

Title	Atg9A Protein, an Autophagy-Related Membrane Protein, is Localized in the Neurons of Mouse Brains
Author(s)	畠村, 博澄
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54086">https://hdl.handle.net/11094/54086</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	多村博澄
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第23603号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学位論文名	Atg9A Protein, an Autophagy-Related Membrane Protein, is Localized in the Neurons of Mouse Brains (膜貫通オートファジー関連遺伝子産物Atg9Aはマウス脳の神経細胞に局在する)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 金井 好克 教授 岩井 一宏

論文内容の要旨

[ 目的 ]

オートファジーは有核細胞に共通してみられ、細胞の恒常性の維持に必須な現象と考えられている。近年、オートファジーに関連する遺伝子 (Atg) 群が出芽酵母で同定され、そのほ乳類におけるホモログも同定されてきている。Atgタンパク質の中で唯一膜貫通タンパク質であるAtg9はオートファゴソーム形成の初期から重要な働きをする。ほ乳類ではAtg9A, Atg9Bの二種類のホモログが知られ、そのmRNAの発現様式からAtg9Aが広くほ乳類の組織に分布することが報告されてきた。しかし、ほ乳類のAtg9Aタンパク質 (Atg9Ap) の機能と組織における発現は全く不明である。本研究ではAtg9Apに対する特異的な抗体を作製し、マウスの組織における発現様式と細胞内局在を明らかにすることを目的とした。

[ 方法ならびに成績 ]

マウスAtg9Apの720から839番目のアミノ酸配列を組み換えタンパク質として作製し、精製したものを抗原として用いた。Titer Max Goldを用いて同抗原のエマルジョンを作製し、ウサギに免疫した。抗血清を回収しDEAE精製を行った後、抗原カラムを用いたアフィニティ精製によって抗体を精製した。抗体の評価は、ECFP融合Atg9Aを発現させたNIH3T3細胞株とRNAi法によってAtg9AのmRNAをノックダウンした同細胞株を作製し、得られた抗体がAtg9Apに対して特異的であることを確認して、本研究に用いた。実験には、8週齢マウス (C57BL/6J) を用いて、各組織における

タンパク質の発現をウエスタンブロット法および免疫組織細胞化学法を用いて解析した。その結果、1) Atg9Apのタンパク質レベルの発現は、各組織に広く分布していたが、特に脳と脊髄に豊富に存在することが明らかとなった。そこで、脳における詳細な局在を解析し、2) Atg9Apの免疫陽性反応は神経細胞に強く認められたが、陽性反応はすべての神経細胞に同じ程度に見られるわけではなかった。特に、大脳皮質や小脳で強く認められたことから、Atg9Apの詳細な局在をプルキンエ細胞で解析した。Atg9Apと各種オルガネラマーカートの二重免疫染色法によりその細胞内局在を調べ、3) Atg9Ap免疫陽性反応はgamma-adaptin陽性のトランスゴルジ網 (TGN) からlamp1陽性の後期エンドソーム/リソソームに広く分布すると共に、BiP陽性の小胞体にも局在していた。4) 同陽性反応はプルキンエ細胞の細胞体だけではなくneurofilament-L陽性の軸索やsynaptophysin陽性の神経終末にも分布し、非常に強い反応が軸索初節に認められた。さらに、5) 軸索初節周辺に網目状に発達したVGAT陽性のバスケット細胞の神経終末にもAtg9Apの陽性反応がみられた。しかし、6) プルキンエ細胞層のGFAPあるいはGLAST陽性のグリア細胞には陰性であった。

[ 総括 ]

本研究ではウエスタンブロット法及び免疫染色法に応用可能なAtg9Apに対する特異的な抗体を作製することが出来た。マウスの各組織においてAtg9Apの分布をタンパク質レベルで調べた結果、広く発現することがわかり、mRNAのヒト組織における発現様式と一致していた。しかし、Atg9Apの発現は神経系で特に強く、mRNAレベルの発現様式と必ずしも一致していなかった。このことは、Atg9Apの発現が翻訳後の制御を受けることを示唆している。これまでの研究から、培養細胞での局在の検討からAtg9ApはTGNと後期エンドソームをリサイクルすることが知られているが、小脳プルキンエ細胞でも同様に局在することが分かった。さらに、Atg9ApはBiP陽性の小胞体に局在が認められると共に、強い陽性反応が軸索初節と深部小脳核の神経細胞周囲の終末部に見られた。興味あることにはAtg9Apはプルキンエ細胞の軸索初節周囲に存在するバスケット細胞のVGAT陽性の神経終末網にも陽性であった。これらの結果は、細胞内代謝活性が高い神経終末と軸索初節でオートファジー活性が高いことを示している。また、Atgタンパク質の中で唯一の膜タンパク質であるAtg9Apが小胞体に認められることから、オートファゴソーム形成の初期からその形成に関与することが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

オートファジー関連遺伝の一つであるAtg9は膜貫通タンパク質であり、オートファゴソーム形成の初期から重要な役割を果たしている。本研究では、ほ乳類のAtg9ホモログの一つであるAtg9Aのマウスにおける発現様式と細胞内局在を明らかにすることを目的とした。

Atg9Aタンパク質 (Atg9Ap) に対する特異的な抗体を作製し、8週齢マウスで解析したところ、Atg9pは様々な組織に広く分布し、特に脳と脊髄に高い発現が見られた。脳におけるAtg9Apの局在を免疫組織化学的に検討した結果、大

脳皮質、小脳などの神経細胞に強い局在を認めた。プルキンエ細胞内では、Atg9Apの局在はトランスゴルジ網、後期エンドソーム/リソソームだけでなく、小胞体、軸索初節、軸索終末に局在していた。

本研究の意義は特異的抗体を作製し、in vivoにおけるAtg9Aタンパク質の局在を明らかにしたことにある。特に、プルキンエ細胞の軸索終末にAtg9Aタンパク質が存在していることは、その場所で初期のオートファゴソーム形成が起これることを示唆している。本研究は中枢神経系におけるオートファゴソーム形成の初期段階を考える上で重要な研究と考えられ、学位論文として十分な価値があると認められる。