

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K07987  
研究課題名(和文) 加齢によるオートファジー不全の原因解明とその制御による神経変性疾患の治療法開発

研究課題名(英文) Mechanism of age-related decline of autophagy and treatment for neurodegenerative diseases through its regulation

研究代表者  
鈴木 マリ (SUZUKI, Mari)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主任研究員

研究者番号：20455405

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)：本研究は、「加齢によるオートファジー不全はどのようなメカニズムで生じるのか？」についてその一端を解明するため、オートファジー抑制分子であるRubiconに着目した。研究代表者らは、短期間で老化を解析することが可能であるショウジョウバエを用いて、加齢に伴うRubiconの翻訳後修飾変化を解析した。その結果、Rubiconは加齢および雌雄により異なるパターンの翻訳後修飾を受けていることが明らかとなった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーはアルツハイマー病などの神経変性疾患のみならず、生理的老化にも重要である。本研究で見出したRubiconの加齢および雌雄による翻訳後修飾変化は、Rubiconの機能変化にも関与することが予想され、さらなる検証を行うことで上記疾患や老化のメカニズム、および予防・治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study focused on Rubicon, an autophagy suppressor, to elucidate the mechanism of reduction in autophagic activity with age. We analyzed post-translational modification changes of Rubicon during aging using *Drosophila*, which is suitable for analyzing aging in a short period. The results revealed that Rubicon undergoes different patterns of post-translational modifications depending on aging and sex.

研究分野：神経疾患

キーワード：オートファジー 老化 ショウジョウバエ ポリグルタミン病

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病、ポリグルタミン病などの神経変性疾患では、病理学的特徴としてタウ、シヌクレイン、異常伸長ポリグルタミン蛋白質を主とする神経細胞内凝集体が認められる。凝集体の構成成分は家族性疾患の原因遺伝子産物として同定され、異常構造変化および凝集した原因蛋白質の蓄積が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが考えられている。現在、それぞれの疾患に対する対症療法は存在するものの、発症・進行を抑制する根本的治療法は未だ開発途上である。

異常蛋白質の蓄積に加え、神経変性疾患に共通するもう一つの特徴として加齢に伴う発症リスクの増加が挙げられる。老人斑や神経原繊維変化などの凝集体の蓄積は、低頻度ながら健常人の老化脳においても認められることから、生理的な老化と神経変性疾患の発症・進行には、蛋白質の凝集・蓄積に関わる共通のメカニズムがあると考えられ、その一つとしてオートファジーの活性低下が挙げられる。実際、老齢動物組織におけるオートファゴソーム形成能の低下をはじめとする様々な報告により、加齢によるオートファジー活性低下が示されている。オートファジーはバルク細胞内分解系であり、細胞内小器官を含む細胞質成分の代謝を担うシステムである。その不全は異常蛋白質の蓄積を引き起こし、ひいては神経変性疾患の発症・進行の促進因子となることが予想される。しかし「加齢によるオートファジー不全はどのようなメカニズムで生じるのか？」についてはほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

神経変性疾患の治療法としてオートファジーの活性化が有望であると考え、標的分子としてオートファジー抑制分子 Rubicon (Run domain protein as Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing) (文献 1、2) に着目した。多数の神経変性疾患モデルが確立されているショウジョウバエを用いて基礎検討を行った結果、神経系 Rubicon ノックダウンがポリグルタミン病モデルハエの症状を著しく改善させることを見出した。さらに Rubicon ノックダウンが野生型ショウジョウバエの寿命を延長させること、加齢に伴い発現量が増加することを見出し (文献 3) Rubicon が加齢性オートファジー不全の原因分子である可能性を考えた。そこで本研究では、(1) 加齢脳における Rubicon の発現制御とその役割を明らかにすることで、加齢性オートファジー不全のメカニズム解明に取り組むこと、また Rubicon の機能阻害によるオートファジー活性化剤の開発に向け、(2) Rubicon のオートファジー抑制を担うドメインの解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 加齢による Rubicon 発現増加のメカニズム

野生型ショウジョウバエにおいて Rubicon は加齢に伴い増加すること、またこの増加は mRNA レベルの変化を伴わないことを見出しており、そのメカニズムとして翻訳後修飾による安定化を考えた。そこで、0・2・4 週齢の HA タグ融合 Rubicon 過剰発現ハエ (全身発現誘導) (文献 4) から Rubicon を免疫沈降、または SDS-PAGE ゲルからの Rubicon タンパク質の抽出および限外ろ過カラムによる濃縮を行い、LC/MS/MS を用いて翻訳後修飾を解析した。十分なシーケンスカバー率の得られたサンプルを用いて加齢および雌雄間で翻訳後修飾を比較した。リン酸化修飾について Phos-tag を用いて検証を行った。

### (2) Rubicon 過剰発現ショウジョウバエを用いた機能ドメインの解析

Rubicon は全長 972 アミノ酸の比較的大きな膜蛋白質であるため、スクリーニングに用いる精製蛋白質の調製が困難であることが予想された。Rubicon がオートファジーを抑制するための機能ドメインとして、Vps34 と相互作用する N 末端領域の RUN ドメイン (文献 5) および RING-type Zn finger domain を含む C 末端領域 (文献 6、7) の両者が報告されている。RUN ドメインまたは C 末端領域のみを相互作用スクリーニングに用いることが可能であるか検討することとした。Rubicon の生理機能発現に RUN ドメインが必須であることを確認するため、野生型または RUN ドメインを欠く Rubicon を過剰発現するショウジョウバエを作製し、ポリグルタミン病モデルに対する影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 加齢による Rubicon 発現増加のメカニズム

0・2・4 週齢の Rubicon-HA 過剰発現ハエから Rubicon を HA 抗体により免疫沈降し、LC/MS/MS を用いて翻訳後修飾を解析した。Rubicon 発現量の多いオス由来のサンプルにて十分なシーケンスカバー率を得ることができ、翻訳後修飾解析により加齢に伴いリン酸化が変動していることを見出した。しかし、メス由来のサンプルではシーケンスカバー率が低く、翻訳後修飾変動の同定には至らなかったため、SDS-PAGE ゲルからの Rubicon タンパク質の抽出、および限外ろ過カラムによる濃縮を行った。最終的にオスと同等のカバー率が得られたため加齢および雌雄間で

訳後修飾を比較した結果、メスではリン酸化の変動が認められないことが明らかとなった。これらの結果は、Phos-tag SDS-PAGE 解析でも確認された（未発表）。加齢に伴う Rubicon 発現増加は雌雄ともに見られることからリン酸化変動は当初目的である加齢に伴う増加のメカニズムと関連しないと考えられるが、Rubicon の機能における性差の可能性を考え、オートファジー抑制機能や寿命などの生理機能に対する影響について解析を進めている。

## (2) Rubicon 過剰発現ショウジョウバエを用いた機能ドメインの解析

野生型 (WT) または RUN ドメインを欠く Rubicon (  $\Delta$ RUN ) を過剰発現するショウジョウバエを作製し、ウェスタンブロッティングにより発現を確認した。そこでポリグルタミン病モデルに対する影響を評価した。その結果、RUN ドメインを欠く Rubicon も野生型 Rubicon と同様にポリグルタミン病モデルバエの症状悪化を引き起こすことが明らかとなり ( 図 1 )、C 末端領域がオートファジー抑制機能発現に十分であることが示唆された ( 文献 4 )。

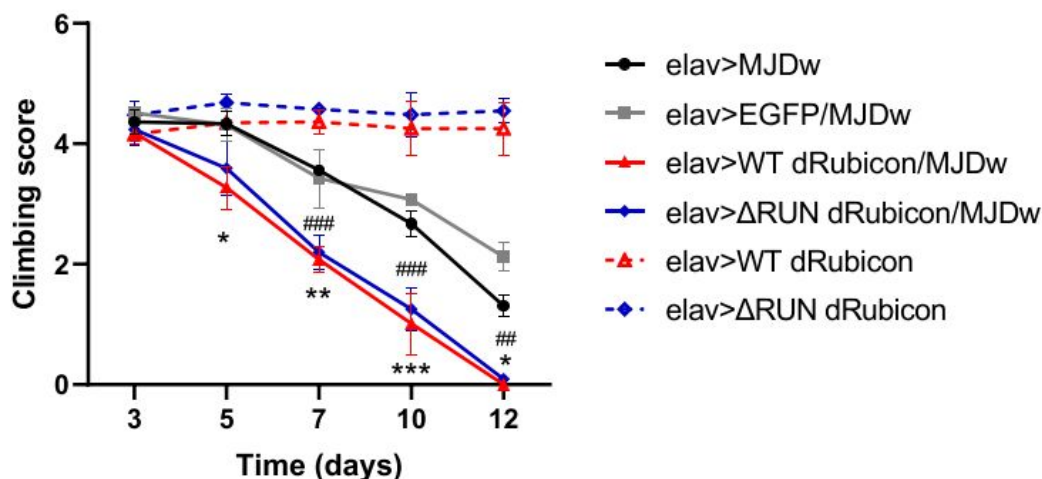


図 1 ポリグルタミン発現ショウジョウバエの運動機能に対する全長 Rubicon ( WT ) および RUN ドメイン欠損 Rubicon (  $\Delta$ RUN )

## <引用文献>

- (1) 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.; Yoshimori, T., Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology* 2009, 11, (4), 385-96.
- (2) Zhong, Y.; Wang, Q. J.; Li, X.; Yan, Y.; Backer, J. M.; Chait, B. T.; Heintz, N.; Yue, Z., Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* 2009, 11, (4), 468-76.
- (3) Nakamura, S.; Oba, M.; Suzuki, M.; Takahashi, A.; Yamamuro, T.; Fujiwara, M.; Ikenaka, K.; Minami, S.; Tabata, N.; Yamamoto, K.; Kubo, S.; Tokumura, A.; Akamatsu, K.; Miyazaki, Y.; Kawabata, T.; Hamasaki, M.; Fukui, K.; Sango, K.; Watanabe, Y.; Takabatake, Y.; Kitajima, T. S.; Okada, Y.; Mochizuki, H.; Isaka, Y.; Antebi, A.; Yoshimori, T., Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nature communications* 2019, 10, (1), 847.
- (4) Oba, M.; Fukui, K.; Sango, K.; Suzuki, M., Dataset on the effect of Rubicon overexpression on polyglutamine-induced locomotor dysfunction in *Drosophila*. *Data in Brief* 2021, 37.
- (5) Sun, Q.; Zhang, J.; Fan, W.; Wong, K. N.; Ding, X.; Chen, S.; Zhong, Q., The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286, (1), 185-91.
- (6) Bhargava, H. K.; Tabata, K.; Byck, J. M.; Hamasaki, M.; Farrell, D. P.; Anishchenko, I.; DiMaio, F.; Im, Y. J.; Yoshimori, T.; Hurley, J. H., Structural basis for autophagy inhibition by the human Rubicon-Rab7 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2020, 117, (29), 17003-17010.
- (7) Tabata, K.; Matsunaga, K.; Sakane, A.; Sasaki, T.; Noda, T.; Yoshimori, T., Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Molecular biology of the cell* 2010, 21, (23), 4162-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Suzuki M, Sango K, Nagai Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of $\alpha$ -Synuclein and Disease-Associated Factors in Drosophila Models of Parkinson's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031519	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 Oba M, Fukui K, Sango K, Suzuki M	4. 巻 37
2. 論文標題 Dataset on the effect of Rubicon overexpression on polyglutamine-induced locomotor dysfunction in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 107222 ~ 107222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2021.107222	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 Hervas R, Fernandez-Ramirez MC, Galera-Prat A, Suzuki M, Nagai Y, Bruix M, Menendez M, Laurents DV, Carrion-Vazquez M	4. 巻 19
2. 論文標題 Divergent CPEB prion-like domains reveal different assembly mechanisms for a generic amyloid-like fold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-021-00967-9	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 該当する

1. 著者名 Minakawa EN, Popiel AH, Tada M, Takahashi T, Yamane H, Takahashi Y, Saito Y, Okamoto Y, Yamamoto K, Suzuki M, Takeuchi T, Fujita H, Ito C, Watase K, Adachi H, Katsuno M, Mochizuki H, Shiraki K, Sobue G, Toda T, Wada K, Onodera O, Nagai Y	4. 巻 143
2. 論文標題 Arginine is a disease modifier for polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1811 ~ 1825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa115	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 Lee JS, Kanai K, Suzuki M, Kim WS, Yoo HS, Fu YH, Kim DK, Jung BC, Choi M, Oh KW, Li Y, Nakatani M, Nakazato T, Sekimoto S, Funayama M, Yoshino H, Kubo S, Nishioka K, Sakai R, Ueyama M, Mochizuki H, Lee HJ, Sardi SP, Halliday GM, Nagai Y, Lee PH, Hattori N, Lee SJ	4. 巻 142
2. 論文標題 Arylsulfatase A, a genetic modifier of Parkinson's disease, is an $\alpha$ -synuclein chaperone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 2845-2859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awz205	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 該当する
1. 著者名 Akamine T, Takaku S, Suzuki M, Niimi N, Yako H, Matoba K, Kawanami D, Utsunomiya K, Nishimura R, Sango K	4. 巻 153
2. 論文標題 Glycolaldehyde induces sensory neuron death through activation of the c-Jun N-terminal kinase and p-38 MAP kinase pathways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histochemistry and cell biology	6. 最初と最後の頁 111-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01830-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura S, Oba M, Suzuki M, Takahashi A, Yamamuro T, Fujiwara M, Ikenaka K, Minami S, Tabata N, Yamamoto K, Kubo S, Tokumura A, Akamatsu K, Miyazaki Y, Kawabata T, Hamasaki M, Fukui K, Sango K, Watanabe Y, Takabatake Y, Kitajima TS, Okada Y, Mochizuki H, Isaka Y, Antebi A, Yoshimori T	4. 巻 10
2. 論文標題 Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08729-6	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 Sakai R, Suzuki M, Ueyama M, Takeuchi T, Minakawa E, Hayakawa H, Baba K, Mochizuki H, Nagai Y	4. 巻 14
2. 論文標題 E46K mutant $\alpha$ -synuclein is more degradation resistant and exhibits greater toxic effects than wild-type $\alpha$ -synuclein in Drosophila models of Parkinson's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0218261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0218261	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13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大場柁樹、進藤真由美、福井浩二、三五一憲、鈴木マリ
2. 発表標題 オートファジー抑制因子Rubiconの加齢に伴う翻訳後修飾変化の解析
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木マリ、黒見坦、進藤真由美、新見直子、齊藤実、三五一憲
2. 発表標題 糖尿病性神経障害モデルショウジョウバエにおけるグリア細胞プロテオスタシスの役割
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田望、木村真梨、大場柁樹、福井浩二、三五一憲、鈴木マリ
2. 発表標題 Tau発現ショウジョウバエにおけるMetformin, Pioglitazoneの治療効果の検討
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木マリ
2. 発表標題 オートファジー抑制因子Rubiconの発現抑制によるポリグルタミン病の改善
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki M.
2. 発表標題 Proteostasis in aging and neurodegenerative diseases.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木マリ
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた神経変性疾患研究.
3. 学会等名 第789回九州大学生体防御医学研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Neumann A-M, Saitoh Y, Fujikake N, Wada K, K. Sango K, Nagai Y
2. 発表標題 Dietary yeast restriction attenuates polyglutamine toxicity via insulin-like signaling and immune signaling in Drosophila
3. 学会等名 49th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oba M, Nagai Y, Fukui K, Sango K, Suzuki M
2. 発表標題 Knockdown of Rubicon, a negative regulator of autophagy, suppresses polyglutamine-induced toxicity in Drosophila.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M*, Oba M, Nagai Y, Fukui K, Sango K
2. 発表標題 Therapeutic effects of Rubicon knockdown in a Drosophila model of polyglutamine disease.
3. 学会等名 Keystone Symposia “ Neurodegenerative Diseases: New Insights and Therapeutic Opportunities ” ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木マリ, Anne-Marie Neumann, 斉藤勇二, 藤掛伸宏, 和田圭司, 三五一憲, 永井義隆
2. 発表標題 食餌制限が神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性を改善する分子メカニズムの解明.
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大場 征樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, 鈴木マリ
2. 発表標題 ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経症状はオートファジー抑制因子Rubiconの発現抑制により改善する.
3. 学会等名 首都大学東京バイオコンファレンス2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場 征樹, 永井義隆, 福井浩二, 三五一憲, 鈴木マリ
2. 発表標題 オートファジー抑制蛋白質Rubiconの発現抑制は野生型ショウジョウバエの寿命を延長させる.
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大場 征樹, 永井 義隆, 福井 浩二, 三五 一憲, 鈴木 マリ
2. 発表標題 ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経症状はオートファジー抑制蛋白質Rubiconの発現抑制により改善する.
3. 学会等名 第9回認知症研究を知る若手研究者の集まり
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

(公財) 東京都医学総合研究所 糖尿病性神経障害プロジェクトホームページ  
<https://www.igakuken.or.jp/diabetic/>

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
---------	---------