

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440077

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス増殖に関わる膜輸送メカニズムの解明に向けて

研究課題名(英文) Investigation of membrane trafficking for HCV biogenesis

研究代表者

伊藤 敬 (Itoh, Takashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50373270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内恒常性を維持するメカニズムであり、恒常性の障害となる不溶性タンパク質や機能不全になったオルガネラを分解している。オートファジーの過不足は恒常性の破綻となるためその活性制御は重要である。また基質を適切に認識する事が恒常性の維持には必要である。本申請では、この「制御」と「認識」に共通の分子が用いられている事、しかしその用い方に異なったメカニズムを持っている事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a degradation system required for keeping intracellular homeostasis, eliminating insoluble protein aggregates and damaged organelle. Since excess and insufficient activity of autophagy lead to defect of the homeostasis, the regulation of autophagic activity is important. In addition, the proper recognition of substrates for degradation is also essential for maintaining the homeostasis. Here, I showed that the same molecule is used in the regulation of activity and the recognition of substrates but the way of usage is different each other.

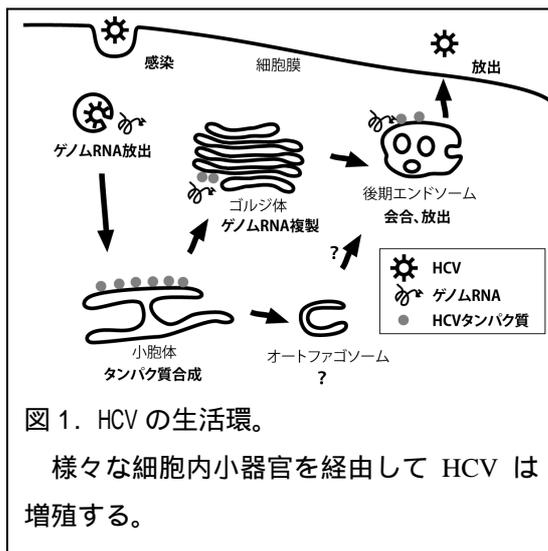
研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー LC3結合タンパク質 基質認識

1. 研究開始当初の背景

世界人口の約 3% が感染しているとも言われる C 型肝炎ウイルス (HCV) は、肝硬変、肝癌の発症率を上げるという危険性にも関わらず、その増殖のメカニズムはほとんど明らかになってなかった。

肝細胞表面に結合した HCV は細胞内に取り込まれた後、ゲノム RNA が複製され、構造タンパク質と会合し細胞外へと放出される。HCV 膜を形成するために必要なエンベロープタンパク質は膜貫通タンパク質であり、翻訳後に小胞体膜に刺さった状態で切断を受け機能的となり、HCV は後期エンドソーム経路で放出されると考えられているため、この HCV の生活環は細胞内小器官と密接なかわり合いがあると考えられていた。しかしながら、小胞体で翻訳された構造タンパク質がどのように後期エンドソームに運ばれるのか、HCV 複製、会合、放出に関わる細胞内小器官間の膜輸送システムはほとんど明らかになっていない状態であった (図 1)。



近年、オートファジー必須因子である Atg7 や Beclin1 の発現抑制によって HCV の増殖に異常をきたす事が報告され、オートファジーと HCV 増殖との関連性が示唆されており、加えて、細胞内膜輸送を制御する低分子量 G タンパク質 Rab ファミリーの一つである

Rab33B がそのノックダウンにより HCV の複製効率を低下させるという報告がされていた。私はこの Rab33B と、オートファジーに必須なタンパク質である Atg16L1 との直接結合を見出し、Atg16L1 と Rab33B とが HCV 増殖における膜輸送を制御しているのではないかという着想を得、研究を開始した。

2. 研究の目的

以下の 3 点を主な目的として研究を始めた。

(1) HCV 複製のどの過程に Rab33B, Atg16L1 は関与しているのか？

Atg16L1 に関しては HCV 増殖への関与が直接示されていないため、まず Rab33B と Atg16L1、それぞれが HCV 増殖に関与している事をノックダウン実験により確認する。次に、Rab33B と Atg16L1 が HCV 増殖のどの過程に関与しているのかを明らかにする。更に、Rab33B, Atg16L1 のお互いに対する結合不全変異体を作製し、HCV 増殖に対する影響を調べることで、両者が実際に協調的に機能しているのかを明らかにしたい。また、Rab33B 不活性化因子として申請者が同定した OATL1 が HCV 感染から受ける影響を検証し、Rab33B 活性調節機構を明らかにする。

(2) HCV 感染によって Rab33B, Atg16L1 の活性は変化するのか？

ウイルスは宿主細胞のタンパク質の活性を調節し増殖に利用する事が知られている。同様に HCV 感染時に Rab33B, Atg16L1 の活性が変化しているのか、局在観察や生化学的なアッセイを用いて検証する。

(3) HCV 増殖に関わる Rab タンパク質の新規同定

Rab33B がかわる経路だけでなく、HCV 増殖においては様々な膜輸送経路が用いられていると想定される。その全容を明らかにするために網羅的な解析を行い、HCV 増殖に必須な Rab タンパク質を同定する。関与が示唆された Rab に関しては、HCV 増殖のど

の過程に関わるのか、詳細に検討する。

3. 研究の方法

HCV の感染、増殖をモニターするために、Huh7 細胞を用いてアッセイを行なった。HCV の増殖は細胞培養液中のウイルス RNA を回収し、逆転写後、リアルタイム PCR 法を用いて、ウイルス量を測定することで行なった。Atg16L1, Rab33B のノックダウンはレンチウイルスを用いた shRNA 発現系で行なった。

4. 研究成果

HCV の増殖に関して Rab タンパク質を中心に解析を行なった研究はこれまでに無く、国内外に関わらず独創性の高い研究であると考えている。特に Rab33B と Atg16L1 との相互作用は、私が同定し、他に先駆けて解析を行なってきたため、HCV 増殖においてこの相互作用が持つ生理的役割を明らかにする事ができれば、HCV 増殖の分子メカニズム解明のさきがけとなると考えていた。特に Atg16L1 機能の詳細を明らかにする事は、数々の疾患と関わりあるオートファジーの新しい役割の解明につながるものと期待していた。しかし予想に反して shRNA を用いた Rab33B 及び Atg16L1 の発現抑制は Huh7 細胞に感染させた HCV の増殖を抑制せず、作業仮説としていた、Rab33B と Atg16L1 との結合の HCV 増殖への関与を見直す必要に迫られた。また私の職場の異動もあり研究対象の変更の必要が生じたため、オートファジーの基質認識メカニズムの解明を行なうこととした。当初選択性の無い分解機構と考えられていたオートファジーだが、積極的にオートファジーによって分解されるタンパク質、p62/SQSTM1 の発見により選択性のある分解様式「選択的オートファジー」の存在が認識されている。その後、様々なオルガネラにお

いて積極的にオートファジーによって分解される、つまりオートファゴソームに認識されるメカニズムが明らかになり、選択的オートファジーの研究が盛んに行なわれるようになった。その認識メカニズムの代表的なものとしては、基質となるタンパク質やオルガネラとオートファゴソームをつなぐ「アダプタータンパク質」が存在するというものである。このアダプタータンパク質は、基質に存在するユビキチン鎖と結合し、オートファゴソーム上に局在する LC3 タンパク質群とも結合することで、基質の積極的な分解を促している。LC3 タンパク質群はオートファゴソームの外側、内側に均質に局在しているため、現行のモデルに従うと、LC3 タンパク質群に結合するタンパク質は全てオートファジーの基質になるはずである。しかしながら興味深いことに、私が同定した LC3 タンパク質群結合タンパク質である OATL1/TBC1D25 はその結合能依存的にオートファジーの活性を制御していることが示されたが、オートファジーを活性化しても分解を受けることがなかった。つまり OATL1 はオートファジーの分解から逃れるメカニズムを持っていると想定されたが、その詳細な仕組みは明らかではなかった。そこで、OATL1 と代表的なオートファジーの基質となるアダプタータンパク質である p62 との比較を行なうことで、オートファゴソームの基質認識メカニズムの詳細を明らかにすることを試みた。

OATL1 と p62 との大きな相違は p62 が多量体を形成するのに対し、OATL1 は二量体までしか形成しない事が挙げられたため、人工的な多量体形成ドメインである FM ドメインを OATL1 に付加し、そのキメラタンパク質の安定性を調べた。すると多量体形成能の増加に伴って、キメラタンパク質はオートファジーによって分解を受け易くなる事が明らかになった。これらの実験から、オートファジーの基質となる条件としては、LC3 タンパク質

群結合能のみならず、多量体能が必要であると考えている。また、電子顕微鏡を用いた詳細な局在解析から、OATL1 はオートファゴソームの外側に偏った局在パターンを示す事が明らかになった。これは、OATL1 がオートファゴソーム局在の足場としている LC3 の局在がオートファゴソームの外側と内側とにほぼ均等に局在している事と対照的であり、非常に興味深い発見であると考えている。人為的に多量体化させた OATL1 や p62 はオートファゴソームの内外におよそ均等に局在していた事を考えあわせると、OATL1 がオートファゴソームの基質とならない原因は、この非対称な分布にあるのではないかと推察された。OATL1 の過剰発現はオートファゴソームの成熟を遅延させることから、OATL1 はオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する役割がある可能性がある。リソソームとの融合はオートファゴソームの外膜で行なわれるため、OATL1 のオートファゴソーム外側への偏った局在は、OATL1 の機能を果すうえで、理に適ったものであると考えられる。OATL1 の成熟遅延の機能は Rab 不活性化能に依存しており、恐らくリソソームに局在し融合を促進する Rab の機能を阻害することが OATL1 の役割ではないかと考えている。この非対称な分布を生み出すメカニズムは現在の所不明であるが、興味深いことに過去の報告に、FYCO1 という OATL1 同様 LC3 タンパク質群に結合するタンパク質が OATL1 と同様にオートファゴソームの外側に偏って局在していることが示されている。FYCO1 は同時にキネシンモータータンパク質とも結合することで、オートファゴソームの微小管上の運動を可能にしており、この事はオートファゴソームとリソソームの融合を促進する方向に働くため、FYCO1 の非対称な局在もその機能に適ったものであると考えられる。FYCO1 の多量体能や基質となる可能性については現在のところ不明であるが、OATL1 と FYCO1、及び

p62 のタンパク質の比較によって、LC3 タンパク質結合タンパク質のオートファゴソーム上での分布を制御する分子メカニズムを明らかにできると考えている。オートファゴソームはその生合成の詳細も未だ不明であり、発見から半世紀が経とうとしている今でも謎の多いオルガネラである事に異論はないであろう。今回の研究成果がその謎の一端を明らかにする一助になることを期待している。

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 4 件)

1. Hirano, S., Uemura, T., Annoh, H., Waguri, S., Itoh, T., and Fukuda, M. Differing susceptibility to autophagic degradation of two LC3-binding proteins: sequestosome-1/p62 and OATL1, *Autophagy* 12: 312-326. doi: 10.1080/15548627.2015.1124223. (査読あり)
2. Hao, F., Itoh, T., Morita, E., Shirahama-Noda, K., Yoshimori, T., and Noda, T. The PtdIns3-phosphatase MTMR3 Interacts with mTORC1 and Suppresses Its Activity. *FEBS Lett.* 2016. 590:161-173. doi: 10.1002/1873-3468.12048. (査読あり)
3. Amagai, Y., Itoh, T., Fukuda, M., and Mizuno, K. Rabin8 suppresses autophagosome formation independently of its guanine nucleotide-exchange activity towards Rab8. *J. Biochem.* 158: 139-153, 2015. doi: 10.1093/jb/mvv032. (査読あり)
4. Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Guan, J.L., Iwai, K., Tokunaga, F., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, S., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during

infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.*

2013. 203:115-128. doi:

10.1083/jcb.201304188. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 敬 (Takashi Itoh)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50373270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし