The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ATG16L1に結合する低分子化合物を用いた新規LC3-II形成機構の解明
Author(s)	山本, 健太郎
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72618
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（山本　健太郎）	
論文題名	ATG16L1に結合する低分子化合物を用いた新規LC3-II形成機構の解明 (Analysis of the LC3-II formation by a novel chemical compound which binds to ATG16L1)

論文内容の要旨

細胞内では、タンパク質の「アミノ酸重合による生合成」とともに「アミノ酸への能動的分解」が並行して行われており、その破綻は細胞の機能低下や重篤な疾患につながることが知られている。その理由として、絶妙な合成・分解バランスが古いタンパク質から新しいタンパク質への入れ替を促進し、細胞内の環境を常に正常にかつ新鮮に保たつと考えられるためである。この分解機構の一翼を担い恒常性維持に強く貢献する機構として本研究対象である「オートファジー」分解系が知られている。オートファジー分解系の特色は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜の膜構造体を形成する過程で細胞質成分を膜内へ隔離し、最終的には細胞内消化器官リソソームと融合することで内容物を大規模に分解する点が挙げられる。そのため、非特異的ながらも短時間で莫大な量の分解産物を得られるため、前述の恒常性維持に加え飢餓状態の細胞が生存するためのエネルギーを自ら獲得する原理としても知られている。近年では、このような従来型のオートファジー機構に加え「選択的オートファジー」と呼ばれる特殊なオートファジー経路の存在が明らかとなって来た。選択的オートファジーでは、異常をきたした細胞小器官や、神経変性疾患の原因と考えられる異常なタンパク質凝集塊など種々の有害物質を特異的に排除することができると考えられており、多岐にわたる生命現象・疾患に「オートファジー」が強く関わることが示唆される。このように、オートファジーは多様な生命現象の要として位置づけられるとともに、オートファジーを標的とした応用研究がファーストインクラスの創薬研究につながると期待され基礎と医薬をつなぐ研究展開に注目されている。

前述のようにオートファジーはオートファゴソームというオルガネラ創成を伴う特殊な細胞内イベントであるため、分子基盤の解析は複雑さを極め現在においても多くの謎が残されている。例えば、オートファゴソーム形成に必要な遺伝子群(ATGタンパク質群)は出芽酵母を用いた遺伝学的解析により発見され、現在では30種類以上のATGタンパク質が同定されている。しかしながら、オートファゴソーム形成時にATGタンパク質がどのように集積するのかその制御機構の全容は未だに明らかとなっていない。そこで申請者は、本研究室で同定した機能未知なATGタンパク質の一つLC3に着目し研究に取り組んだ。LC3は他のATGと異なりオートファゴソーム膜上の脂質フォルファチジルエタノールアミン(PE)と共有結合しオートファゴソーム上に安定的に存在するという特徴を持つ。この共有結合はユビキチン様の結合方式を取ることが知られており、ATG4により切断されグリシン残基が露出したLC3はE1様酵素ATG7と共有結合した後、E2酵素複合体であるATG3に受け渡され、最終的にE3様酵素複合体(ATG16L1複合体)と協調してLC3-PEを形成することが知られている。これら遺伝子群はLC3結合系と呼ばれ正常なオートファゴソーム形成に必要であるが特にLC3の機能や制御機構はほとんど明らかとなっていない。そこで申請者は従来の遺伝学的な手法とは異なる低分子化合物を用いたアプローチを実施し、オートファゴソーム形成におけるLC3結合系の役割と創薬への応用を試みた。

本研究ではLC3-II(前述LC3-PEの別称)の形成イベントに着目すべく、形成酵素複合体の因子ATG16L1に結合する低分子化合物を見出した。興味深いことに、化合物添加によりオートファゴソーム形成やリソソームの機能を阻害することなくLC3-II形成量のみが有意に増大することが明らかとなった。各LC3結合系の因子を欠損した細胞を用いてLC3の量をモニターすることで化合物が従来の経路を用いてLC3-IIを過剰に形成していることを明らかにした。また、大阪大学蛋白質研究所との共同研究によりATG16L1のC末端側に存在するWDリピートドメインの結晶構造を解き明かし、薬剤との結合に重要な残基の同定に成功した。これら一連の結果より、新規化合物がE3様経路の活性を向上させLC3-II形成を促進させる新規機序を持つ化合物であると申請者は結論づけた。次に、増大したLC3-IIの細胞内局在を観察するため蛍光顕微鏡観察によるスクリーニングを実施した。その結果、化合物により増大したLC3-IIは主にゴルジ体と共局在することを突き止めた。LC3-IIとゴルジ体との関係はこれまでにほとんど報告がないため種々の解析を試みた結果、ゴルジ体上のLC3-IIは早期にゴルジ体上に出現し、その後オートファゴソーム形成に利用されることが判明した。また、化合物添加によりLC3-II形成の責任酵素であるATG16L1複合体もゴルジ体に局在が増大することから、ゴルジ体上でLC3-IIが作られオートファゴソーム形成場所に輸送されているという新しいモデルが示唆された。そこで、

輸送キャリアとしてATGタンパク質のうち唯一の膜タンパク質でありゴルジ体に局在することが知られているタンパク質ATG9に着目した解析を試みた。その結果、驚くべきことにATG9欠損細胞では化合物処理下においてもゴルジ体にLC3-IIは蓄積するがゴルジ体からの輸送が行われないことが判明した。またATG9欠損細胞においては長時間の飢餓によりLC3-IIがゴルジ体に蓄積することが明らかとなり、化合物添加時に見られた表現系が生理条件下でも生じていることを示唆する結果を得た。これら一連の化合物を用いた解析により、申請者はLC3-IIがゴルジ体で形成されたのちにATG9小胞によってオートファゴソーム形成サイトに運ばれる経路を新たに同定することに成功したと考えている。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（山本　健太郎）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	吉森　保
	副 査	教授	平岡　泰
	副 査	教授	中川　敦史
	副 査	教授	野田　健司

論文審査の結果の要旨

オートファジーは真核細胞に普遍的に備わる細胞質中の分子や構造を分解するシステムであり、細胞の恒常性維持に働き各種の疾患を抑制する重要な生理機能として近年大きな注目を集めている。しかし、現在においてもオートファジー機構には不明な点が多く分子レベルでの全容解明が望まれている。申請者は低分子化合物を用いたケミカルバイオロジーの手法によりオートファジーの新たな分子機構の解明を行った。オートファジーを担う膜構造オートファゴソームに結合し、その膜動態を制御するLC3は特殊な脂質化を受けて機能を発揮する。申請者はその脂質化に関与するタンパク質に結合する低分子化合物存在下では、LC3がゴルジ体に集積することを見出した。この現象の詳細な解析から、LC3の脂質化がゴルジ体で起こりその後オートファジーに必須の因子Atg9が局在する小胞によってオートファゴソームに運ばれるという全く新しい知見を得るに至った。これは分野の進展に寄与する大きな発見である。さらに申請者は、この低分子化合物がオートファジーによる疾患原因物質の排除を亢進することを見出しており、創薬の可能性が示唆される。以上の成果は、学位に値するものと認める。