

審査の結果の要旨

氏名 千野 遥

本研究は哺乳類の選択的オートファジーの新規選択的基質を同定するため、LC3Bの基質認識部位特異的に結合するタンパク質を網羅的に同定し、基質認識部位の変異体と野生型LC3Bの結合差分解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. LC3B野生型と基質認識部位変異体を作製し、その結合タンパク質を網羅的に解析し両者の結合差分解析をおこなったところ、新規の選択的基質 **TEX264** を同定した。
2. **TEX264** は精巢に発現するタンパク質として同定されたが、機能未知のタンパク質であった。アミノ酸配列より N 末端に膜貫通領域を C 末端には脊椎動物以降の種間で高度の保存され LC3 結合部位 (**LIR:LC3 interacting region**) に特徴的な配列を有していることが分かった。
3. **TEX264** の LC3 との結合の解析を免疫沈降法を用いて行ったところ、**TEX264** は C 末端の LIR を介して LC3 と結合していることが分かった。
4. **TEX264** の細胞内局在をみるため、蛍光顕微鏡にて観察したところ **TEX264** が小胞体タンパク質であることが分かった。また、オートファジー誘導条件である飢餓時には **TEX264** はパンクタ様構造を形成しオートファゴソームマーカーの LC3 と共局在することが分かった。一方で、**TEX264** の LIR をアラニンに置換して変異体ではパンクタ様構造は認めなかった。このことから、**TEX264** が小胞体膜タンパク質で LIR を介してオートファゴソーム上に集積することが分かった。
5. 野生型細胞とオートファジー欠損細胞におけるオートファジー誘導条件である飢餓時の **TEX264** の発現量を Western Blot にて解析し、**TEX264** が飢餓時に減少し、この減少がリソソーム阻害薬存在下で見えなくなること、オートファジー欠損細胞では **TEX264** が蓄積し野生型で見られた飢餓時の減少が見られないことが示された。このことから、**TEX264** が飢餓時にオートファジーを介してリソソームに分解されることが分かった。
6. オートファジーを全身で欠損したマウスの臓器を用いた解析で **TEX264** は全臓器で発現しており、オートファジー欠損組織において蓄積していることが示された。**TEX264** は個体内でもオートファジーによる制御を受けていることが分かった。
7. **TEX264** が小胞体膜タンパク質であったことから **TEX264** がオートファジーにおける小胞体の分解 (ER-phagy) に関与するレセプターである可能性が考えられた。ER-phagy 活性の定量的な評価のため新規のレポーター RFP-GFP-KDEL を作製した。新規レポーター

の RFP cleavage rate やリソソーム内の RFP の signal を測定すると野生型細胞で ER-phagy 活性条件の飢餓時に増加し、オートファジー欠損細胞では消失した。このことから新規のレポーターを用いることで ER-phagy の活性を評価することができた。

8. 新規レポーター発現細胞に CRISPR-Cas9 システムを用いて TEX264 をノックアウトすると ER-phagy 活性が有意に抑制された。TEX264 は新規の ER-phagy レセプターであることが示された。

9. 既知の ER-phagy レセプターとの機能的な関係を検証するために、飢餓時の分解やマウスを用いた全臓器解析、レポーターを用いた機能活性の評価を行い、TEX264 が飢餓時に分解され、全臓器で発現し、更に細胞内でも主要な機能を担うレセプターであることが分かった。

10. ER-phagy において小胞体はオートファゴソームに繫留されるがこの時に処方体膜とオートファゴソーム膜の間にはリボソームが並ぶことが分かっていた。2つの膜を繫留するレセプターはリボソームの大きさよりも大きい必要がある。TEX264 のもつ長い天然変性領域がこの大きさや Flexibility に必要であると考えられたため、TEX264 の天然変性領域を削った変異体と他のタンパク質の天然変性領域を導入した変異体を作製し、局在解析と機能解析を行った。TEX264 の長い天然変性領域はアミノ酸配列によらずオートファゴソーム局在と ER-phagy レセプター機能に必須であることが分かった。

以上、本論文は選択的オートファジーの新規基質を同定するための LC3 結合差分析から新規の ER-phagy レセプターである TEX264 を同定した。TEX264 は LC3 ホモログと強く結合し、全臓器で発現する主要なレセプターであった。また、TEX264 の持つ長い天然変性領域は TEX264 がオートファゴソームに繫留するのに必要であり、レセプター機能にも重要であることが分かった。本研究は選択的オートファジーとくに ER-phagy 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。