

論文の内容の要旨

論文題目 Investigation of compensatory autophagy and T cell senescence during proteasome dysfunction
(プロテアソーム機能低下に伴う代償的オートファジー及びT細胞老化に関する研究)

氏名 荒田 義之

プロテアソームは細胞内タンパク質分解を介して様々な生命現象に関与している。そのため、プロテアソーム機能の低下は、生体に広範な異常を来し、近年では特に老化との関連が注目されている。したがって、プロテアソーム機能低下時に生体がどのように応答をし、細胞・個体老化に至るのかの理解は、老化あるいは加齢に伴い発症率の上昇する自己免疫疾患等の予防や治療にむけて重要になりうる。本研究ではプロテアソーム機能低下時に起こる生命現象について、1) プロテアソーム機能低下に応じて代償的に誘導されるオートファジー活性化機構 2) T細胞老化に伴うプロテアソーム機能低下に着目して研究を行なった。

1. プロテアソーム機能低下時の代償的オートファジー誘導機構

プロテアソームの形成シャペロン p28 と結合する因子を質量分析法により網羅的に解析したところ、プロテアソーム阻害剤処置条件下において FAM48A が結合因子の 1 つとして同定された。FAM48A は今までプロテアソームとの関連は報告されていなかったが、オートファジーを制御することが知られる因子であった。主要な細胞内タンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソームシステムとオートファジーは協調して働き、プロテアソーム機能低下時にオートファジーが代償的に誘導され、細胞の機能維持にはたらくことが知られる。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明であった。そこでFAM48A が代償的オートファジーを制御する可能性を考え解析を行った。

プロテアソーム機能低下時に誘導される代償的オートファジー誘導に FAM48A が関与するか調べるために FAM48A のノックダウンを行なった。オートファジー誘導のマーカーである LC3-II の蓄積及び LC3 のドット状構造の形成をそれぞれウエスタンブロット法及び免疫染色法で評価したところ、FAM48A のノックダウンによりプロテアソームを阻害した細胞におけるオートファジー誘導が顕著に抑制された (図 1a, b)。このことから FAM48A はプロテアソーム機能低下時に誘導される代償的オートファジーを仲介することが示唆された。

FAM48A はオートファジーに必須の因子である Atg9 と結合することが知られる。Atg9 はトランスゴルジ網あるいはエンドソームを介したメンブレントラフィックによって脂質供給を行い、オートファジー誘導働く。Atg9 とそれぞれトランスゴルジ網マーカー及びリサイクリングエンドソームのマーカーである GM130 及び Rab11 との共局在を調べたところ、プロテアソーム阻害剤処置した細胞において Atg9 と GM130 あるいは Rab11 の共局在は FAM48A ノックダウンにより顕著に減少した。このことから FAM48A はプロテアソーム機能低下時に Atg9 のメンブレントラフィックを制

御することが示唆された。

以上の結果から新規に同定したプロテアソーム結合因子 FAM48A がプロテアソーム機能低下時に Atg9 のメンブレントラフィック制御を介してオートファジーを代償的に誘導する分子メカニズムの一端が示された。

2. T細胞老化に伴うプロテアソーム機能低下

プロテアソーム機能は老化の過程及び CD4 陽性 T 細胞依存的な免疫反応に深く関与することが知られている。しかしながら、CD4 陽性 T 細胞の老化とプロテアソーム機能の関連は未知であった。

まずプロテアソーム機能低下が CD4 陽性 T 細胞において老化を引き起こす可能性について検討した。T 細胞受容体 (TCR) 刺激した CD4 陽性 T 細胞をプロテアソーム阻害剤処置したところ、p21 発現上昇を伴った細胞増殖の低下及び細胞老化関連分泌形質 (SASP) 関連遺伝子の上昇がみられた。さらにプロテアソームの必須サブユニットの 1 つである Rpn13 を T 細胞特異的に欠損したマウスでは PD-1⁺ CD44^{High} CD4 陽性 T の増加が見られた。これらの特徴は老化 CD4 陽性 T 細胞が示す特徴と合致しており、プロテアソーム機能低下は CD4 陽性 T 細胞においても老化様の症状を促進することが示唆された。

一部の細胞腫では老化に伴いプロテアソームの量が減少することが知られており、本研究においては CD4 陽性 T 細胞におけるプロテアソームの量的制御機構を調べた。TCR 刺激した CD4 陽性 T 細胞において、すべてのプロテアソームサブユニットの遺伝子発現及びプロテアソーム活性の上昇がみられたことから、TCR 刺激依存的にプロテアソームを誘導する機構が認められた。また、阻害剤を用いた検討からこの発現誘導は TCR の下流の MEK、IKK、及びカルシニューリン依存的な経路を介することが示唆された。

CD4 陽性 T 細胞においてプロテアソーム機能が加齢に伴い減少しているか確認するためにプロテアソームサブユニット Rpn11 の C 末端に GFP を付加したノックインレポーターマウスを用いて検討を行なった。脾臓から分取した細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ定常状態では CD4 陽性 T 細胞中の Rpn11-GFP 量の加齢に応じた減少はみられなかった。一方で TCR 刺激した CD4 陽性 T 細胞を調べたところ、加齢依存的にプロテアソーム発現誘導が減弱した細胞集団の増加がみられた (図 2)。各種 CD4T 細胞のサブポピュレーションごとのプロテアソーム誘導能を調べたところ、老齢マウスで増加することが知られる PD-1⁺ CD44^{High} CD4 陽性 T 細胞において顕著にプロテアソーム誘導が減弱していた。

以上の結果からプロテアソームの発現誘導の減弱が CD4 陽性 T 細胞老化の特性の 1 つであることが示された。

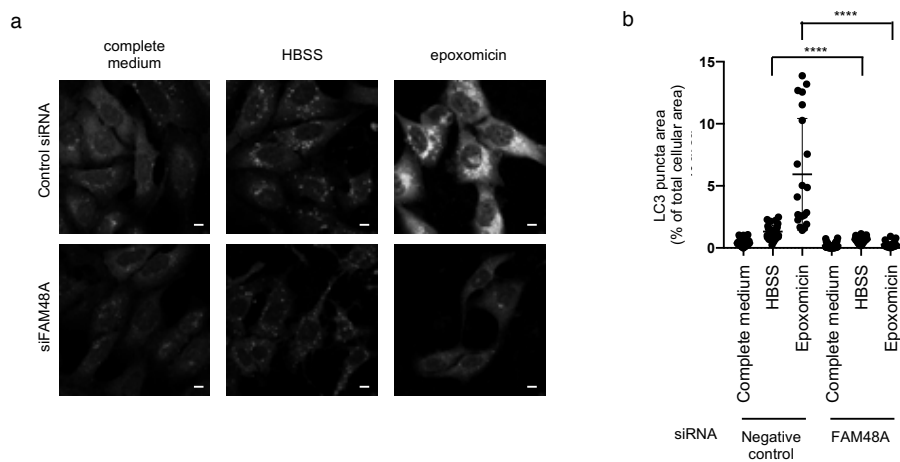
【まとめ】

本研究において主要な細胞内タンパク質分解系であるプロテアソームとオートファジーを介在

する新規因子として FAM48A を同定した。FAM48A はプロテアソーム機能阻害時に細胞内に蓄積することからプロテアソーム機能低下を感知するセンサーとしての役割をもち、Atg9 のメンブレントラフィックの制御を介して代償的オートファジー活性化に働くと考えられる。プロテアソーム機能低下時に蓄積した FAM48A が Atg9 の局在を制御する詳細な機構は未知であり、今後解明すべき課題である。

プロテアソームの発現量は細胞の種類や細胞の置かれる環境に応じて変化することが近年わかってきたが、その制御機構は未解明な部分が多い。本研究では TCR 刺激依存的にプロテアソーム発現量が増加すること、さらに加齢に伴いその発現誘導が減弱していくことが示され、T 細胞に特有のプロテアソーム発現制御機構が明らかとなった。老化 CD4 陽性 T 細胞は SASP 因子の分泌を介しマウスにおいて自己免疫疾患を引き起こすことが知られているが、本研究においてプロテアソーム機能低下は CD4 陽性 T 細胞における SASP 因子の発現亢進を引き起こすこと、及び老化 CD4 陽性 T 細胞において TCR 刺激に伴うプロテアソーム機能上昇が抑制されることが明らかになった。そのため老化 CD4 陽性 T 細胞におけるプロテアソーム誘導を抑制する機構は加齢性疾患の治療標的となることが期待される。

【図 1】



【図 2】

