

論文の内容の要旨

論文題目 マイトファジーシステムを利用した新規オートファジー関連因子の探索
 とその機能解析

氏 名 小 島 和 華

本論文は、やむを得ない事由：「博士論文の全部または一部が、単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定である」に該当するため、この要旨は一部の内容を除外して記載している。

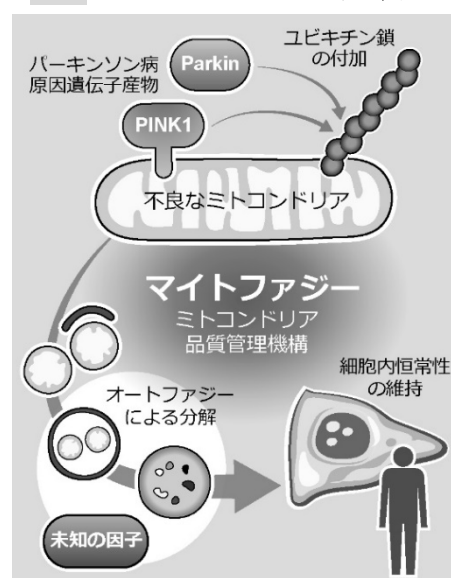
【研究の目的】

細胞には、その恒常性を維持するための多様なシステムが備わっている。異常タンパク質の凝集体や機能不全となった細胞内小器官を膜で取り囲み分解・排除する、「オートファジー」と呼ばれる機構もその一つであり、秩序立ったそのシステムは様々な因子が複雑に作用し合うことで成り立っている。これまでに酵母における遺伝学的スクリーニングにより、多くのオートファジー関連因子が同定されてきた。哺乳類の細胞においても基本的な機能因子はホモログとして保存されているが、酵母よりもより複雑な生命活動を行う哺乳類においては、未だ報告のない多くの関連因子が存在すると考えられる。そこで本研究は、「哺乳類細胞における新規オートファジー関連因子を同定すること」を目的とした。

【実験手法】

オートファジーには、アミノ酸飢餓により引き起こされるような非選択的なタイプに対し、不良なミトコンドリアを細胞から特異的に排除するミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）のような選択的なタイプが存在する。正常なミトコンドリアにおいて、マトリクスと膜間スペースの間には、内膜上の電子伝達系の働きにより電位差が作られている。ミトコンドリアで行われるエネルギー生産や、様々な生体物質の生合成を担うタンパク質の取り込みは、この膜電位に依存して行われる。膜電位を消失したミトコンドリアは、細胞の生存に不可欠なこれらの役割を果たすことができないばかりか、活性酸素種などの有害な物質を発生させるため、迅速に排除する必要がある。その時に働くシステムがマイトファジーである。マイトファジーはミトコンドリアの膜電位の消失をきっかけにして起動する。家族

図1 不良ミトコンドリアの分解機構



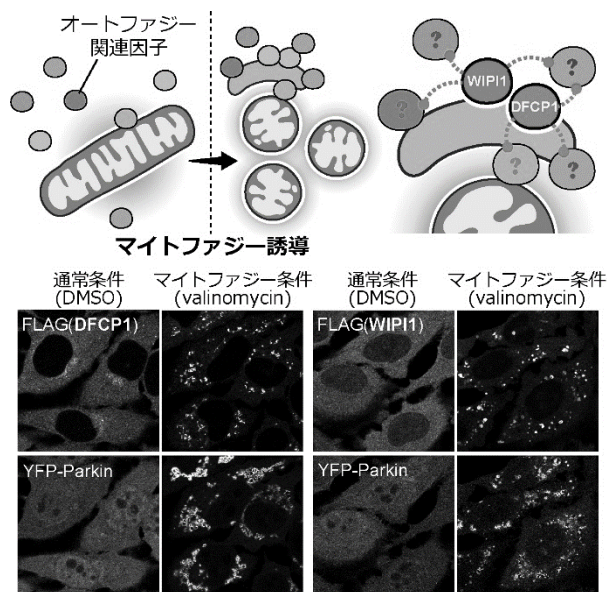
性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 (プロテインキナーゼ) と Parkin (ユビキチンリガーゼ) が主導因子となり、ポジティブフィードバック反応により不良ミトコンドリア上に大量のユビキチン鎖を付加することで選択標識を作り上げる。それを目印としてオートファジー因子群が集積し、不良ミトコンドリアは近傍に生成される脂質膜 (隔離膜) に包まれて、オートファジーシステムにより分解される [図 1]。

本研究は、このような「ミトコンドリア膜電位の消失をきっかけとして」「不良ミトコンドリア周辺で」一連のカスケードが進む、マイトファジーという環境条件が、オートファジーの新規関連因子の探索に利用できるのではないかというアイデアを発端としている。培養細胞においてミトコンドリア膜電位の消失は、バリノマイシンのような脱共役剤の培養培地への添加により、簡便に促すことができる。また、一連の反応が全て不良ミトコンドリア近傍で起こるといった空間限定性により、オートファジー関連因子の反応開始前後の局在変化は、非選択的オートファジーに比べて非常に劇的であるといえる。これらの特徴を踏まえ、本研究では「マイトファジーの誘導」をスクリーニング条件として利用した。

【結果】

1) 新規オートファジー関連因子：WIPIAP1、WIPIAP2 の同定

図 2 マイトファジー誘導時にオートファジー因子 DFACP1、WIPI1 に結合する因子を探索した

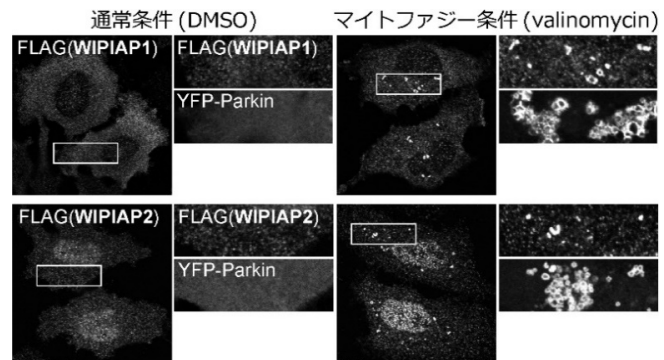


新規オートファジー関連因子のスクリーニングに用いる細胞として、FLAG-DFACP1またはFLAG-WIPI1を安定発現する HeLa 細胞株を作製した。DFACP1とWIPI1は、オートファジー開始初期からその進行に関与することが知られているオートファジー関連因子である。これら2つは、マイトファジー誘導時における損傷ミトコンドリア周辺への集積が、既知の関連因子群の中でも特に顕著であった [図 2]。マイトファジー誘導処理として脱共役剤バリノマイシンの培地添加を行い、3 時間後に細胞をパラホルムアルデヒド固定、FLAG タグ免

疫沈降したサンプルを質量分析にかけ、結合タンパク質を解析した。通常時とマイトファジー誘導時の結合量比を算出して順位付け、上位に挙げた因子群の中から機能未知なものを中心に 48 因子をピックアップした。二次スクリーニングとして、それらを一遺伝子ずつクローニングして発現プラスミドを作製し、実際にマイトファジー誘導時に損傷ミトコンドリア周辺へ蓄積するかどうかを顕微鏡観察により確認した。このスクリーニングにより、オートファジーとの関連が未報告の2つの因子を同定することができた (FLAG-WIPI1

の免疫沈降により同定されたため、今後 WIPIAP1、WIPIAP2 (WIPIAP: WIPI1-associated protein)と表記する)。通常条件において、これら2つの因子は細胞質に局在するが、マイトファジー誘導時には損傷ミトコンドリア周辺に集積し、ドットやカップ状の形をした輝点として観察された [図3]。

図3 WIPIAP1、WIPIAP2 はマイトファジー誘導時に損傷ミトコンドリア周辺に集積する

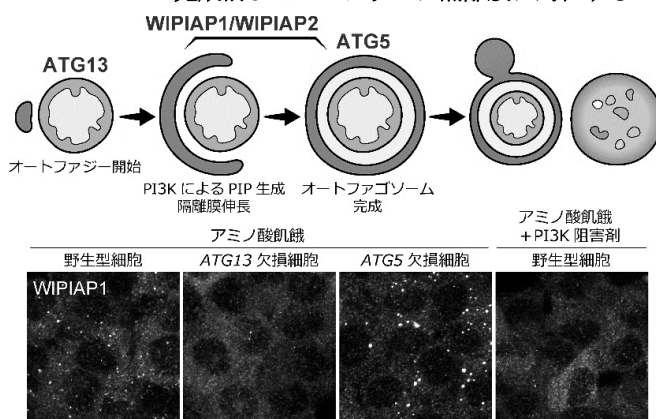


2) WIPIAP1, WIPIAP2 の関連性の検討

WIPIAP1 と WIPIAP2 は、前述のように FLAG-WIPI1 の免疫沈降によりそれぞれ独立に同定された因子であり、アミノ酸配列からは2因子間に相同性は見られない。しかし、これらを細胞内に共に発現させると、非常に高い割合で共局在した。そこで、オリゴマー形成能のあるタグを利用することにより、タンパク質間相互作用を生細胞内で蛍光観察する手法である、Fluoppi (Fluorescent based technology detecting Protein-Protein Interactions) を行ったところ、マイトファジー誘導の有無に関わらず WIPIAP1 と WIPIAP2 が相互作用していることがわかった。この相互作用は免疫沈降実験によっても確認できた。また CRISPR/Cas9 法により、内在性 WIPIAP1 または WIPIAP2 の欠損細胞株を作製し、それぞれの細胞内にタグ付きの WIPIAP2 または WIPIAP1 を発現させて挙動を観察した。内在性 WIPIAP1 の欠損下でタグ付き WIPIAP2 の、WIPIAP2 の欠損下でタグ付き WIPIAP1 の輝点形成が全く起こらなくなったことから、WIPIAP1 と WIPIAP2 の損傷ミトコンドリア周辺への蓄積は互いに依存的であることが示唆された。

3) オートファジーカスケードにおける WIPIAP 複合体の機能解析

図4 WIPIAP1 はオートファジー開始からオートファゴソーム完成前までのステップに隔離膜に局在する



マイトファジー誘導条件下において、既知のオートファジー因子と WIPIAP1 の局在を比較すると、WIPIAP1 は LC3B や ATG16 などの、オートファジーによって形成される脂質膜への局在が報告されている因子と特によく共局在した。また、同様の共局在は、マイトファジー誘導時だけでなくアミノ酸飢餓の条件においても観察された。これらの結果は、WIPIAP1 と WIPIAP2 の複合体

もまた、「選択的・非選択的に関わらず、オートファジーカスケードにおいて生成する脂質膜に局在する可能性」を示唆している。野生型細胞において観察される、アミノ酸飢餓に応答した WIPIAP1 の輝点は、オートファジーのシグナル開始初期に働く ATG13 の欠損細胞においてはほぼ消失し、また一方で、隔離膜伸長とオートファゴソームの完成に関与する ATG5 の欠損細胞で蓄積した。また、隔離膜上のホスファチジルイノシトール (PI) をリン酸化する PI3 キナーゼの阻害剤：ウォルトマニン进行处理することによっても、輝点形成は完全に阻害された[図 4]。この結果は WIPIAP 複合体が、オートファジーが開始され、隔離膜上でリン酸化 PI (PIP) が生成された後から、オートファゴソーム完成前までのステップにおいて、隔離膜へリクルートされることを示唆している。

以上のように、マイトファジー条件を利用するスクリーニングにより、2つの新規なオートファジー関連因子 WIPIAP1 と WIPIAP2 を同定した。これまでに得られた結果から、「WIPIAP1 と WIPIAP2 は通常時よりヘテロダイマーを形成する因子であり、その複合体は PIP 生成後の隔離膜上に局在化する」ことが示唆された。