

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03213

研究課題名(和文) 多様な選択的オートファジーの分子基盤と生理機能の解明

研究課題名(英文) Molecular Basis and Physiological Functions of Diverse Selective Autophagy

研究代表者

森下 英晃 (Morishita, Hideaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90783499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内の特定の成分を効率よく分解することができる。この選択的オートファジーと呼ばれる作用は近年、様々な疾患の発症抑制に関与することが示唆されてきているが、生体内で選択的オートファジーによってどのような基質がどのような分子メカニズムで分解されているのかはほとんど不明であった。本研究では、選択的オートファジー阻害法を独自に確立することで、生体内における選択的オートファジーの基質を網羅的に同定した。今後、本技術を用いることで、生理的・病態生理的条件下における細胞内分解の包括的理解につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、選択的オートファジーの破綻は神経変性疾患(パーキンソン病、萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、プロペラ蛋白関連神経変性症、Vici症候群等)、腫瘍、感染症等の様々な疾患と関連することが示唆されている。本研究では生体内での選択的オートファジーの役割を基質レベルで解析するツールを開発できたため、今後、本ツールを各種ストレス下や疾患モデルでの解析に適用していくことで、選択的オートファジー不全疾患の病態の解明や、予防・治療法のシーズ同定つなげていくことができる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy can efficiently remove specific intracellular components. This action, called selective autophagy, has recently been suggested to be involved in suppression of various diseases, but what substrates are degraded by selective autophagy in vivo, and by what molecular mechanism, has been largely unknown. In this study, we established a new selective autophagy inhibition method and comprehensively identified the substrates of selective autophagy in vivo. In the future, this technique will lead to a comprehensive understanding of intracellular degradation under physiological and pathophysiological conditions.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、生化学

キーワード：オートファジー リソソーム 恒常性維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

選択的オートファジーは異常あるいは過剰なタンパク質やオルガネラを効率的に分解する作用であり、その破綻は神経変性疾患や腫瘍等の様々な疾患と関連することが示唆されている。選択的オートファジーによる基質認識は、基質自体だけでなく、オートファゴソーム膜上の LC3 ファミリータンパク質 (LC3, GABARAP) やオートファジー初期因子 (FIP200 等) 等のオートファジー関連因子とも結合できるオートファジーレセプターと呼ばれる一連のタンパク質によって担保されている。例えば、選択的オートファジーによる小胞体の分解 (ER ファジーと呼ばれる) の際には、TEX264、FAM134B、CCPG1 等の複数の小胞体膜タンパク質がオートファジー関連タンパク質と結合することで選択的オートファジーを誘導する。一方、可溶性の基質タンパク質 (ユビキチン化タンパク質等) はまず p62 液滴と呼ばれる非膜型オルガネラに液液相分離を介して濃縮される。p62 は自己オリゴマー化するとともにユビキチン化タンパク質と結合することで液滴を形成するオートファジーレセプターの一つである。近年、これらの選択的オートファジーの分子基盤については徐々に解明されつつあるが、生体内でどのような基質がどのような分子メカニズムで選択的オートファジーによって分解されているのかはほとんど不明である。

2. 研究の目的

本研究では、選択的オートファジー阻害方法を開発し、生体内における新たな選択的基質を同定することを目的とする。構造生物学や *in vivo* ライブ観察等の多角的アプローチによって各基質の分解の分子機構や動態も明らかにする。本研究によって、選択的オートファジーの生理機能や分子メカニズムについての体系的な理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規選択的オートファジー阻害方法

選択的オートファジーを阻害する方法として、HyD-LIR-Venus プロープを用いる。本プロープは、プロープの膜結合を強化する疎水性ドメイン (HyD)、LC3 結合部位 (LIR)、蛍光タンパク質 (Venus) から成り、高発現させると選択的基質の LC3 への結合が阻害されるため、非選択的オートファジーには影響を与えず、選択的オートファジーのみを阻害できる。まずこのプロープを発現させた培養細胞を作製するとともに、Rosa26 部位にノックインしたマウスを作製する (新潟大学崎村建司、阿部学博士らとの共同研究)。後者では、Cre リコンビナーゼ依存的にプロープが高発現するように設計されているため、肝臓特異的 Cre 発現マウスと交配する。

(2) 選択的オートファジー阻害マウスに蓄積したタンパク質の質量分析と細胞生物学的解析

選択的オートファジーの新規基質を同定するため、上記選択的オートファジー阻害マウスの肝臓に蓄積したタンパク質を網羅的に同定する。具体的には、約 2 か月齢の野生型およびプロープ発現マウスの肝臓を摘出し、アイソバリック標識 TMT (タンデム質量タグ) を用いた定量的プロテオミクス解析を行う。同様な解析を 1 年齢のマウスでも実施する。次に HyD-LIR-Venus を発現させた細胞、臓器において、選択的オートファジーの既知の各種基質 (p62、ユビキチン化タンパク質等) が蓄積することを確認する。これらのマウスの表現型を血清学的、形態学 (H&E 染色、免疫染色、電子顕微鏡)・生化学的 (ウェスタンブロット) に評価する。さらに転写レベルの変動を RNASeq により解析する。

(3) p62 変異マウスの作製と解析

選択的オートファジーとストレス応答との関係性を解析するため、NRF2 依存的な酸化ストレス応答の制御を司る p62 のリン酸化部位に変異を導入したノックインマウスを CRISPR/Cas9 法を用いて作製し、表現型を血清学的、形態学 (H&E 染色、免疫染色、電子顕微鏡)・生化学的 (ウェスタンブロット) に評価する。さらに転写レベルの変動を RNASeq により解析する (熊本大学古賀友紹博士との共同研究)。

4. 研究成果

(1) 新規選択的オートファジー阻害方法の確立

HyD-LIR-Venus プロープを発現させた培養細胞を作製し、選択的オートファジーが抑制されているかどうかについて、ウェスタンブロット法を用いて解析した。その結果、プロープを発現させた細胞では、既知の基質 (p62、NBR1、TAX1BP1、ユビキチン化タンパク質) が蓄積することを確認できた。次に HyD-LIR-Venus flox マウスと Alb-Cre マウスを交配することで、HyD-LIR-Venus flox/flox; Alb-Cre マウスと HyD-LIR-Venus flox/flox マウスを作製し、表現型を血清学、形態学 (H&E 染色、免疫染色、電子顕微鏡)・生化学的 (ウェスタンブロット) に評価した。その結果、プロープを肝臓に発現させたマウス (ホモ発現) では、血清学的には軽度の肝障害 (AST、ALT の増加)、形態学的には肝細胞の軽度肥大、ペルオキシソームの蓄積、生化学的には

p62、NBR1、TAX1BP1、小胞体タンパク質 TEX264、ミトコンドリアのチトクローム C の蓄積を認めた。一方、ヘテロ発現マウスでは軽度の表現型を認めたのみであった。これらの結果から、本プローブを過剰発現させることで培養細胞だけでなく個体レベルでも選択的オートファジーを抑制できることを確認できた。

(2) 選択的オートファジー阻害マウスに蓄積したタンパク質の網羅的同定

生体内における選択的オートファジーの基質を網羅的に同定するため、(1)で作製したプローブ発現マウスの肝臓に蓄積しているタンパク質をタンデム質量タグを用いた定量的プロテオミクスにより網羅的に同定した(図1)。その結果、ウェスタンブロット法による解析の結果と一致して、既知の選択的オートファジーの基質タンパク質群 (p62, NBR1, TAXBP1, CALCOCO1, CCPG1, TEX264, PRKAR1A 等) がプローブ発現マウスにおいて蓄積していることを確認できた(図1)。次に新規基質タンパク質を同定するため、質量分析で同定された基質候補タンパク質群が確かに選択的オートファジー阻害マウスで蓄積しているかどうかを、内在性タンパク質に対する抗体を用いて解析した。その結果、いくつかの有力な基質タンパク質候補を絞り込むことができたため、それらの細胞内局在やオートファジー依存的分解(パフィロマイシン A1 処理やオートファジー必須因子の欠損に伴う蓄積)を培養細胞を用いて解析した。並行して、転写亢進によるタンパク質蓄積の可能性を検討するため、プローブ発現マウスの RNAseq 解析を行った。その結果、プローブ発現マウスでは転写因子 NRF2 依存的に発現する遺伝子群 (Gstm1, Gstm2, Gstm3, Abcc12 等) の顕著な発現亢進を認め、p62 の分解不全による NRF2 活性化が示唆された(図2)。プロテオーム解析の結果(図1)をトランスクリプトーム解析の結果(図2)と比較することで、複数の新規基質候補を絞り込むことができた。p62 欠損細胞・マウスを用いたウェスタンブロット解析も行った結果、最終的に超分子複合体サブユニットを含むいくつかの新規選択的オートファジー基質を同定することができた。

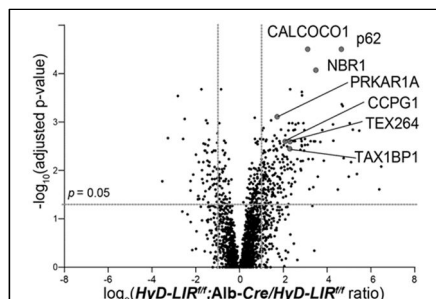


図1 選択的オートファジー阻害マウスの質量分析

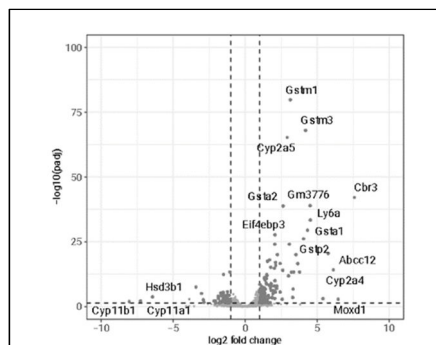


図2 選択的オートファジー阻害マウスのトランスクリプトーム解析

(3) 選択的オートファジーとストレス応答の関係性の個体レベルでの解析

選択的オートファジーとストレス応答との関係性を解析するため、転写因子 NRF2 依存的な抗酸化ストレス応答の制御を担う p62 のリン酸化部位にリン酸化模倣変異を導入したノックインマウスを CRISPR/Cas9 法を用いて作製した結果、ヘテロ変異マウスでは恒常的に NRF2 が活性化されていることがわかった (NQO1 等の NRF2 によって正に制御されている遺伝子群の発現が亢進)(図3)。さらにヘテロ変異マウスは、食道や前胃上皮細胞が過角化を認め、食道や前胃の閉塞による重篤な栄養失調や脱水症状を呈し、成長障害を認めた(図3)。これらの表現型は KEAP1 ノックアウトマウスの表現型と酷似しており、生体内における p62-KEAP1-NRF2 経路の重要性が初めて明らかになった。

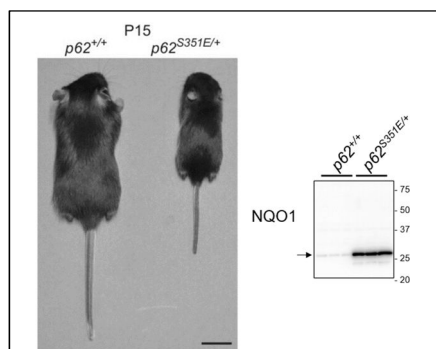


図3 選択的オートファジー基質 p62 の NRF2 依存的ストレス応答との関係性の個体レベルでの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10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 1件）

1. 著者名 Hama Yutaro, Morishita Hideaki, Mizushima Noboru	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulation of ER derived membrane dynamics by the DedA domain containing proteins VMP1 and TMEM41B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153894	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 Kurusu Reo, Fujimoto Yuki, Morishita Hideaki, Noshiro Daisuke, Takada Shuhei, Yamano Koji, Tanaka Hideaki, Arai Ritsuko, Kageyama Shun, Funakoshi Tomoko, Komatsu-Hirota Satoko, Taka Hikari, Kazuno Saiko, Miura Yoshiki, Koike Masato, Wakai Toshifumi, Waguri Satoshi, Noda Nobuo N., Komatsu Masaaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Integrated proteomics identifies p62-dependent selective autophagy of the supramolecular vault complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	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) 10.1016/j.devcel.2023.04.015	査読の有無 無
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 Ikeda Ryo, Noshiro Daisuke, Morishita Hideaki, Takada Shuhei, Kageyama Shun, Fujioka Yuko, Funakoshi Tomoko, Komatsu Hirota Satoko, Arai Ritsuko, Ryzhii Elena, Abe Manabu, Koga Tomoaki, Motohashi Hozumi, Nakao Mitsuyoshi, Sakimura Kenji, Horii Arata, Waguri Satoshi, Ichimura Yoshinobu, Noda Nobuo N., Komatsu Masaaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Phosphorylation of phase separated p62 bodies by ULK1 activates a redox independent stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	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/embj.2022113349	査読の有無 無
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 Morishita Hideaki, Komatsu Masaaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Role of autophagy in liver diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Physiology	6. 最初と最後の頁 100594 ~ 100594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cophys.2022.100594	査読の有無 無
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 Liton Paloma B., Boesze-Battaglia Kathleen, Boulton Michael E., Boya Patricia, Ferguson Thomas A., Ganley Ian G., Kauppinen Anu, Laurie Gordon W., Mizushima Noboru, Morishita Hideaki, Russo Rossella, Sadda Jaya, Shyam Rajalekshmy, Sinha Debasish, Thompson Debra A., Zacks David N.	4. 巻 2
2. 論文標題 Autophagy in the eye: from physiology to pathophysiology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy 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) 10.1080/27694127.2023.2178996	査読の有無 無
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 Morishita Hideaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Role of autophagy in the eye: from physiology to disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Physiology	6. 最初と最後の頁 100592 ~ 100592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cophys.2022.100592	査読の有無 無
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 森下英晃、小松雅明	4. 巻 82(4)
2. 論文標題 肝臓におけるオートファジーの生理的・病態生理的意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 577,584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 日本生化学会奨励賞受賞記念講演：水晶体における大規模細胞小器官分解の分子機構と生理的意義の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Morishita
2. 発表標題 Ken-ichi Arai Award 2021受賞記念講演: Physiological roles and molecular mechanisms of autophagy-dependent and independent degradation systems in vertebrates.
3. 学会等名 The 27th East Asia Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 オートファジー依存的・非依存的な細胞内分解系の分子機構・生理機能の解明
3. 学会等名 御茶ノ水WEB Diabetes Hybrid Seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 選択的オートファジーの新規基質 "Vault" の同定とその分解メカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会 シンポジウム「[新学術]マルチモードオート ファジー研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 新たな細胞内選択的分解機構の発見
3. 学会等名 金沢大学・第4回組織細胞学セミナー(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 新たな細胞内選択的分解機構の発見
3. 学会等名 東北大学・NM高等教育セミナー/第30回東北生活習慣病研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 新たな細胞内選択的分解機構の発見
3. 学会等名 福井大学・第693回学内セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideaki Morishita, Reo Kurusu, Yuki Fujimoto, Shuhei Takada, Masaaki Komatsu
2. 発表標題 Proteomic approaches to purified p62-bodies and selective autophagy-deficient mice identify a novel substrate for p62-mediated selective autophagy
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 新たな細胞内選択的分解機構の発見
3. 学会等名 慶応義塾大学医学部 Cross-disciplinary Conference 2023（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下 英晃
2. 発表標題 新規細胞内分解システムの同定とその破綻による病態の解明
3. 学会等名 第31回日本医学会総会（奨励賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体内における多様な細胞内分解現象のメカニズムを解明し、疾患の理解・治療への貢献を目指す
<https://goodhealth.juntendo.ac.jp/medical/000159.html>
 森下英晃講師が令和4年度 科学技術分野 文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受賞
<https://www.juntendo.ac.jp/news/20220408-01.html>
 若手研究者に聞く（日本生化学会奨励賞受賞者コメント）
https://www.jbsoc.or.jp/column/2021_2.html

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