

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08613

研究課題名(和文) 脳の恒常性維持におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文) The role of autophagy in the maintenance of homeostasis in brain

研究代表者

久万 亜紀子 (Kuma, Akiko)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：30392377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞質成分をオートファゴソームと呼ばれる袋状の構造体で包み込み、リソソームへ運んで分解する細胞内分解システムである。神経特異的オートファジー遺伝子欠損マウスは神経変性疾患様の症状を示すが、本研究ではその原因を明らかにするため、マウス脳内におけるオートファジー選択的基質の同定を試みた。解析の結果、オートファジーを起こせないマウス脳では、オートファジー選択的基質、オートファジー制御因子、オートファゴソーム形成因子、オートファジーレセプターなどが高度に蓄積していることがわかった。蓄積しているいくつかのタンパク質について、その役割や病態との関連性などを詳細に解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは、アルツハイマーやパーキンソン病などの神経変性疾患との関連が強く示唆されており、脳内におけるオートファジーの生理機能およびその破綻による神経症状の発症機序を理解することは、基礎生物学的にも医学的にも重要である。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a degradation system within a cell. In this process, small portion of cytoplasmic components are engulfed by autophagosomes, transported to lysosomes and degraded. It has been reported that autophagy-deficient mice show phenotypes similar to neurodegenerative diseases. In order to clarify the cause, we performed MS analysis of the autophagy-deficient mouse brain and found that substrates, regulators and receptors for autophagy are highly accumulated. We focused on some of them, and we are in process of analyzing their role in autophagy and the relationship with the pathological condition in detail.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー

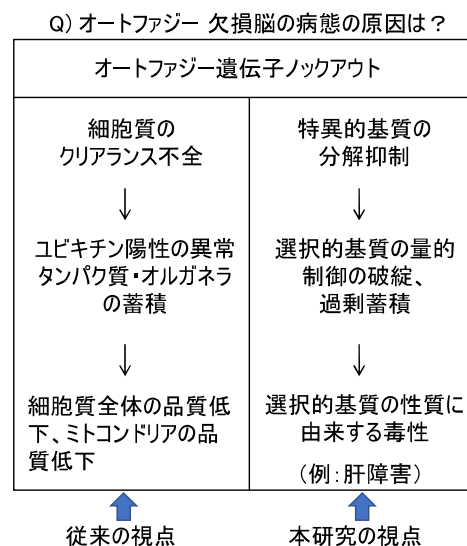
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、真核生物に普遍的に備わる細胞内分解系である。オートファジー遺伝子欠損マウスは各臓器で様々な症状を示し、特に脳および肝臓において重篤な障害を呈する。よって、オートファジーは脳・肝の恒常性維持に重要である。オートファジーは、基本的には非選択的に細胞質を分解する分解系であり、オートファジー欠損細胞ではこのバルク分解の抑制により細胞内クリアランスが低下し、ユビキチン陽性の異常タンパク質が蓄積する。この細胞内タンパク質全体の品質低下が細胞機能異常を引き起こすと考えられている。一方で、オートファジーは一部のタンパク質を選択的に分解することも知られており、オートファジー欠損細胞ではこの選択的分解基質が過剰に蓄積する。肝臓では、前者の非選択的分解抑制による細胞質全体の品質低下よりも、後者の特定タンパク質の過剰な蓄積が病態の主な原因であることが分かっている。すなわち、肝臓では選択的基質タンパク質 p62 が過剰蓄積することで転写因子 Nrf2 の異常活性化を引き起こし、これが肝障害の主な原因となることが報告されている (Komatsu *et al*, Nat Cell Biol. 2010)。一方、脳のオートファジー欠損による症状の主な原因は未だ特定されていない。現時点では、非選択的分解抑制による細胞質全体の品質低下が原因であると考えられている。あるいは、変性ミトコンドリアの蓄積が関与しているとの報告もある。しかし、肝臓のように特定タンパク質の過剰蓄積が病態の一因である可能性は十分考えられる。肝障害の主な原因である p62 は脳ではほぼ関与しないことから、p62 以外の選択的基質が神経症状の原因であると考えられる (Komatsu *et al*, Cell 2007, Riley *et al*, JCB 2010)。これまでも、オートファジー選択的基質の探索は試みられ、主に培養細胞で行われてきたが、その生理的意義や病態との関連まで解析されているものは少ない。そこで申請者は、オートファジー欠損による神経症状の発症機序の理解には、脳における選択的基質を明らかにすることが必要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、脳特異的オートファジー欠損マウスで観察される神経変性疾患様症状の原因を明らかにするため、脳におけるオートファジーの選択的基質の同定を試みる。これまで、オートファジー遺伝子欠損マウス脳では、ユビキチン化タンパク質の蓄積とタンパク質凝集体が観察されることから、細胞質全体のクリアランス不全が神経変性の原因として考えられてきた。一方で、オートファジーの特定の選択的基質の過剰蓄積が原因である可能性はあまり検討されてない。本研究課題では、オートファジーの基質である特定タンパク質の過剰蓄積による毒性が病態の原因であるという仮説のもと、マウス脳におけるオートファジー選択的基質の同定を行う。同定したタンパク質について機能解析を行い、神経症状との関連性を調べる。最終的には、同定した基質について遺伝子組換えマウスを作製し、神経症状との因果関係を明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

オートファジーの選択的基質は、オートファゴソーム局在タンパク質である LC3 あるいは GABARAP と相互作用することで認識される。この相互作用は LIR モチーフ (LC3-interacting region) とよばれる配列 (W-x-x-L) を介する。よって、LC3 または GABARAP と結合する、LIR モチーフを持つ、オートファジー遺伝子欠損細胞において蓄積するという3つの条件を満たすタンパク質が基質候補となるため、これらの性質を持つタンパク質の同定を試みる。具体的には、野生型マウスおよびオートファジー遺伝子欠損マウスより得られた脳抽出液をトリプシンで消化後、還元ジメチル化法により安定同位体標識し、両者の混合液を質量分析により解析する。これにより、オートファジー遺伝子欠損マウス脳で蓄積するタンパク質を同定する。同定した候補因子については、オートファジー遺伝子ノックアウトマウスの組織抽出液を用いたウエスタンブロット、qPCR による mRNA レベルの確認、組織切片を用いた免疫染色を行い、選択的基質であることを確認する。また、局在などの情報や、解析ソフト iLIR (<http://repeat.biol.ucy.ac.cy/iLIR/>) により LIR モチーフの有無を調べ、配列情報の共通性などを検討する。さらに、それらの蓄積が細胞機能に影響する可能性を培養細胞レベルで検討する。最終目標としては、同定した基質の蓄積と神経症状発症の因果関係を明らかにするため、遺伝子改変マウスを作製して検証する。すなわち、トランスジェニックマウスにより選択的基質の単独過剰発現で発症するかを検証し、オートファジー遺伝子との同時欠損によりオートファジー遺伝子ノックアウトマウスの神経症状が解消されるかを調べる。これにより、オートファジー欠損による神経症状が特定タンパク質の過剰蓄積で説明できるかを検証する。

4. 研究成果

オートファジー関連遺伝子ノックアウトマウスの脳抽出液の MS 解析を行った。既知のオートファジー選択的基質である p62 や Nbr1 が同定され、実験系がうまく動いていることが確認できた。この MS 解析により、新たなオートファジー基質候補が複数同定された。そのうちの1つは既知のオートファジー受容体とアミノ酸配列が類似しており、オートファジーへの関与が強く示唆されたため、詳細解析を行なった。このタンパク質は、オートファゴソーム局在タンパク質である LC3 およびそのホモログのうち LC3C と強く結合し、LIR モチーフをもち、*Atg* 遺伝子欠損細胞で蓄積したことから、オートファジーの基質であると考えられる。また、このタンパク質をノックアウトおよびノックダウンしてもオートファジー活性には影響は見られなかったため、カノニカルなオートファジーには関与しないと考えられる。現在、このタンパク質の局在解析や過剰発現による細胞への影響などを詳細に解析中である。

また、今回の MS 解析ではオートファジーの選択的基質の同定が目的であったが、予想外にオートファジー遺伝子欠損マウス脳では、選択的基質のみならずオートファジー制御因子・オートファゴソーム形成関連因子・オートファジーレセプターなどが高度に蓄積していることがわかった。*Atg* 遺伝子欠損脳で蓄積する上位 50 個のタンパク質のうち 1/3 が既知のオートファジー関連分子であり、非常に高い効率でオートファジー関連因子の同定に成功していることが確認できた。よって、今回同定された蓄積タンパク質の中には新たなオートファジー関連因子が含まれている可能性が極めて高い。これらのタンパク質には、プロテインキナーゼ A 複合体、Rab-GAP、小胞体局在ホスホリパーゼなどがあり、オートファジー制御やオートファゴソーム形成などの過程で働いている可能性が考えられた。

これらのオートファジー関連候補因子のうち、ある既知の ER 局在タンパク質に GFP を融合させて局在観察を行ったところ、飢餓時に GFP がドット状の輝点を示し、オートファジー初期

因子である FIP200 と共局在した。このドット状の輝点は、PI3P キナーゼ阻害剤であるワルトマニン処理により形成されなくなることから、この候補因子は飢餓時に PI3P 依存的にオートファゴソーム形成部位に集積することが分かった(未発表データ)。これはオートファゴソーム形成過程の後半で働く Atg タンパク質とよく似た挙動であり、オートファゴソーム形成に関与することが強く示唆された。そのほかの候補因子についても、siRNA によるオートファジーの活性評価および局在観察によるスクリーニングを行っている。今後のこれらの分子の詳細解析を行うことで、オートファジーの分子機構理解への一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。