博士論文（要約）

ノックアウトマウスを用いたオートファジー選択的基質の探索

栗川義峻

論文の内容の要旨

論文題目　ノックアウトを用いたオートファジー選択的基質の探索
氏名　栗川義峻

オートファジーは細胞内の大規模分解系であり、飢餓などのシグナルが入ると誘導され、一重の膜が扁平、伸長し隔離膜と呼ばれる膜構造が細胞質成分を大規模に取り囲む隔離膜が閉鎖して完成するとオートファゴソームと呼ばれる構造となる。オートファゴソームがリソソームと融合し、内膜もろとも細胞質成分がリソソーム内の酵素によって分解される。従ってオートファジーはタンパク質を非選択的かつ大規模に分解する系と言える。オートファジーはこのように非選択的な分解系であると考えられていたが、選択的にオートファジーによって分解される基質が存在することが明らかになっている。

哺乳類細胞におけるオートファジーの選択的基質は、オートファゴソームに局在するタンパク質である LC3 ファミリータンパク質（以下、LC3 と記載）に結合して隔離膜およびオートファゴソームへ運ばれることで選択性が付与されている。オートファジーの選択的基質には LC3 相互作用領域（LC3 interacting region LIR）モチーフを介して、LC3 と結合する。LIR モチーフは[W/Y/F]-X-X-[L/I/V]（X は任意のアミノ酸）という四つのアミノ酸からなる。LIR モチーフの 1 番目のアミノ酸と 4 番目のアミノ酸はそれぞれ LC3 の疎水性ポケットにはまり込むことで、選択的基質が結合する。この二つのアミノ酸もしくは LIR モチーフの四つのアミノ酸を全てアラニンなどに置換すると LC3 との結合は失われる。これまでに知られているオートファジーの選択的基質にはほぼ LIR モチーフが存在するが、一部、典型的な LIR モチーフが存在しない基質もある。

オートファジーの選択的基質は主に、酵母を用いた順遺伝学的スクリーニング、LC3 もしくはユビキチンとの結合解析、培養細胞由来の精製オートファゴソーム由来タンパク質の網羅的解析、培養細胞を用いた局在スクリーニングで同定されてきた。ところがこれらの選択的オートファジーの基質が実際に個体臓器でオートファジーによる分解を受けているかどうか、その検証は十分でない。

そこで私は、哺乳類の生体内でオートファジーによって選択的に分解されている基質の探索を行うこととした。そのためオートファジー不全臓器の定量的プロテオーム解析を行い、オートファジーが正常な個体の臓器と比較して有意にタンパク質量が増加しているものを同定し、さらにタンパク質量の増加が mRNA 量の増加によらないものを候補とすることで、オートファジーの新規選択的基質の探索を目指した。

Atg5 を脳特異的に欠損させたマウス（Atg5flox/flox:nestin-Cre）において神経変性を発症する。そこで Atg5 欠損脳を用いて新規オートファジー選択的基質の探索を試みた。

まず、Atg5 を欠損したマウスの脳のプロテオーム解析を行った。Atg5flox/+:nestin-Cre

マウスの表現型は正常であるため、これをコントロールとした。Atg5flox/flox;nestin-Cre マウス（以下、ノックアウトマウス）と Atg5flox/+;nestin-Cre マウス（以下、コントロールマウス）を 3 匹ずつ用意し、脳を大脳と小脳に分割した。　各サンプルから酵素消化によりペプチド断片を得たのち、ジメチルラベル法でペプチドを標識した。標識されたペプチドに対し、LC-MS/MS を用いて以下のように網羅的な同定および定量を行った。

今回私は大脳および小脳それぞれについて 6 サンプルずつ計 12 サンプル用意し、大出博士に測定をして頂いた。その結果、大脳では 3859 個、小脳では 3862 個であった。

次に Atg5 欠損脳においてコントロールと比べて増加しているタンパク質が基質候補分子であると考え、大脳と小脳の両方で増加しているタンパク質に着目した。

これらのタンパク質について Atg5 欠損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 未満のものを列挙すると大脳では 9 個、小脳では 27 個挙がった。さらにこれらのタンパク質のうち 6 個は大脳と小脳で共通して増加していた。

これらの 6 個のタンパク質は脳におけるオートファジーの選択的基質である可能性が高いが、この中で PRKAR1A および PRKACA そして PRKACB に着目した。これらは環状アデノシン一リン酸（cyclic-Adenosin monophosphate、cAMP）依存性プロテインキナーゼ（cAMP-dependent protein kinase A、PKA）の 1 型調節サブユニット A（PKA- RIα）と、PKA の触媒サブユニット（PKA-Cα および PKA-Cβ）である。PKA サブユニットの分解については主に二つのメカニズムが既に報告されている。一つ目は PKA-R のプロテアソームによる分解である。二つ目は PKA-C の MVB 経路を介したリソソーム分解である。しかしながら PKA 複合体タンパク質がオートファジーによって分解されるという報告はない。

質量分析装置による相対定量の結果をウェスタンブロッティング法で確かめた。その結果、大脳と小脳共に Atg5 欠損脳で PKA-RIα および PKA-Cα それぞれのタンパク質量が増加していた。

さらに大脳と小脳において PKA 両サブユニットのタンパク質量の増加が mRNA 量の増加によるかどうか検証した。大脳及び小脳から RNA を抽出し cDNA へと逆転写を行い、RT-qPCR 法を用いてそれぞれのタンパク質の mRNA 量の相対定量を行った。その結果、PKA-RIα は増加傾向、PKA-Cα は変化がなかった。PKA-RIα の mRNA 量の増加よりもタンパク質量の増加が大きく、転写量の増加ではタンパク質量の増加が説明できなかったため、PKA-RIα、PKA-Cα ともに分解抑制によってタンパク質量が増加したと考えられた。

次に Atg5 欠損脳において PKA サブユニットが増加している現象が、脳特異的であるかどうか検証した。Atg5 を全身でノックアウトすると神経細胞編成による吸啜障害から生後 24 時間以内に死亡するが、神経細胞特異的に Atg5 を発現させると吸啜障害から回復させられる。この神経細胞特異的 Atg5 レスキューマウスを用いて PKA サブユニットが脳以外の全身の臓器でも増加しているかどうか検証した。ウェスタンブロッティング法で PKA サブユニットタンパク質が Atg5 欠損臓器で増加しているかどうか検証した。その結果、PKA-RIα、PKA-Cα 共に脾臓及び精巣以外のすべての臓器で増加していた。つまり Atg5

欠損臓器では PKA の両サブユニットが増加していると考えられる。

さらにこれらの臓器において PKA 両サブユニットのタンパク質量の増加が mRNA 量の増加によるかどうか検証した。神経細胞特異的 Atg5 レスキューマウスの全身臓器から RNA を抽出し cDNA へと逆転写を行い、RT-qPCR 法を用いてそれぞれのタンパク質の mRNA 量の相対定量を行った。その結果、胃以外の全ての臓器で PKA-RIα、PKA-Cα のどちらのタンパク質の mRNA 量も増加していなかった。

PKA-RIα は hfAIM による LIR モチーフ予測で LC3 と結合することが予測されたため、Myc タグを付加した PKA-RIα と FLAG タグを付加した LC3 を共発現させて免疫沈降実験を行った結果、PKA-RIα が LC3 ファミリータンパク質である MAP1-LC3B および GABARAP と結合した。さらに変異体を用いた実験からこれらは LIR モチーフ依存的であることが判明した。また、PKA-Cα が共免疫沈降されているかどうか検証したところ、GABARAP を発現させた細胞では PKA-Cα が検出され、共免疫沈降されていることが示唆された。

最後に PKA サブユニットがオートファゴソームおよびリソソームに局在するかどうか検証した。GFP を付加した PKA-RIα および PKA-Cα の両方とも LC3 およびリソソームマーカータンパク質である LAMP1 と共局在したため、PKA がリソソームへと運ばれうると考えられた。

今回、私は脳特異的 Atg5 欠損マウスで蓄積している PKA 複合体が、Atg5-/-:NSE-Atg5 マウスの多くの臓器で蓄積していることも見出した。Atg5-/-:NSE-Atg5 マウスでは神経細胞以外の全細胞で Atg5 が欠損しているため、このマウスの各臓器を用いてプロテオーム解析を行って増加しているタンパク質を同定し、さらにトランスクリプトーム解析と組み合わせて転写量は増加せず、タンパク質量のみが増加しているタンパク質を探索すれば、オートファジーで選択的に分解を受けるタンパク質をより多く同定できるであろう。どのようなタンパク質がオートファジー依存的に分解されるのか、臓器間比較を行うことで臓器ごとのオートファジーの役割について考察する手掛かりを得られる可能性がある。

また私は PKA-RIα および PKA-Cα がオートファジー不全組織で蓄積すること、PKA-RIα が GABARAP および MAP1-LC3B と結合すること、さらに PKA-RIα、PKA-Cα 共にリソソームへと運ばれうることを見出した。これは PKA 複合体の新たな分解様式の存在をうかがわせる。

哺乳類細胞ではオートファジーは飢餓等による誘導性のオートファジーのみならず、基底レベルのオートファジー活性も存在しこれらは細胞の品質管理等に重要であることが分かっている。基底レベルのオートファジーの破綻による臓器不全の一部について、細胞の cAMP に対する応答性の違いから説明できる可能性がある。