

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06488

研究課題名(和文) 核酸導入に関わる選択的オートファジー複合体の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of selective autophagy complexes in nucleic acid transfection

研究代表者

土屋 恵 (TSUCHIYA, Megumi)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00390691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外来からの異物をオートファジーによって分解し、排除する。本研究ではこの機構において重要な役割を持つオートファジーレセプターp62が、外来核酸の導入によりp62複合体を形成し、その構成因子の機能を抑制することで遺伝子導入効率が上昇することを明らかにした。また構成因子の一つであるTBK1について、複数のTBK1 inhibitorがp62の機能を抑制し有力な遺伝子導入促進剤として利用できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後増加すると予測される未知のウイルス感染の予防や治療に対して、核酸ワクチンの重要性は益々高まると思われる。本研究で明らかとなった細胞内侵入直後におこる外来核酸周囲のオートファジー機構の解明は、これまで詳細が不明であった遺伝子導入の仕組みについての分子レベルでの発見であり、学術的な意義のみならず社会的にも注目度が高い。また本研究の成果である遺伝子導入促進剤の開発は、ゲノム編集動物やゲノム編集細胞などの基礎研究分野における遺伝子工学実験だけでなく、臨床研究の場での遺伝子改変において広く応用可能な手法となる。

研究成果の概要(英文)：Cells eliminate foreign substances through autophagy. In this study, we found that the autophagy receptor p62, which plays an important role in "xenophagy" mechanism, forms a p62 complex upon transfection of nucleic acids. The suppression of p62 complex function increased gene transfection efficiency. We also found that inhibition of TBK1, which is one of the p62 complex components, suppresses the function of the p62 complex and can be used as potent gene delivery enhancers.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子導入 オートファジーレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルス、大気中の微小粒子状有害物質など様々な外来因子の侵入に対し、細胞はそれら外来因子を異物としてとらえ排除する xenophagy と呼ばれる選択的オートファジー機構を持つ。この細胞質での防御機構は核酸導入時にも活性化され、導入された核酸の多くが機能するまえに排除されてしまう。異物の侵入と同様に、核酸などの外来因子が細胞質に取り込まれた際も短時間のうちに選択的オートファジーを受ける(文献1)。細胞工学において遺伝子の導入は必須であり、導入の効率は基礎研究だけでなく臨床応用のための iPS 細胞の作製、分化誘導の効率に影響するが、実際には導入した核酸の多くが核へ到達するまえに失われてしまっていると予想される。核酸の侵入時にオートファジーレセプター p62 の核酸周囲への集結が見られることから(文献2) p62 及びこの時に形成される p62 複合体の機能が異物の排除機構に極めて重要な因子であると予想された。

2. 研究の目的

外来核酸のオートファジーによる分解に重要な役割を持つオートファジーレセプターp62 に着目し、核酸導入により形成される p62 複合体の解析を行う。同定された個々の構成因子について、p62 複合体の選択的オートファジー作用の分子メカニズムを明らかにする。さらに p62 を中心とした異物排除機構を特異的に抑制し、遺伝子導入効率を促進させることのできる化合物を探索する。様々な核酸の導入に対して広い範囲での応用が期待できる、新たな遺伝子導入法を構築する。

3. 研究の方法

(1) p62 の形成するタンパク複合体が遺伝子導入効率を左右する分子基盤であると考え、その複合体の解析を試みた。始めに p62 依存的な遺伝子導入の抑制が遺伝子導入方法によって異なるかを確認するため、代表的な遺伝子導入法であるリポフェクションとエレクトロポレーションとの比較を行った。

(2) 上記の結果を踏まえ、遺伝子導入処理により特異的に形成される p62 タンパク複合体を効率的に捉えるため、エンドサイトーシス直後の p62 および周辺の細胞内因子の翻訳後修飾などの変化を観察した。

(3) p62 複合体の機能を抑制し遺伝子導入効率を上げる化合物を探索するためのハイスループットスクリーニングを行うため、遺伝子導入効率の定量化が可能な細胞アッセイ系を構築した。大阪大学の所有する低分子化合物ライブラリーから約 4000 化合物のハイスループットアッセイを行った。

(4) 核酸導入直後におこるエンドサイトーシスにより p62 のリン酸化が急激に誘導されることから、p62 のキナーゼである TBK1 の機能に着目した。TBK1 およびその関連因子が p62 複合体の重要な構成因子であることが予想されたため、それらの因子の機能を明らかにするために TBK1 ノックアウト MEF 細胞を樹立した。

(5) 上記の TBK1 ノックアウト MEF 細胞で明らかな遺伝子導入効率の上昇が確認できたことから、TBK1 阻害剤の中から有力な遺伝子導入補助薬として使用できる化合物を探索するため、前年度に構築したスクリーニング系を用い化合物のスクリーニングを施行した。またルシフェラーゼレポーターベクターをゲノムに挿入した安定細胞株(MEF-Luc)を樹立し、化合物の2次スクリーニングに使用した。

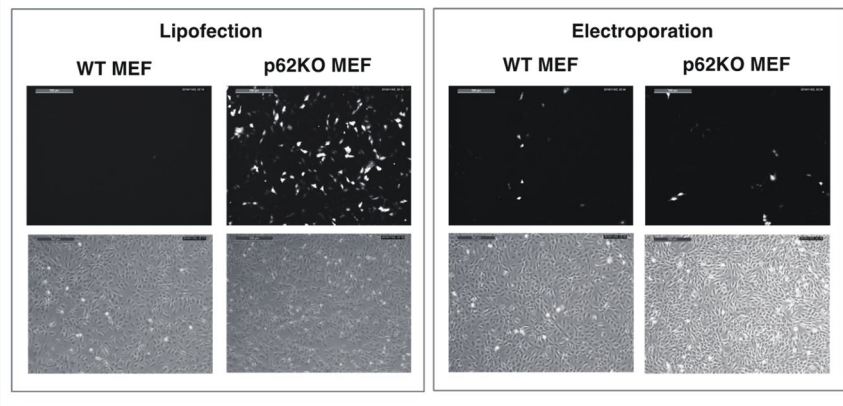
(6) 同定された化合物の p62 複合体に及ぼす作用と遺伝子導入効果を明らかにし、新規の核酸導入試薬としての活用の検討を行った。前年度のスクリーニングにおいて遺伝子導入効率にほとんど影響しない化合物については、複数の組み合わせでの化合物スクリーニングを試みた。

4. 研究成果

(1) p62 依存的な遺伝子導入の抑制が遺伝子導入方法によって異なるかを確認するため、リポフェクションとエレクトロポレーションによる遺伝子導入とを比較した。野生型 MEF 細胞では、リポフェクションとエレクトロポレーションとでは DNA の導入効率はやや差がみられる程度であった。一方 p62 欠損 MEF 細胞でリポフェクションにて DNA 導入を行なった場合、野生型 MEF 細胞に比べ飛躍的に遺伝子導入効率が上昇するのに対し、エレクトロポレーションでは野生型 MEF

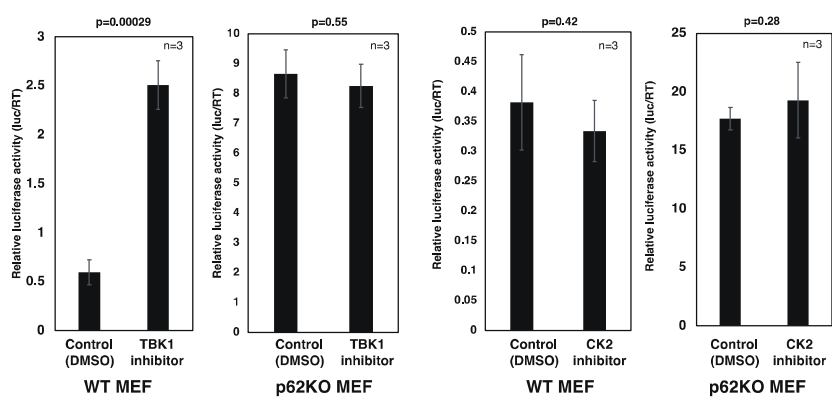
細胞とほとんど差が見られないという結果となった(図1)。この結果は p62 がエンドサイトーシスを介した遺伝子導入を特異的に抑制する作用を持つことを示し、リポフェクションによる遺伝子導入処理により特異的に形成される p62 タンパク複合体を捉えるには、エンドサイトーシス直後に誘導される細胞内因子に注目する必要があることが明らかとなった。

図1. p62 contributes Lipofection but not Electroporation



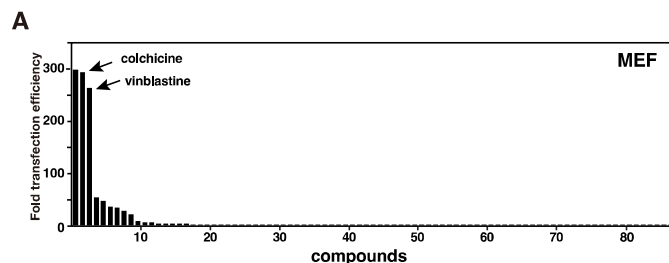
(2) 上記の結果をもとにエンドサイトーシス直後の p62 および周辺の細胞内因子の変化を検討したところ、遺伝子導入直後から細胞内オートファジーの活性化と共に p62 のリン酸化が急激に誘導されることが確認された。この結果から p62 のリン酸化を誘導する因子がエンドサイトーシス直後に大きく動くことが予測されたため、まずそのキナーゼである CK2 および TBK1 に注目した。それぞれの阻害剤の遺伝子導入に対する効果を確認したところ、CK2 阻害剤ではほとんど効果が見られなかったものの、TBK1 阻害剤では顕著な遺伝子導入効率の促進効果が見られた(図2)。この阻害剤の効果は MEF 細胞だけでなく様々な細胞種で確認することができ、TBK1 とその誘導に関わる細胞内因子が p62 タンパク複合体形成に関与することが明らかとなった。

図2. TBK1 inhibitor increased gene transfection efficiency



(3) p62 複合体に作用する低分子化合物の探索のため、遺伝子導入効率を定量化するアッセイ系の構築を行った。遺伝子導入効率の低い野生型 MEF 細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーターベクターを遺伝子導入し、ルシフェラーゼタンパクの発現量を定量するアッセイ系を 384well のサイズまでスケールダウンを行い、ハイスループットスクリーニングで定量的にアッセイできる系を確立した。構築したアッセイ系を用い、低分子化合物ライブラリーからランダムに選択した約 4000 化合物に対してハイスループットスクリーニングを行った。野生型 MEF 細胞と p62 欠損 MEF 細胞との結果の比較により、p62 複合体の機能への作用が明らかかな低分子化合物がいくつか同定された(図3A)。著しく導入効率を促進した化合物に対しては、それぞれの遺伝子導入効果に対する至適濃度の確認を行った。このランダムなスクリーニングにより、複数のチューブリン阻害剤が遺伝子導入効率促進に影響を与えることがわかり、導入された核酸がオートファジーにより排除される過程でこれらの化合物がオートファゴゾームの形成を抑制している可能性が示唆された(図3B)。

図3. Microtubule inhibitors enhance gene transfection efficiency



B

No	chemical name	target	function	PubChem CID
1	PODOFLOX	microtubule	antineoplastic, antimitotic agent	10607
2	COLCHICINE	microtubule	antimitotic, antigout agent	6167
3	VINBLASTINE SULFATE	microtubule	antineoplastic, spindle poison	241902
4	DEOXYSPAPPANONE B 7,4'-DMETHYL ETHER	microtubule		4026888
5	VINCISTINE SULFATE	microtubule	antineoplastic	249332
6	PIROPODOPHYLLIN ACETATE	microtubule / IGF-1R	antineoplastic	233299
7	DOCETAXEL	microtubule	antineoplastic	148124
8	FENBENDAZOLE	microtubule	anthelmintic, antinematodal drug	3334
9	FLUBENDAZOLE	microtubule	anthelmintic, antinematodal drug	35802

(4) TBK1 の抑制により p62 S405 のリン酸化が抑えられることから、TBK1 およびその関連因子が p62 複合体の重要なコンポーネントであると予想されたため、それらの因子の機能を同定するために野生型 MEF 細胞に含まれる TBK1 をゲノム編成にてノックアウトを行い、TBK1 ノックアウト MEF 細胞を樹立した。この細胞を用いて遺伝子導入効率を確認したところ、野生型 MEF 細胞に比べ明らかな遺伝子導入効率の上昇が認められた(データ未発表)。この結果から、TBK1 が p62 を介した遺伝子導入の制御に強く関わっていることが明らかとなった。

(5)上記の結果より TBK1 阻害剤が有力な遺伝子導入促進剤として使用できる可能性が予想されたことから、すでに市販されている抑制剤に加え、それらと類似構造を持つ化合物を合わせて約 80 種類選択し、これまでの化合物スクリーニングと同様の方法で、細胞添加剤としてより効果が高いものを指標に化合物のスクリーニングを行なった(データ未発表)。さらにルシフェラーゼレポーターベクターをゲノムに組み込んだ MEF 細胞の樹立を行い、スクリーニングで得られた化合物が遺伝子導入に対して特異的に作用することが確認された。

(6)上記のスクリーニングにおいて、TBK1 阻害剤として分類されている薬剤の中には p62 S405 のリン酸化にほとんど影響しないものもあることがわかった。そこで効果のある化合物に類似構造を持つ化合物のスクリーニングを行ったところ、単独で遺伝子導入に強く影響する化合物だけでなく、複数の化合物を組み合わせて作用させた場合に相乗効果をもたらすものが同定され、新たな遺伝子導入促進剤としての可能性が見出された。

【引用文献】

1. [Tsuchiya M](#), Ogawa H, Koujin T, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, and Haraguchi T
Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells
FEBS letter 590(16):2671-80, 2016
2. [Tsuchiya M](#), Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T
p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy
FEBS Open Bio. Feb 7;8(3):470-480, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuchiya M, Ogawa H, Watanabe K, Koujin T, Mori C, Nunomura K, Lin B, Tani A, Hiraoka Y, Haraguchi T	4. 巻 26
2. 論文標題 Microtubule inhibitors identified through non-biased screening enhance DNA transfection efficiency by delaying p62-dependent ubiquitin recruitment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 739-751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12881	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 Fujita T, Kubo S, Shioda T, Tokumura A, Minami S, Tsuchiya M, Ogawa H, Hamasaki M, Yu L, Isaka Y, Yoshimori T, and Nakamura S	4. 巻 134
2. 論文標題 THOC4 regulates energy homeostasis by stabilizing TFEB mRNA during prolonged starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 248203-248203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.248203	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 Ihara K, Sasano T, Hiraoka Y, Togo-Ohno M, Soejima Y, Sawabe M, Tsuchiya M, Ogawa H, Furukawa T, Kuroyanagi H	4. 巻 10
2. 論文標題 A missense mutation in the RSRSP stretch of Rbm20 causes dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74800-8	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 Teeli Aamir S., Leszczynski Pawel, Krishnaswamy Narayanan, Ogawa Hidesato, Tsuchiya Megumi, Smiech Magdalena, Skarzynski Dariusz, Taniguchi Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Possible Mechanisms for Maintenance and Regression of Corpus Luteum Through the Ubiquitin-Proteasome and Autophagy System Regulated by Transcriptional Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 748-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2019.00748	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 英知、土屋 恵、渡邊 賢人、荒神 尚子、森 知栄、布村 一人、林 邦忠、谷 昭義、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 選択的オートファジー制御を介した遺伝子導入促進剤のスクリーニング
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Kento Watanabe, Takako Koujin, Chie Mori, Kazuto Nunomura, Bangzhong Lin, Akiyoshi Tani, Yasushi Hiraoka, and Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 High-Throughput Screening for the enhancement of transfection efficiency via selective autophagy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川英知、土屋恵、渡邊賢人、荒神尚子、小林昇平、森知栄、平岡泰、原口徳子
2. 発表標題 選択的オートファジー機構を介した細胞自己防衛機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nodoka Yanagi, Hidesato Ogawa, Yuika Morita, Megumi Tsuchiya, Tetsuya Asano, Manabu Shirai, Robert J. Schwartz, Ken-ichirou Morohashi, Tetsushi Furukawa, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Jun Takeuchi
2. 発表標題 A novel chromatin remodeling factor, Arip4 controls the cardiac chamber development via regulation of Notch signaling
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 2種類のTBK1/IKKe阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/000080	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 2種類のTBK1/IKKe阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-000088	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 2種類のTBK1/IKKe阻害剤を利用した核酸導入	発明者 小川英知, 土屋恵, 渡邊賢人, 平岡泰, 原口徳子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願第2020-000088	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学生命機能研究科細胞核ダイナミクス研究室ホームページ https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.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		
ポーランド	Instit of the Polish Academy of Sciences		