



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Effects of RNA Interference of Atg4B on the Limited Proteolysis of LC3 in PC12 Cells and Expression of Atg4B in Various Rat Tissues             |
| Author(s)    | 吉村, 健太郎                                                                                                                                         |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47429">https://hdl.handle.net/11094/47429</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 よし むら けん た ろう  
吉 村 健 太 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 8 9 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 Effects of RNA Interference of Atg4B on the Limited Proteolysis of LC3 in PC12 Cells and Expression of Atg4B in Various Rat Tissues (Atg4B の LC3 限定分解に対する RNAi の発現抑制効果及び脳内発現分布)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 内山 安男

(副査)

教 授 高井 義美 教 授 米田 悦啓

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

オートファジーは、細胞にとって不要な細胞質成分やオルガネラをリソソームで分解するための重要な機構である。不要な構成成分を小胞体様の 2 重膜構造で細胞質から隔離してオートファゴソームを形成し、これとリソソームが融合することにより分解が始まる。近年、オートファジーに関連する遺伝子 (Atg) 群が酵母で同定され、その哺乳類におけるホモログも取られ、分子レベルでオートファジー現象の解析が進んだ。その結果、飢餓状態におけるアミノ酸の供給源としての機能以外に、発生過程、神経変性疾患の発生機構、感染防御機構などにおいても重要な働きをすることが明らかにされてきた。システインプロテアーゼの酵母 Atg4 は、オートファゴソーム形成に必須な Atg8 のプロセッシングに働く。Atg4 の哺乳類のホモログである Atg4B は、同 Atg8 のホモログである MAP1B light chain 3 (LC3) のプロセッシングに関与する。しかし、内在性 Atg4B の組織細胞における発現や LC3 に対する切断活性については不明である。本研究の目的は、1) Atg4B の mRNA とタンパク質のげっ歯類における発現様式や、2) 培養細胞での LC3 の切断活性を解析することで、ほ乳類の組織細胞における Atg4B の役割を検討することにある。

### 〔 方法ならびに成績 〕

ヒト及びラット (マウス) の Atg4B を特異的に認識する抗体 (N 端、C 端、及び全長に対する抗体) を作製した。同抗体を用いて、ウェスタンブロット法によりラット各組織における Atg4B タンパク質の発現を、定量 PCR 法、*In situ hybridization* 法を用いて mRNA の発現量を調べた。両者はラット各組織に広く分布しているが、その発現量は組織によって大きく異なっており、タンパク質の発現は脳、精巣、前立腺、副腎、胸腺で、mRNA の発現は嗅球、小脳、網膜、精巣、胸腺、胎盤で多かった。さらに、脳における詳細な Atg4B タンパクの発現分布を調べるために抗 Atg4B 抗体を用いた免疫蛍光二重染色を行なったところ、Atg4B は脳の各細胞に広く認められるが、小脳のプルキンエ細胞において特に強い発現が認められた。*In situ hybridization* 法による mRNA の発現解析でも、同様の結果が得られた。

RNAi 法を用いて、Atg4B mRNA とタンパク質の発現抑制を試みた結果、対照群の 1/10 に発現抑制された PC12

細胞の細胞株を得ることができた。同細胞を用いて、無血清培地で 24 時間培養してオートファジーに与える影響について検討した。しかし、発現抑制細胞における LC3 のプロセッシング及び、オートファゴソームの形成は野生型と差がなかった。

LC3 の切断を内在性 Atg4B が行なうことを確認するために、N 末端側に S. tag を、C 末端側に GFP を結合させたリコンビナント基質 (S-tagged-LC3-GFP) を作製し、野生型及び、Atg4B 発現抑制細胞の細胞抽出液に S-tagged-LC3-GFP を加え反応し、同基質に対する切断活性を測定した。野生型 PC12 細胞の抽出液を用いて反応したもので、反応時間、細胞抽出液濃度、基質濃度依存的に切断が確認されたが、Atg4B 発現抑制細胞の抽出液の場合は、どの場合も切断活性は野生の 1/10 であった。さらに、反応に Atg4B の阻害剤である N-ethylmaleimide (NEM) を添加した場合及び、LC3 の 120 番目のグリシンをアラニンに置換した基質を用いた場合は、Atg4B の切断活性は完全に阻害された。これらの結果は Atg4B が LC3 の切断を行なう主たる酵素であることを示している。

#### 〔 総 括 〕

ラット各組織における Atg4B タンパク質及び、mRNA の発現量は、その機能から予測されるユビキタスな発現様式とは異なり、組織によって差があり、特に脳で高いことが分かった。さらに、脳における Atg4B の発現を *In situ* hybridization 法や免疫組織化学的に調べた結果、mRNA とタンパク質の発現は一樣でなく、小脳のプルキンエ細胞に特異的に高い局在を示すことが分かった。

RNAi 法によって Atg4B の発現を 1/10 に抑制した PC12 細胞を用いて解析を行なった結果、LC3 のプロセッシング及び、オートファジーに影響は見られなかった。これは、オートファジーに必要な Atg4B タンパク質量は、野生型 PC12 細胞に存在する 10% で十分であることを示唆している。一方、Atg4B 発現抑制細胞のリコンビナント LC3 に対する切断活性は野生型 PC12 細胞の 1/10 に抑制されており、Atg4B が LC3 の切断を特異的に行なうプロセッシング酵素であることが確認された。

#### 論文審査の結果の要旨

オートファジーはリソソームにおける分解系の主要な経路をなし、有核細胞に共通する現象として知られる。近年、酵母でオートファジー関連遺伝子の解析が進み、哺乳類におけるホモログの同定とその遺伝子産物の役割の解析も進んできた。酵母の Atg8 はオートファゴソームの形成に必須である。その哺乳類のホモログは MAP1 light chain 3B (LC3B) であり、細胞質型 (LC3-I) と膜型 (LC3-II) が存在する。オートファジーが誘導されると LC3-II が増加し、細胞質からオートファゴソーム膜に局在が移ることが明らかにされてきた。LC3 は合成されると、細胞質のシステインプロテアーゼである Atg4B によるプロセッシングを受け、C 末端のグリシン残基の後で切断された LC3-I となる。しかし、内在性 Atg4B の存在、役割と組織細胞内の分布については、その抗体も作製されておらず不明な点が多い。本研究では、Atg4B 抗体の作製、機能解析、および組織細胞における分布を検討した、その結果、1) げっ歯類およびヒトの Atg4B をそれぞれ認識する抗体を作製した。2) PC12 細胞を用いて、RNAi 法により Atg4B をタンパク質量で 10% までノックダウンしたところ、オートファゴソームの形成は全く正常に起こるが、3) リコンビナント LC3 タンパク質を基質に、Atg4B の切断活性を同細胞でみると 10% に低下していた。また、4) Atg4B のラット組織細胞における発現を検討したところ、ユビキタスな分布を示すが、組織細胞によって発現量が異なり、特に脳では高い発現が見られることが分かった。以上、本研究は、オートファジーのキー酵素である Atg4B に注目して研究し、オートファジーの分子機構や、神経細胞におけるオートファジーの役割を解明する上で有用な基盤を開発したものであり、博士 (医学) の学位授与に相応しいものと考えらる。