

審査の結果の要旨

氏名 栗川 義峻

本研究は、オートファジーの選択的基質のうち個体臓器でオートファジーによって分解されていると考えられるタンパク質を同定することを目的としている。オートファジー関連遺伝子 *Atg5* を脳特異的にノックアウトしたマウス (*Atg5^{lox/lox}·nestin-Cre*) を用いて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MS/MS)による網羅的な相対定量を行い、オートファジー不全脳にて蓄積しているタンパク質の中から新規の基質候補タンパク質の同定を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. コントロールマウス (*Atg5^{lox/lox}·nestin-Cre*) およびノックアウトマウスの脳を 3 つずつ用意し、大脳と小脳に分割して LC-MS/MS による網羅的な相対定量を行った結果、それぞれ 5128 個、5316 個のタンパク質が同定された。さらに、それらのうち 3859 個、3862 個のタンパク質に対して相対定量値が算出された。
2. 相対定量値を用いた階層的クラスタリングによって、遺伝子型ごとにクラスターが形成され、相対定量値の測定結果の妥当性が示された。
3. 大脳と小脳で共通して、*Atg5* ノックアウトによってタンパク質量が 2 倍以上に増加し、かつ *p* 値が 0.05 未満のタンパク質を抽出した。その結果、6 つのタンパク質が基質候補としてまず同定された。これら 6 つのタンパク質の中から、細胞質中に存在するもののうち既知の選択的基質を除外した結果、PKA-RI α 、PKA-C α 、PKA-C β が新規のオートファジー選択的基質として挙げられた。
4. オートファジーによる選択的基質にはオートファゴソーム上に局在するタンパク質である LC3 との相互作用領域 LC3 Interacting Region (LIR モチーフ) を有するため、LIR モチーフ検索サイト hfAIM を用いてアミノ酸配列から予測を行ったところ、PKA-RI α に LIR モチーフの存在が予測された。このことから PKA 複合体が PKA-RI α と LC3 の相互作用を介してオートファジーによる分解を受けている可能性が示唆された。
5. 大脳及び小脳の抽出液中における PKA-RI α および PKA-C α のタンパク質量をウェスタンブロットにて確認したところ、ノックアウトマウスの脳でこれらのタンパク質量が増加していた。大脳及び小脳の抽出液中における PKA-RI α および PKA-C α の mRNA 量を RT-qPCR にて確認したところ、PKA-C α の mRNA 量は *Atg5* ノックアウトによる発現量の変化がなかったが、PKA-RI α では増加傾向にあった。このことはオートファジー不全脳において PKA-C α の分解抑制の結果タンパク質量の増加が生じたと考えられ

た。また PKA-R1 α に関してはタンパク質量の増加は mRNA 量の増加よりも増加率が高く、転写量の増加では説明できないことから、主に分解抑制によってタンパク質量が増加した可能性が示唆された。

6. 脳における PKA タンパク質量の増加が脳特異的な現象かどうか検証するため、Atg5 欠損臓器を用いて同様の解析を行った。Atg5 の全身ノックアウトマウスに NSE プロモーター下で Atg5 を発現させた、神経細胞特異的 Atg5 レスキューマウスの全身臓器の抽出液を用いて、PKA-R1 α および PKA-C α のタンパク質量および mRNA 量をそれぞれウェスタンブロットと RT-qPCR にて確認した。その結果、胸腺と精巣以外の全ての臓器で Atg5 欠損による PKA-R1 α および PKA-C α のタンパク質量の増加がみられたのに対し、mRNA 量が増加した臓器はなかった。従ってオートファジー不全による PKA タンパク質量の増加は分解抑制の結果であると考えられた。
7. PKA-R1 α と LC3 との相互作用を免疫沈降実験によって確認した。HEK293T 細胞に Myc タグを付加した PKA-R1 α と FLAG タグを付加した LC3 を一過性に共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降したところ、Myc- PKA-R1 α のバンドが検出された。また LC3 に LIR モチーフとの相互作用領域に変異を導入したところ、Myc-PKA-R1 α のバンドは検出されなかった。このことから PKA-R1 α が LIR モチーフを介して LC3 と相互作用することが示唆された。
8. PKA-R1 α および PKA-C α の細胞内局在を観察した。mRuby を付加した LC3 を安定発現させた MEF に対し、GFP を付加した PKA-R1 α ないし PKA-C α を一過性に発現させ、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果飢餓条件下で増加する LC3 のドットと PKA-R1 α ないし PKA-C α のシグナルの共局在がみられた。このことは隔離膜にさらに飢餓条件下でリソソーム阻害剤である bafilomycin A₁ を加えてより増加した LC3 のシグナルと PKA-R1 α ないし PKA-C α のシグナルが共局在した。またこの時 PKA-R1 α ないし PKA-C α とリソソームマーカーである LAMP1 との共局在も観察された。このことからオートファゴソーム中に含まれた PKA-R1 α ないし PKA-C α がリソソームへと運ばれことを示唆された。

以上、本論文は Atg5 を脳特異的にノックアウトしたマウスを用いて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MS/MS)による網羅的な相対定量を行い、オートファジー不全脳にて蓄積しているタンパク質の中から PKA を新規のオートファジーの選択的基質として同定することに成功した。さらに PKA は個体臓器において、オートファジーによって選択的に分解されていると考えられた。今までオートファジーの選択的基質の探索方法として LC3 との結合解析が主であったが、本研究による手法はオートファジーの選択的基質の新しい探索方法を提唱するものである。PKA 複合体の量の制御にオートファジーが関与する可能性が示唆され、オートファジーの生理的意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。