

機関番号：32620

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21790192

研究課題名 (和文) 酵母オートファジー関連遺伝子 Atg8 の哺乳類オルソログ LC3A の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of LC3A, mammalian ortholog of yeast autophagy-related gene Atg8

研究代表者

佐々木 光穂 (SASAKI MITSUHO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20432536

研究成果の概要 (和文)：

現在、哺乳類において LC3 (LC3B) はオートファジーのマーカータンパク質 (LC3-II) として広く用いられているが、LC3 と非常に高い相同性をもつ LC3A に関しては、その機能や生理学的な役割などについてはまったく不明であった。そこで本研究では、ジーントラップ法により LC3A を欠損させたマウスの作出を行った。この LC3A 欠損マウスは顕著な表現型を示さなかった。このことから LC3A と相同性の高い LC3 (LC3B) が LC3A の機能を相補していることが考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

A microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) is an essential factor of autophagosomal membrane formation. The amino acid sequence of LC3A is highly similar to that of LC3B, but the functional property of LC3A is still unknown. To characterize the function of LC3A, we generated LC3A conditional knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	0	0	0
2007年度	0	0	0
2008年度	0	0	0
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織額・発生学)

キーワード：細胞機能形態学

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジー (自食作用) は、細胞質成分をリソソームで分解する機構の主要な経路であり、別の分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系が基質を特異的に認識して分解するのに対し、オートファジーは細胞

質構成成分を非選択的に一度に多くのものを分解する経路である。栄養飢餓などの細胞内ストレスを与えてオートファジーを誘導すると、小胞体様の二重膜 (隔離膜) が細胞質の一部を取り囲み、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体を形成する。このオー

トファゴソームの外膜と、一重膜構造体であるリソソームが融合することによりリソソーム由来の加水分解酵素が供給され、オートファゴソームの内膜とその内容物である細胞質成分は生物活性のあるモノマーまで分解され、その多くは細胞の内外で再利用される。オートファジーは真核生物に普遍的に存在するリソソームによる分解経路の主要な部分を占め、飢餓時などに誘導されて高分子化合物を単体まで分解し再利用系に回す機構を担う他にも、恒常的に長寿命タンパク質や異常構造タンパク質のクリアランス機構を担っていることが報告されている。高等真核生物においてオートファジーは恒常的にみられる現象であるが、酵母で見られるような飢餓に応じたアミノ酸の供給というような単純なものではなく、むしろ細胞内構成成分の品質管理という点で非常に重要であると考えられている。体細胞の多くは、細胞分裂により細胞が増殖および脱落し細胞成分の代謝（浄化作用）が起こっているが、神経細胞のような非分裂細胞ではこのような浄化作用がないためオートファジーがより重要な役割を担っていると考えられている。

オートファジー現象は、酵母におけるオートファゴソーム形成に関わる遺伝子群（Atg 遺伝子）の同定を発端として分子レベルでの機構解明が大きく発展してきている。これら酵母 Atg 遺伝子のタンパク質産物の生理的な役割の解析も、酵母のみならず哺乳類 Atg 遺伝子オルソログにおいても進められている。

酵母 Atg8 遺伝子のオルソログとして報告されている LC3（microtubule-associated protein 1 light chain 3）は、1987年に微小管結合タンパク質 MAP1（microtubule-associated protein 1）と共精製されるタンパク質として発見された。2000年に壁谷、大隅らによってラット LC3 がオートファゴソームの膜上に存在することが初めて示された。LC3 は酵母 Atg8 タンパク質と同様、翻訳直後に C 末端領域のプロセッシング反応を受けて細胞質型 LC3（LC3-I）となり、さらに LC3-I は C 末端のグリシン残基フォスファチジルエタノールアミン（PE）修飾を経て、オートファゴソームの膜上に膜結合型 LC3（LC3-II）として局在するようになる。この LC3-I から LC3-II への変換は栄養飢餓などによるオートファゴソーム形成にともない促進されることから、LC3-II はオー

トファジー現象のマーカータンパク質として広く利用されている。

2000年に LC3 が酵母 Atg8 遺伝子のオルソログであることが報告されたが、のちになって LC3 には、ラットとマウスでは 2 種（LC3A、LC3B）、ヒトでは 3 種（LC3A、LC3B、LC3C）のサブファミリーが存在することが報告された。これら LC3 のそれぞれのサブファミリーの種間での保存性は非常に高く、また LC3A と LC3B においても N 末端領域を除き高い相同性を有している。さらに酵母 Atg8 遺伝子の哺乳類オルソログは LC3 の他に、GATE-16

（Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa）、GABARAP（ $\gamma$ -aminobutyric acid-type A receptor-associated protein）、GABARAP L1（GABARAP-like 1）が報告されている。これら GATE16、GABARAP、GABARAP L1 は、培養細胞において LC3 と同様に PE 修飾を受けて膜結合型となり LC3 陽性のオートファゴソームに局在することが示されている。

酵母の Atg8 はオートファジーに必須であることが示されており、哺乳類においても LC3 はオートファゴソームの形成に必須なタンパク質であると考えられている。しかしながら、酵母 Atg8 が単一種であるのに対し、哺乳類においては Atg8 オルソログが多数存在していることから、哺乳類におけるオートファジーはより複雑な機構を有しているものと考えられるが、これら酵母 Atg8 の哺乳類オルソログの機能の差異、生理学的な役割については不明である。

## 2. 研究の目的

酵母 Atg8 遺伝子の哺乳類オルソログ LC3B は、オートファジーのマーカータンパク質（LC3-II）として広く用いられているが、LC3B と非常に高い相同性をもつ LC3A に関しては、その機能や生理学的な役割についてはまったく不明である。また、オートファジー現象を検出するのに用いられている LC3B に対する抗体は、LC3A にも交差反応して LC3B と LC3A の両方を検出しているという問題が生じている。

そこで本研究では LC3A 欠損マウスを作成することにより LC3A の機能を明らかにすることを目的とした。また、ジーントラップ法によって LC3A のプロモーター支配で発現した  $\beta$ -ガラクトシダーゼの染色を行うことにより LC3A の発現様式の解析を行うこととし

た。また、LC3A 遺伝子を欠損させた ES 細胞株を用いた解析も行うこととした。

### 3. 研究の方法

LC3A 欠損マウス作出にあたって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子と選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を含むカセットをもつターゲティングベクターを作製する。また、このカセットにはスプライシングアクセプター配列を挿入し、LC3A のエキソン 1 とカセットとが融合した mRNA を発現するようにし、本来の LC3A 遺伝子を発現させないジーントラップ法により LC3A 遺伝子を欠損させる。この LC3A のエキソン 1 とカセットの融合 mRNA は LC3A のプロモーター支配で発現するため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの染色を行うことにより LC3A の発現様式の解析を行うことができる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼが強発現していた組織あるいは細胞種について形態学的手法を用いて LC3A 欠損マウスの詳細な観察を行う。さらには、絶食条件下における LC3A 欠損マウスのオートファジー現象を形態学的手法を用いて観察する。

ネオマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして用いたターゲティングベクターでは、選択時の G418 (選択に用いられるアミノグリコシド系抗生物質) の濃度を上げることにより両側のアレルで組み換えを起こした ES 細胞株を作製することができる。この方法により両アレルの LC3A 遺伝子を欠損させた ES 細胞株を樹立し、この LC3A 欠損 ES 細胞株をさまざまな細胞に分化させ、その分化能の検討を行う。

### 4. 研究成果

ターゲティングベクターは、LC3A 遺伝子のエキソン 1 とエキソン 2 の間のイントロン部分にジーントラップカセット挿入するものを作製した。このベクターを用いて C57B6/J マウス由来 ES 細胞の LC3A 遺伝子の片アレルだけ、あるいは両アレルをターゲットした ES 細胞株を樹立した。

両アレルをターゲットした ES 細胞株を用いて神経細胞への分化能の検討を行ったところ、MAP2 陽性な神経突起をもつ神経細胞に分化させることができた。このことから LC3A は神経細胞への分化、神経突起の伸張には関与していない可能性が示された。

片アレルの LC3A 遺伝子を欠損させた ES 細胞株をマウスの胚盤胞に注入し、キメラマウスの作製を行ったところ、1 ラインに germline transmission が認められ、LC3A(+/ $\beta$ geo)マウス (F1 マウス) を得ることができた。これら F1 マウス同士を交配し LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスを作出した。しかしながら、このジーントラップ法によって LC3A 遺伝子を欠損させた LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスは顕著な表現型を呈示しなかった。そこで、このマウスにおける LC3A の mRNA の有無を RT-PCR 法で確認したところ、いくつかの臓器 (心臓など) においてジーントラップが完全に機能せず LC3A 遺伝子の弱い発現が見られた。この遺伝子発現の '漏れ' が表現型の出ない原因とも考えられたため、LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスと Cre トランスジェニックマウスを交配することにより LC3A 遺伝子のエキソン 2 とエキソン 3 を欠くコンベンショナルなノックアウトマウスを作製することとした。まず、LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)と FLP トランスジェニックマウスを交配することによりスプライシングアクセプター配列を含むカセットを取り除いて LC3A の発現を元に戻したマウスを作出したのち、telencephalin-Cre マウスと交配して LC3A(+/-) マウスを作出した。これら LC3A(+/-)マウス同士を交配することにより全身で LC3A 遺伝子を欠損させた LC3A(-/-)マウスの作出をおこなった。LC3A(-/-)マウスは LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスと同様、繁殖可能で顕著な表現型は示さなかった。このことは、LC3A の機能を LC3A と相同性の高い LC3B が相補している可能性が考えられた。さらなる解析として LC3B を欠損したマウスとのダブルノックアウトマウスを用いた解析が必要になってくると思われる。LC3 は細胞骨格タンパク質として同定されており、このダブルノックアウトマウスを解析することにより、LC3A と LC3B のオートファジー以外での機能を解明する一端になる可能性も多いと考えられる。

細胞株をマウスの胚盤胞に注入し、キメラマウスの作製を行ったところ、1 ラインに germline transmission が認められ、LC3A(+/ $\beta$ geo)マウス (F1 マウス) を得ることができた。これら F1 マウス同士を交配し LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスを作出した。しかしながら、このジーントラップ法によって LC3A 遺伝子を欠損させた LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスは顕著な表現型を呈示しなかった。そこで、このマウスにおける LC3A の mRNA の有無を RT-PCR 法で確認したところ、いくつかの臓器

(心臓など) においてジーントラップが完全に機能せず LC3A 遺伝子の弱い発現が見られた。この遺伝子発現の '漏れ' が表現型の出ない原因とも考えられたため、LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスと Cre トランスジェニックマウスを交配することにより LC3A 遺伝子のエキソン 2 とエキソン 3 を欠くコンベンショナルなノックアウトマウスを作製することとした。まず、LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)と FLP トランスジェニックマウスを交配することによりスプライシングアクセプター配列を含むカセットを取り除いて LC3A の発現を元に戻したマウスを作出したのち、telencephalin-Cre マウスと交配して LC3A(+/-) マウスを作出した。これら LC3A(+/-)マウス同士を交配することにより全身で LC3A 遺伝子を欠損させた LC3A(-/-)マウスの作出をおこなった。LC3A(-/-)マウスは LC3A( $\beta$ geo/ $\beta$ geo)マウスと同様、繁殖可能で顕著な表現型は示さなかった。このことは、LC3A の機能を LC3A と相同性の高い LC3B が相補している可能性が考えられた。さらなる解析として LC3B を欠損したマウスとのダブルノックアウトマウスを用いた解析が必要になってくると思われる。LC3 は細胞骨格タンパク質として同定されており、このダブルノックアウトマウスを解析することにより、LC3A と LC3B のオートファジー以外での機能を解明する一端になる可能性も多いと考えられる。

### 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 2 件)

① Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, Sasaki M, Koike

M, Arai H, Kominami E, Uchiyama Y.  
LC3, a microtubule-associated protein  
1A/B light chain 3, is involved in  
cytoplasmic lipid droplet formation.  
Biochemical and Biophysical Research  
Communication, vol.393, 2010, 274-279 査  
読有

②Tamura H, Shibata M, Koike M, Sasaki M,  
Uchiyama Y.  
Atg9A protein, an autophagy-related  
membrane protein, is localized in the  
neurons of mouse brains.  
Journal of Histochemistry and  
Cytochemistry, vol.58, 2010, 443-453, 査  
読有

[学会発表] (計2件)

- ①第115回 日本解剖学会総会
- ②第116回 日本解剖学会総会

[その他]

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei\\_kozo/index.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/shinkei_kozo/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 光穂 (SASAKI MITSUHO)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：20432536