

Title	オートファジーにおける細胞内輸送制御因子の役割
Author(s)	今井, 健太
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56098
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (今井 健太)	
論文題名	オートファジーにおける細胞内輸送制御因子の役割 (Investigation of the involvement of membrane trafficking in autophagy)
論文内容の要旨	
<p>私達の体を構成する最小単位である細胞は、タンパク質などの生体高分子で構成されている。タンパク質は細胞内で生合成された後、ある一定期間で、細胞により能動的に分解されるといった動的なリサイクルシステムを構成し、細胞の恒常性や個体としての健康維持に必要な不可欠である。この分解を司るメカニズムの一つとしてオートファジーが知られている。オートファジーは細胞質成分を加水分解酵素に富むリソソームへ送り込み分解する機構である。オートファジーは栄養飢餓により強力に誘導され生存に必要な栄養源を確保するために働いていると考えられている。さらにオートファジーは、タンパク質やオルガネラの品質管理、病原体の排除、免疫応答、抗原提示など様々な細胞内の重要な現象にも関わっていることが示唆されており、オートファジーの生理的役割の解明が進みつつある。近年、オートファジー不全と神経変性疾患など重篤な病気の発症との因果関係が明らかとなっており、オートファジーのメカニズムを理解することは重篤な疾患の治療法の確立につながる可能性を秘めている。</p> <p>オートファジーが誘導されると、細胞質に隔離膜とよばれる膜構造体が出現し、タンパク質などの細胞質成分を包み込むように伸長し、最後に末端同士が融合してオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造が形成される。そこにリソソームが融合し、リソソームに含まれる加水分解酵素によって内容物が分解される。オートファゴソーム形成を担う分子として出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、これまでに30種類以上のATG遺伝子が同定されている。しかしながら、オートファゴソーム形成メカニズムの全体像を明らかにするまでには至っていない。申請者は、この課題に取り組むべくオートファジーと関係性が深いと思われる細胞内メンブレントラフィックに着目した。</p> <p>細胞内では各オルガネラ間で積極的にタンパク質や脂質の輸送が行われており、動的なネットワークが形成されている。これらのネットワークは脂質膜に包まれた小胞の行き来により制御されており、供与側のオルガネラから小胞が出芽する際に輸送される分子を特異的に小胞へ積み込み、出芽した小胞が目的とする受容オルガネラと結合することで特異性の高い物質交換を可能としている。この一連の過程をメンブレントラフィックと呼び、多くの分子により厳密に制御されている。オートファジーは膜輸送により細胞質成分をリソソームへ運び込むため、メンブレントラフィックの一種とみなすことができる。興味深いことに、オートファジーの制御に一部のオートファジー以外のメンブレントラフィックを制御する因子に関わりうるという分子機構の共通点が報告されている。しかしながら、どのようにこれら制御因子がオートファジーへ関与しているのかについては明らかではない。申請者は、オートファゴソーム形成に必須な膜タンパク質Atg9の機能解析を行い、メンブレントラフィックによってAtg9はリサイクリングエンドソームを経由することでオートファゴソーム形成に関与していることを見出した。さらに、メンブレントラフィック制御因子に着目したRNA干渉法を組み合わせたイメージングベースのスクリーニングによりオートファジーの新規制御因子の特定に成功した。</p> <p>オートファゴソーム形成に必須なコアAtgタンパク質の中で唯一の膜タンパク質であるAtg9は普段、エンドソームやトランスゴルジネットワーク (TGN)、細胞膜に分布しており、オートファジー誘導時には一過性にオートファゴソーム上に現れる。そのため、Atg9はオートファゴソーム形成に必要な何かを運んでいると考えられている。細胞内膜動態研究室では、Atg9のN末端およびC末端欠失変異体の解析を通して、N末端が自身の適切な細胞内局在と機能に必要なことを見出していた。申請者は、Atg9のN末端についてより詳細な解析を行ったところ、少なくとも3つの輸送シグナルと思われるアミノ酸配列を見出した。それら輸送シグナルに変異を導入したAtg9変異体をAtg9-KO MEF細胞に発現させたところ野生型Atg9のようにオートファジー能の回復が確認できなかった。Atg9変異体の局在を詳細に解析したところ、オートファジー誘導条件である栄養飢餓条件において、変異体はリサイクリングエンドソームに顕著に蓄積していることが分かった。さらに、Atg9変異体のN末端に輸送シグナルを人工的に付加させると、リサイクリングエンドソームへの蓄積がなくなり、オートファジー能の回復が確認できた。次に、出芽酵母においてRabファミリーG</p>	

タンパク質Ypt1のGEFであるTRAPPIII複合体がエンドソームからゴルジ体への逆行輸送に関わり、Atg9の輸送にも必要であるとの報告に着目し、哺乳細胞でもその役割が保存されているかどうかを調べた。TRAPPIII複合体の構成因子であるTRAPPC8を特異的にノックダウンすることができるsiRNAをHeLa細胞に導入しAtg9の局在を観察したところ、コントロールsiRNAを導入した細胞と比べてリサイクリングエンドソームに顕著に蓄積している様子が観察され、オートファゴソームの形成も減少していた。以上の結果を総合して、メンブレントラフィックによってAtg9はリサイクリングエンドソームを経由することでオートファゴソーム形成に関与していると結論づけた。これらは、Atg9の機能に迫る成果であるだけでなく、メンブレントラフィックがオートファジーに関わることを明確に示すことができる発見である。

申請者は、オートファジーにおけるメンブレントラフィック制御因子の役割に迫るために、分泌経路制御遺伝子に着目したsiRNAスクリーニングを行った。オートファジー活性の指標となるmRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 (tfLC3) を定常発現させたHeLa細胞を樹立し、1細胞画像解析によるイメージングベースのsiRNAスクリーニング系を立ち上げ、オートファジーを制御する新規遺伝子の同定に取り組んだ。その結果、オートファジーを正もしくは負に制御する遺伝子を複数個同定することに成功した。得られてきた候補遺伝子について詳細な解析を行った結果、一つの候補遺伝子はオートファジー誘導の最上流に位置するULK1複合体の膜ターゲティングに関わり、オートファゴソーム形成の初期段階に関与していることが示唆された。これまで不明であったULK1複合体のオートファゴソーム形成起点への局在化メカニズムに新しい知見をもたらす発見である。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (今 井 健 太)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 吉森 保
	副 査 教授 目加田 英輔
	副 査 教授 平岡 泰
	副 査 准教授 岡本 浩二

論文審査の結果の要旨

オートファジーは細胞内構成成分を分解し再利用する機構である。近年の研究によりオートファジーの生理的意義の解明が進んでいるが、オートファジーの分子機構については不明な点が多い。申請者は、オートファジーをメンブレントラフィックの一種であると捉え、オートファジーの分子機構解明に取り組んだ。申請者は、オートファジー関連タンパク質Atgの中で唯一の膜タンパク質であるAtg9の機能解析を行ない、Atg9のリサイクリングエンドソームを経由したメンブレントラフィックによる輸送がオートファジーに必須であることを見出した。この輸送は、Atg9のN末端にある輸送シグナルに依存していることも明らかにした。続いて申請者は、イメージングを用いたsiRNAスクリーニング系を新たに立ち上げ、オートファジー以外のメンブレントラフィックを制御する因子の中から複数のオートファジーにも関わる因子の同定に成功した。そのうちの 하나가、オートファジーの初期段階に関わることを示した。これらの結果は、オートファジーの分子機構に新たな知見をもたらすものであり、本論文は学位に値するものと認める。