

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15448

研究課題名(和文)新規オートファジー実行に関わるAag4の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Aag4 in alternative autophagy

研究代表者

山口 啓史(YAMAGUCHI, Hirofumi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50644241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを分解するシステムである。我々は、新たなメカニズムによるオートファジー(新規オートファジー)を哺乳動物で見出し、この新規オートファジーを制御する分子を探索したところ、Aag4を同定した。このAag4は、新規オートファジー誘導時、trans-Golgi膜上で機能し、trans-Golgi膜からの隔離膜形成を制御していた。神経特異的Aag4欠損マウスは、神経細胞の変性・脱落、それによる行動異常を示し、新規オートファジーが、神経細胞において重要な生理的機能を有していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出芽酵母および哺乳動物細胞における新規オートファジーを制御する分子として、新規にAag4を同定することができた。このことから、新規オートファジーの分子機構の一端を理解することができた。また、新規オートファジーが神経細胞において生理的機能を有することを明らかにすることができた。神経変性疾患の病態生理解明や疾患治療に波及効果をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Alternative autophagy is an Atg5/Atg7-independent type of autophagy that contributes to various physiological events. We here identify Aag4 as a molecule essential for alternative autophagy, but little conventional autophagy. Aag4 affects to the Golgi membranes and is required for the generation of isolation membranes. The generation of neuron-specific Aag4-deficient mice showed behavioral defects, which was mainly a result of cerebellar neuronal loss. These results indicate that Aag4-mediated alternative autophagy functions to maintain neural cells via different mechanisms from conventional autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ゴルジ体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを分解するシステムであり、新陳代謝や細胞浄化などに貢献している。オートファジー機構において、Atg5やAtg7は、必要不可欠な分子であると考えられてきた。しかしながら、我々は、Atg5に依存しない新たなメカニズムによるマクロオートファジー（新規オートファジー）を発見し、隔離膜がトランス・ゴルジ由来の膜とエンドソームから形成されていることを明らかにした。

また、出芽酵母においても、Atg5やAtg7に依存しない新規オートファジーが存在し、哺乳動物細胞と同様に、トランス・ゴルジの膜から、オートファジーが形成されることを明らかにした。これらの事実から、新規オートファジーが哺乳動物細胞から出芽酵母まで保存されていることが考えられた。

さらに、出芽酵母遺伝学を用いて、この新規オートファジーが起こらない12個の変異株の単離に成功した。この1つのAag4変異株では、新規オートファジーが惹起されないことが示唆された。この出芽酵母Aag4の相同遺伝子を探索したところ、哺乳動物細胞において、相同性の高いAag4が同定された。Atg5に依存したオートファジーの関連分子の多くが、出芽酵母の遺伝学から同定された事を勘案すると、新規オートファジーを遺伝学的に解析する事により、新規オートファジーの分子機構の全体像、生理的役割を明らかにできる可能性が高い。

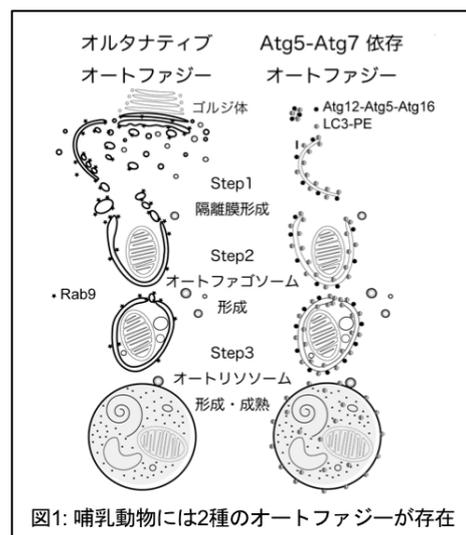


図1: 哺乳動物には2種のオートファジーが存在

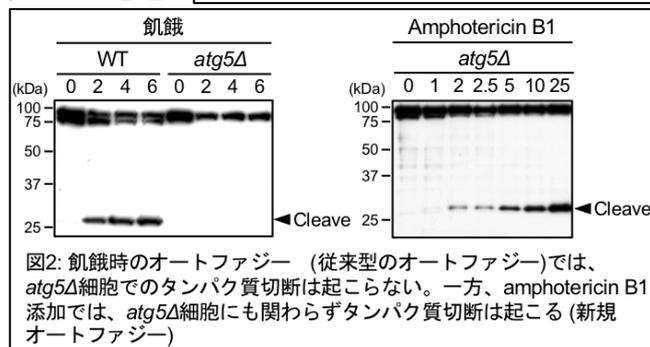


図2: 飢餓時のオートファジー（従来型のオートファジー）では、atg5Δ細胞でのタンパク質切断は起こらない。一方、amphotericin B1添加では、atg5Δ細胞にも関わらずタンパク質切断は起こる（新規オートファジー）

2. 研究の目的

(1) 出芽酵母におけるAag4の機能解析を行う。また、(2) 哺乳動物におけるAag4の機能解析を行う。さらに、(3) Aag4欠損マウスを作製し、新規オートファジーの生体内での役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母における新規オートファジー実行に関わるAag4の機能解析

出芽酵母Atg5欠損株を親株に、Atg5/Aag4二重欠損株を作製し、新規オートファジーを惹起させ、位相差顕微鏡観察およびタンパク質分解アッセイを行い、新規オートファジーの多寡を検討した。さらに、新規オートファジー誘導後、電子顕微鏡観察を用い、微細構造観察を行った。また、野生型を親株に、Aag4欠損株を作製し、従来のオートファジーを惹起させ、位相差顕微鏡およびタンパク質分解アッセイを行い、従来のオートファジーの多寡も検討した。

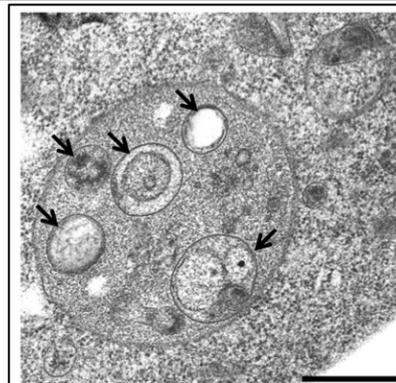


図3: 新規オートファジーの形態
amphotericin B1を添加すると、atg5Δ細胞においても、液胞内のオートファゴソームが観察される（液胞内プロテアーゼは欠損させている）

(2) 哺乳動物における新規オートファジー実行に関わるAag4の機能解析

Atg5欠損マウス由来の線維芽細胞 (Atg5 KO MEF) に対して、CRISPRを用いてAag4遺伝子を破壊し、Atg5/Aag4の2重欠損MEF細胞 (Atg5/Aag4 DKO MEF) を作製した。autophagosome マーカーであるkikume、autolysosome マーカーであるmRFP-GFPのイメージングおよび細胞質タンパク質分解アッセイをおこない、このAtg5/Aag4 DKO MEFにおける新規オートファジーの多寡を検討した。また、新規オートファジー誘導後のAag4の細胞内局在変化の検討、電子顕微鏡を用いた微細構造観察を行った。さらに、Aag4の従来のオートファジーへの関与を明らかにするため、野生型のMEFに対して、CRISPRを用いてAag4遺伝子を破壊し、Aag4欠損MEF細胞 (Aag4 KO MEF) を作製した。この細胞に対して、飢餓刺激を行い、LC3の変化、局在について検討することで、従来のオートファジーの多寡を検討した。

(3) Aag4の組織特異性と生理的機能の解析

神経特異的Aag4欠損マウスを作製し、Aag4が実行する新規オートファジーの生体内での役割を明らかにするため、行動解析、免疫染色、電子顕微鏡を用いた微細構造観察を行った。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母における新規オートファジー実行に関わる Aag4 の機能解析

出芽酵母 *Atg5* 欠損株を親株に、*Atg5/Aag4* 二重欠損株を作製した。出芽酵母における新規オートファジー誘導剤である amphotericin B1 を添加し、位相差顕微鏡観察およびタンパク質分解アッセイを行い、新規オートファジーの多寡を検討した。その結果、出芽酵母 *Aag4* を欠損することで、新規オートファジーが抑制されていることが明らかになった。さらに、この細胞に対して、電子顕微鏡を用いた微細構造解析を行ったところ、新規オートファジーの素過程の trans-Golgi 膜からの隔離膜形成が阻害されていることが明らかになった。

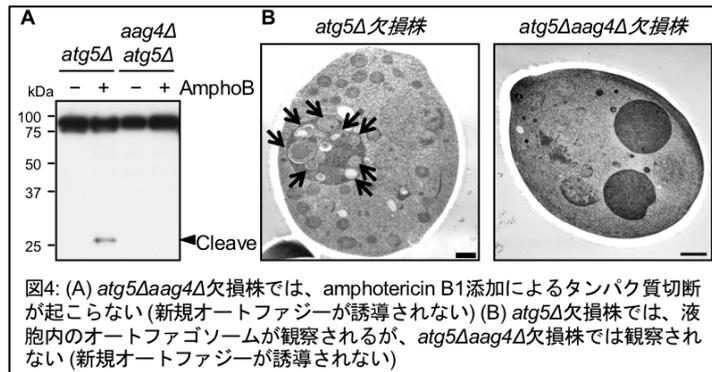


図4: (A) *atg5Δaag4Δ*欠損株では、amphotericin B1添加によるタンパク質切断が起こらない(新規オートファジーが誘導されない)(B) *atg5Δ*欠損株では、液胞内のオートファゴソームが観察されるが、*atg5Δaag4Δ*欠損株では観察されない(新規オートファジーが誘導されない)

一方、従来のオートファジーへの *Aag4* の関与を明らかにするため、出芽酵母野生株に対して、*Aag4* 欠損株を作製し、飢餓による従来のオートファジーの惹起について、タンパク質分解アッセイを用いて検討した。その結果、*Aag4* 欠損による顕著な抑制は検出されなかった。

以上の結果から、*Aag4* は従来のオートファジーと比較して新規オートファジーに大きく関与していることが示唆された。

(2) 哺乳動物における新規オートファジー実行に関わる Aag4 の機能解析

Atg5 KO MEF に対して、CRISPR を用いて、*Atg5/Aag4* DKO MEF を作製した。この細胞に対し、哺乳動物細胞における新規オートファジーの誘導剤である etoposide を添加し、autophagosome マーカーである kikume、autolysosome マーカーである mRFP-GFP の多寡の検討および細胞質タンパク質分解アッセイを行った。その結果、*Atg5/Aag4* DKO MEF では、autophagosome 形成および autolysosome 形成が抑制され、細胞質タンパク質分解も抑制されていることが示唆された。

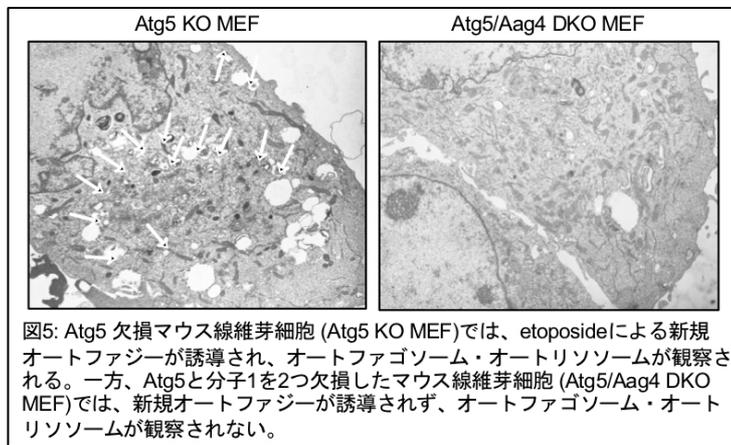


図5: *Atg5* 欠損マウス線維芽細胞 (*Atg5* KO MEF) では、etoposide による新規オートファジーが誘導され、オートファゴソーム・オートリソソームが観察される。一方、*Atg5* と分子1を2つ欠損したマウス線維芽細胞 (*Atg5/Aag4* DKO MEF) では、新規オートファジーが誘導されず、オートファゴソーム・オートリソソームが観察されない。

この結果から、*Aag4* が autophagosome 形成の上流で機能している可能性が示唆された。また、新規オートファジー誘導時の *Aag4* の細胞内局在を検討したところ、通常培養時には、*Aag4* は細胞質に局在するが、誘導時には、隔離膜形成の場である trans-Golgi 膜上に局在ようになることが明らかになった。さらに、電子顕微鏡を用いて微細構造観察を行ったところ、*Atg5/Aag4* DKO MEF では、trans-Golgi 膜からの隔離膜形成に異常が生じていることが明らかになった。

一方、従来のオートファジーへの *Aag4* の関与を明らかにするため、*Aag4* KO MEF を作製し、飢餓による従来のオートファジーの惹起を抗 LC3 ウェスタブロットティング、LC3 のイメージングを用いて検討した。その結果、*Aag4* 欠損による顕著な抑制は検出されなかった。

以上の結果から、出芽酵母と同様に *Aag4* は従来のオートファジーと比較して新規オートファジーに大きく関与していることが示唆され、新規オートファジー誘導時に *Aag4* が trans-Golgi 膜に局在・機能することで、新規オートファジーを制御していることが示唆された。

(3) *Aag4* の組織特異性と生理的機能の解析

神経特異的 *Aag4* 欠損マウスを作製し、解析を行ったところ、神経細胞のゴルジ体に余剰なタンパク質が蓄積し、神経細胞の変性・脱落が生じていることが明らかになった。また、それによる行動異常も見出した。これらの結果から、神経細胞において、重要な生理的機能を有していることが示唆された。

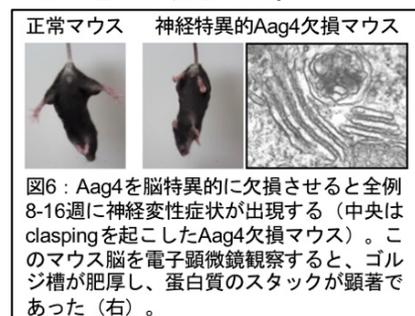


図6: *Aag4* を脳特異的に欠損させると全例 8-16週に神経変性症状が出現する(中央は claspings を起こした *Aag4* 欠損マウス)。このマウス脳を電子顕微鏡観察すると、ゴルジ槽が肥厚し、蛋白質のスタックが顕著であった(右)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Meruna Nagata, Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Satoru Torii, Hazuki Endo, Masatsune Tsujioka, Shinya Honda, Yuya Nishida, Akimitsu Konishi, Shigeomi Shimizu
Dramlregulates DNA damage-induced alternative autophagy
Cell Stress, 2(3), 55-65, 2018

- (2) Satoko Arakawa, Shinya Honda, Hirofumi Yamaguchi, Shigeomi Shimizu
Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy.
Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci., 93(6), 378-385, 2017

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 荒川聡子, 山口啓史, 清水重臣
Alternative autophagy pathways conserved from yeast to mammals
第 13 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム, 福岡, 2018. 10. 18-19
- (2) 荒川聡子, 山口啓史, 清水重臣
ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見
第 91 回日本生化学会大会, 京都, 2018. 9. 24-26
- (3) 荒川聡子, 山口啓史, 清水重臣
ゴルジ体ストレスに関わる応答ゾーンの解析
第 1 回新学術領域「オルガネラ・ゾーン」全体班会議, 湘南国際村センター, 2018. 6. 27-28
- (4) 荒川聡子, 山口啓史, 清水重臣
ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017. 12. 6-9
- (5) 山口啓史, 荒川聡子, 金関恵, 清水重臣
新規オートファジーを制御する AAG3 の機能解析
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017. 12. 6-12. 9
- (6) 荒川聡子, 山口啓史, 金関恵, 清水重臣
Induction of Atg5-independent alternative macroautophagy by a disturbance of anterograde trafficking from the Golgi.
The 8th International Symposium on Autophagy, 奈良, 2017. 5. 29-6. 1
- (7) 荒川聡子, 山口啓史, 清水重臣
Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals
The 8th International Symposium on Autophagy, 奈良, 2017. 5. 29-6. 1
- (8) 山口啓史, 荒川聡子, 金関恵, 清水重臣
ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析
免疫学・病態生化学領域合同シンポジウム, 東京, 2017. 3. 8
- (9) 山口啓史, 荒川聡子, 金関恵, 清水重臣
ゴルジ膜を用いたタンパク質分解機構の解析
細胞競合・ダイニングコード合同若手ワークショップ, 大阪, 2017. 1. 17-1. 19 (口頭発表)

[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

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/research-content.html>

※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。