結合タンパク質ガレクチン3をマーカーに用いた従来の方法よりも特異的にリソファジー活性を評価するプローブを開発したのでこれを用いる。オートファジーへの関与が示唆された因子について、ATG関連因子との相互作用、ヒエラルキー解析、ドメイン解析、インタラクトーム解析などを行い、個々のオートファジーにおける機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) オートファゴソーム形成におけるtetheringタンパク質の関与

オートファジー関連候補因子のうち、オルガネラ間の係留に関わることを報告されているER局

在タンパク質に GFP を融合させて局在観察を行ったところ、飢餓時に GFP がドット状の輝点を示し、オートファジー初期因子である FIP200 と共局在することを見出した。このドット状の輝点は、PI3P キナーゼ阻害剤であるワルトマニン処理により形成されなくなり、PI3P 依存的にオートファゴソーム形成部位に集積することが分かった。これはオートファゴソーム形成過程の後半で働く ATG タンパク質とよく似た挙動であり、オートファゴソーム形成に関与することが強く示唆された。この候補因子のノックアウトおよびノックアウト細胞におけるオートファジー活性を測定したところ、選択的オートファジーの活性が低下した。また、ATG 関連タンパク質と結合し、ATG 関連タンパク質依存的にオートファゴソーム形成部位に集積することが分かった。この候補因子は、アミノ酸配列の特徴から、オルガネラコンタクトサイトに局在しオルガネラ同士をつなぎとめる因子と類似しているため、形成途中のオートファゴソームと湾曲した小胞体をつなぎとめている可能性が示唆された。

(2) オートファゴソーム形成における小胞体成形タンパク質の関与

形成途中のオートファゴソームは湾曲した小胞体に沿うようにして形成されると考えられていることから、このような特徴的な小胞体部位がどのように形成されるかという重要な問題が残されている。今回の MS 解析では、小胞体選択的オートファジーのレセプターとして報告されている Fam134A, B, C や RTN3、Atlastin をはじめとする多くの小胞体成形タンパク質を同定している。これらは小胞体の局率や形態を制御するタンパク質である。Atg5 欠損脳ではこれら一群のタンパク質が高度に蓄積していたことから、これらの ER 関連タンパク質がオートファゴソーム形成の場となる小胞体特殊構造の形成にも働く可能性が考えられた。候補因子のノックダウンによるオートファジー活性への影響を調べたところ、いくつかの候補因子でオートファジー活性が低下した。オートファゴソーム形成の場をつくる小胞体側の因子の情報はまだ少ないため、今後の解析により、オートファゴソームが形成される小胞体上の特定部位がどのように形成されるのか、特徴的な小胞体膜構造の形態がどのように維持されるのか、などの未解決問題の理解の一助になることが期待される。

(3) リソファジーに関わる E3 リガーゼの同定

以前に所属研究室で行われたスクリーニングにより、損傷エンドソームに局在する E3 リガーゼが同定されていた。今回の MS 解析で、同一の E3 リガーゼが候補因子として同定された。このため、この因子のリソファジーへの関与を検討した。まず、本因子の安定発現株および欠損細胞を用いて、本候補因子が損傷リソソームに局在すること、その欠損によりリソファジー活性が低下することを明らかにした。リソファジーの実行には、損傷リソソームが K48 型および K63 型ユビキチン化により標識されることが必須である。本候補因子の欠損細胞における損傷リソソームのユビキチン化を調べたところ、K48 結合型ユビキチン化が低下することが分かった。一方、K63 結合型ユビキチン化には変化は見られなかった。この結果から、損傷リソソームのユビキチン化への関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------