

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870027

研究課題名（和文） クロウン病に関わるオートファジー因子 Atg16L WD リピートドメインの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the WD repeats domain in Atg16L which associates with Crohn disease

研究代表者

藤田 尚信 (FUJITA NAONOBU)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：00506496

研究成果の概要（和文）：オートファジー関連蛋白質 Atg16L の 1 塩基多型と原因不明の炎症性腸疾患であるクローン病との関連が報告された。クローン病患者では過剰な炎症反応が引き起こされているが、そのメカニズムはこれまで不明であった。そこで我々は、Atg16L のノックアウトマウスを作成し Atg16L の役割を解析した。その結果オートファジーの欠損により、炎症性のサイトカイン IL1-beta が過剰に産生されることを見いだした。また、我々は Atg16L のクローン病型 1 塩基多型、または WD リピートドメインの欠失は飢餓誘導性または病原性微生物に対するオートファジー能に全く影響を与えない事を見いだした。これより、Atg16L のクローン病型 1 塩基多型は既知のオートファジー経路に大きな影響を与えることなく、過剰な炎症反応を引き起こしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recent genome-wide association studies have linked autophagy, an intracellular bulk degradation system essential for diverse physiological process, with Crohn's disease, a major form of chronic inflammatory bowel disease. Single nucleotide polymorphisms in Atg16L (T300A) is a risk factor for Crohn's disease. However, it has been ill defined how the Atg16L variant confers the development of the disease. We demonstrate that Atg16L is a critical regulator of autophagy responsible for the control of the endotoxin-mediated immune response; its dysfunction may be associated with inflammatory diseases such as colitis. Furthermore, we provide the first evidence that deletion of WD repeat domain and T300A mutation in Atg16L1 have little impact on canonical autophagy and autophagy against bacteria, *Salmonella typhimurium*. We therefore propose that Atg16L1 T300A is differentially involved in Crohn's disease and canonical autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファジー、Atg16L、WD リピートドメイン

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に備わる大規模かつ非選択的な細胞内分解経路である。その一義的な機能は細胞構成成分の代謝回転であるが、近年、凝集性タンパク質の分解、細胞内に侵入した病原性微生物やウイルスの排除にもオートファジーが関与していることが明らかになりつつある。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平な膜構造体が湾曲しながら伸長し、直径約 1 μm のオートファゴソームが形成される。完成したオートファゴソームはその後リソソームと融合し、オートファゴソームの内腔に包み込まれた細胞質成分は、リソソームの酸性加水分解酵素により分解される。オートファゴソームの形成には少なくとも 17 のオートファジー関連タンパク質 (Atg タンパク質) が必要であり、それらの半数以上は、2つのユビキチン様分子 (Atg12, Atg8/LC3) の結合反応系に関与している (Mizushima, *Genes Dev.*, 2007)。酵母 Atg8 のほ乳類ホモログである LC3 は、脂質であるフォスファチジルエタノールアミン (PE) と共有結合して、オートファゴソーム膜上に局在している。一方、Atg12 は Atg5 と共有結合した後 Atg16L と会合し、約 800-kDa のタンパク質複合体 (以降、Atg16L 複合体と呼ぶ) として、主に隔離膜上に局在している。これまでの知見から、Atg16L 複合体は隔離膜の伸長に必要な因子であると考えられている。最近、申請者らは、Atg16L 複合体が LC3 結合系の E3 様因子として機能していることを報告した (Fujita *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2008)。

2007 年に独立した 3 つのグループにより、原因不明の炎症性腸疾患であるクローン病 (Crohn) 病に感受性を示す一塩基多型 (SNP) が Atg16L 中に見いだされた (Consortium TWTCC., *Nature*, 2007; Hampe *et al.*, *Nat. Genet.*, 2007; Rioux *et al.*, *Nat. Genet.*, 2007)。クローン病の SNP (T300A) は、Atg16L の C 末端側に存在する WD リピードドメイン中にある。WD リピードドメインは多細胞生物の Atg16L にのみ存在し、出芽酵母などの単細胞生物の Atg16 には見られない (Mizushima *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2003)。クローン病型の SNP はオートファジーの異常

を引き起こすのではないかと考えられているが、WD リピードドメインの機能は、これまでに全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症誘導制御における Atg16L の役割と Atg16L の WD リピードドメインの機能、および T300A 変異とクローン病との関連を解明することである。Atg16L の欠失が炎症誘導に与える影響を調べると共に、WD リピードの欠失およびクローン病型 SNP がオートファジーに与える影響について検討する。細胞内に侵入した病原性微生物やウイルスの排除にオートファジーが関わっていること、またクローン病と病原性微生物、ウイルス感染の関与が示唆されていることから、本研究では、WD リピードの欠失およびクローン病型 SNP が病原性微生物やウイルスの排除に対して与える影響についても詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) 炎症誘導制御における Atg16L の役割の解析

Atg16L のノックアウト (KO) マウスを作成し、炎症誘導制御における Atg16L の役割を解析した。グラム陰性菌に対する自然免疫応答における Atg16L の役割を調べるため、野生型と Atg16L-KO のマクロファージをグラム陰性菌のエンドトキシン成分であるリポ多糖で刺激し、各種サイトカインの産生量を定量する。またその制御機構の解析も行う。

(2) Atg16L の WD リピードドメインの欠失およびクローン病型 SNP がオートファジーに与える影響の検討

Atg16L ノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞に (a) 野生型のヒト Atg16L、(b) WD リピードドメインを欠失させた Atg16L、または (c) クローン病の SNP (T300A) を持つ変異体をそれぞれ安定に発現させた細胞株を樹立して実験に用いる。始めに、それらの細胞株を飢餓処理した際のオートファゴソーム形成能を調べる。オートファゴソームの検出には、抗 Atg16L 抗体と抗 LC3 抗体を用いた免疫蛍光染色を行う。オートファゴソーム形

成の生化学的な指標である LC3 の脂質修飾は、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロッティングにて評価する。また、アイソトープを用いた長寿命タンパク質の分解アッセイにより、オートファジー能の定量的な解析を行う。さらに、病原性微生物の排除に WD リピートの欠失、クローン病型変異が与える影響についても詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) 我々は、Atg16L のノックアウト (KO) マウスを作成し、炎症誘導制御における Atg16L の役割を解析した。グラム陰性菌に対する自然免疫応答における Atg16L の役割を調べるため、野生型と Atg16L-KO のマクロファージをグラム陰性菌のエンドトキシン成分であるリポ多糖で刺激したところ、Atg16L-KO の細胞は野生型に比べて IL-1b を過剰に産生した。IL-1b はリポ多糖などの刺激により転写が亢進され未成熟な前駆体として翻訳された後に、カスパーゼ-1 により切断を受け、成熟型の IL-1b となり細胞外へと分泌される。また、カスパーゼ-1 自身もインフラマソームによる切断を受けて活性型 (成熟型) へと変換されている。Atg16L-KO の細胞において、IL-1b 産生のどの段階に異常があるのか検討したところ、カスパーゼ-1 を活性化するインフラマソームが異常に活性化されていることが明らかになった (Saitoh T. et al., 2008 Nature)。この結果はオートファジーによる炎症反応抑制機構を明らかにした初めての報告である。

(2) さらに、Atg16L-KO 細胞を用いて、Atg16L の機能解析も平行して行った。予想に反して、我々は Atg16L のクローン病型 1 塩基多型、または WD リピートドメインの欠失は飢餓誘導性または病原性微生物に対するオートファジー能に全く影響を与えない事を見いだした (Fujita N. et al., 2009 JBC)。これより、Atg16L のクローン病型 1 塩基多型は既知のオートファジー経路に大きな影響を与えることなく、過剰な炎症反応を引き起こしていると考えられる。

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 9 件)

(1) Fujita, N., Saitoh, T., Kageyama, S., Akira, S., Noda, T., and Yoshimori, T. Differential involvement of ATG16L1 in Crohn's disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the ATG16L1 complex in fibroblasts.

J Biol Chem. (2009) *284*, 32602-32609. 査読有り

(2) Saitoh, T. *, Fujita, N. *, Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Kawai, T., Ishii, K., Takeuchi, O., Yoshimori, T., and Akira, S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. (*contributed equally)

Proc Natl Acad Sci U S A. (2009) *106*, 20842-20846. 査読有り

(3) Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. A Subdomain of the Endoplasmic Reticulum Forms a Cradle for Autophagosome Formation.

Nature Cell Biology. (2009) *11*, 1433-1437, 査読有り

(4) Saitoh, T. *, Fujita, N. *, Jang, M., Uematsu, S., Yang, B., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., and Akira, S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1b production. (*contributed equally)

Nature. (2008) *456*, 264-268. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

藤田尚信, Functional analysis of the Atg16L complex essential for mammalian autophagy, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋国際会議場 (2009.6.3)

[図書] (計 2 件)

藤田尚信、他、共立出版、メンブレントラフィックの奔流、2008

[その他]

ホームページ等

<http://www.saibouseigyo.com/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 尚信 (FUJITA NAONOBU)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：00506496

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：