

論文の内容の要旨

A novel function of intracellular phospholipase A₁ mediated
by autophagic proteins Atg8 family

論文題目 オートファジータンパク質 Atg8 を介した細胞内型ホスホリパーゼ A₁ の新規機能

氏名 森川 麗

【序】

修士課程において私は、哺乳類細胞内型ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) の一つ KIAA0725 の機能解析を行ない、KIAA0725 を細胞に過剰発現するとリゾリン脂質の一種リゾホスファチジルエタノールアミンが特異的に増加すること、KIAA0725 は細胞質及びゴルジ体に局在し、発現抑制により一部の小胞輸送関連タンパク質の局在に変化を来すことなどを明らかにし、KIAA0725 がホスファチジルエタノールアミン (PE) の加水分解を介して何らかの膜輸送系に関与する可能性を見いだしていた。しかし、KIAA0725 が直接制御する膜動態がどのようなものであるのかを明らかにするには至らなかった。

そこで博士課程においては、KIAA0725 が関与する膜動態を解明することを目的としてさらに解析を進め、KIAA0725 がオートファジータンパク質のひとつである Atg8 の哺乳類ホモログと結合することを見いだした。

オートファジーとは、オルガネラを含めた細胞質成分を加水分解酵素に富んだリソソーム/液胞へと輸送することにより大規模に分解する機構であり、酵母から哺乳類まで高度に保存されている。主に飢餓時に

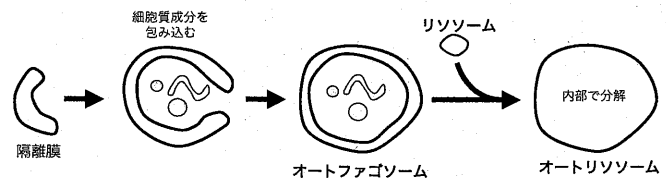


図1 オートファジーの進行過程

発動し、生存に必須な生体分子の合成の材料を確保する機構であると考えられていたが、近年、細菌感染や神経変性疾患などの病気との関連も明らかにされつつある。オートファジーにおける膜動態は、既知の小胞輸送とは異なる非常に特徴的かつダイナミックなものである。細胞質中に隔離膜と呼ばれるカップ型の膜構造が出現し、伸長した隔離膜が細胞質の一部を取り込み、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造を形成する。オートファゴソームは最終的にリソソーム/液胞と融合し、内部の細胞質成分は内膜ごと消化される (図 1)。Atg8 は、これらの過程に関与する分子として酵母を用いた遺伝学的手

法により同定されたオートファジータンパク質群のひとつである。しかし、オートファジーという特異な膜動態をどのように Atg8 が制御するのかについては不明な点が多い。

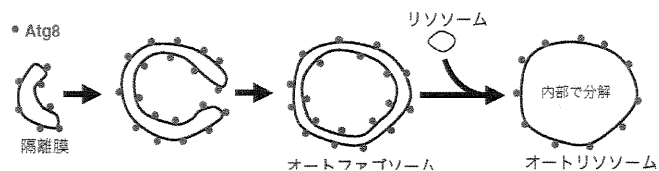


図2 オートファジーにおける Atg8 の挙動

今回、KIAA0725 が Atg8 ファミリーを介してオートファジーを制御する可能性を検討し、KIAA0725 はオートファゴソーム上に局在し、オートファジーの最終過程を制御する調節因子である可能性を明らかにした。

【方法と結果】

KIAA0725 の結合因子、Atg8 ファミリーの同定

KIAA0725 がどのような膜輸送経路において機能するのかを明らかにするため、yeast two hybrid スクリーニングにより KIAA0725 の結合因子を探索した。その結果、KIAA0725 の結合因子として、GATE-16、GABARAP を同定した。これらの分子は、酵母 Atg8 の哺乳類ホモログの一部である。酵母 Atg8 は、ユビキチンに良く似た立体構造を取り、E1、E2 に相当する Atg3 及び Atg7 により PE 付加され、オートファゴソーム膜上に初期段階の隔離膜からオートリソソームまで局在し続ける (図2)。Atg8-PE の存在がオートファジーに必要であることが示されているが、その機能メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。Atg8 の哺乳類ホモログは 7 つ存在するが、これらのうち実際に動物細胞におけるオートファゴソームへの局在が確認され、オートファジーとの関連が最も解明されているのが LC3 である。そこで、実際にこれらの Atg8 ファミリー分子と KIAA0725 が相互作用するかどうかを免疫沈降により確かめたところ、KIAA0725 は GATE-16、GABARAP、LC3 のいずれとも共沈することが確かめられた (図3)。この結果より、KIAA0725 は、Atg8 ファミリー分子と協調してオートファゴソーム形成において機能している可能性が示唆された。

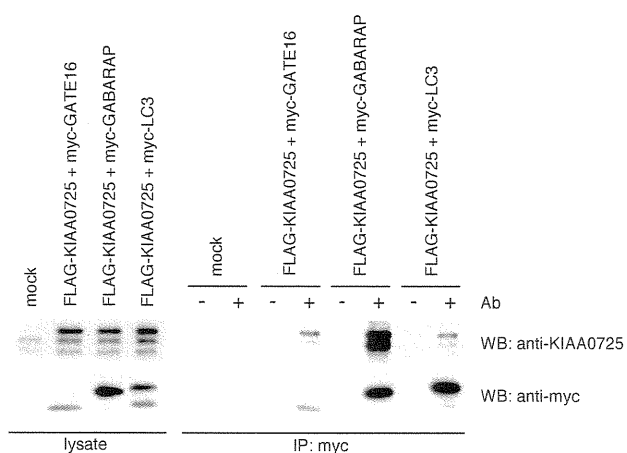


図3 KIAA0725 と Atg8 ファミリー分子との共沈実験

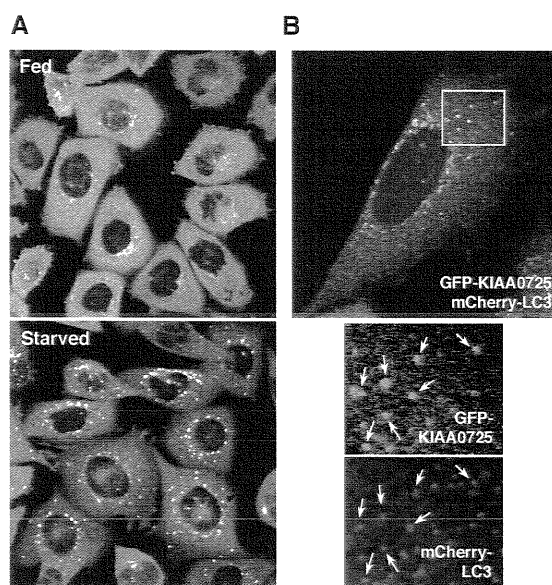


図4 飢餓誘導時の GFP-KIAA0725 安定発現細胞

(A) 飢餓状態における GFP-KIAA0725 陽性ドットの出現。
(B) GFP-KIAA0725 陽性ドットのほとんどは mCherry-LC3 陽性である。

KIAA0725 は飢餓誘導時に LC3 陽性オートファゴソーム及び一部のオートリソソームに局在する

動物細胞を血清、アミノ酸を含まない培地により飢餓状態に置くことで、オートファジーは誘導され、オートファゴソームが形成される。GFP-KIAA0725 安定発現 CHO 細胞では GFP-KIAA0725 は通常ゴルジ体とサイトゾルに局在する。しかし、HBSS で 2 時間培養した後観察したところ、通常培地の場合には観察されない GFP-KIAA0725 陽性ドットが出現した (図 4A)。このドットがオートファゴソームであるかどうかを確かめるため、mCherry-LC3 を一過性に発現させて観察したところ、GFP-KIAA0725 陽性ドットの大部分が mCherry-LC3 陽性であった (図 4B)。また、GFP-KIAA0725 は隔離膜のマーカーである Atg5 とは重ならならず、また、一部の GFP-KIAA0725 陽性ドットはオートリソソームを含む酸性コンパートメントを染色するリゾトラッカー陽性であった (data not shown)。これらの結果から、KIAA0725 は飢餓時に形成されるオートファゴソーム、及び一部のオートリソソーム上に局在することが示された。

KIAA0725 の発現抑制により LC3-PE が増加し、LC3 陽性オートファゴソームが蓄積する

遊離 LC3 と PE が付加された LC3-PE は SDS-PAGE における移動度の違いから判別が可能である。LC3-PE の量は特にオートファゴソーム数と良く相関することから、オートファゴソーム膜の量の指標として見られている。LC3-PE はオートファジーが充進した場合に増加することが多いが、リソソームとの融合の異常等により通常条件下でも生じている基底レベルでのオートファジーの進行が停滞する場合にもオートファゴソームが蓄積し、LC3-PE が増加する。オートファゴソーム形成における KIAA0725 の寄与の有無を確かめるため、KIAA0725 を siRNA により発現抑制し、LC3 の発現をウエスタンブロッティングにより確かめたところ、KIAA0725 の発現抑制下では、栄養が十分な状態でも LC3-PE が増加していることが明らかとなった (図 5A)。同時に、LC3 の蛍光抗体法による染色では、LC3 陽性オートファゴソーム/オートリソソームが蓄積している様子が観察された (図 5B)。さらに、LC3 に対する免疫電子顕微鏡法により、KIAA0725 発現抑制細胞では、同様に LC3 陽性オートファゴソーム/オートリソソームの増加が確認され、さらに細胞質中及びオートファゴソーム/オートリソソーム内に LC3 の異常なアグリゲイトが観察された (図 5C)。

LC3-PE とオートファゴソーム/オートリソソームの増加という表現型は、上に述べたようにオートファジー経路の充進もしくは基底レベルでのオートファジーの途中段階での停滞により引き起こされると考えられる。オートファジー誘導時には、シグナル分子である Tor キナーゼが不活性化され、これがオートファジー経路の引き金となることが知られている (図 6A)。そこで、Tor の活性化状態を、Tor の下流で同様にリン酸化を受

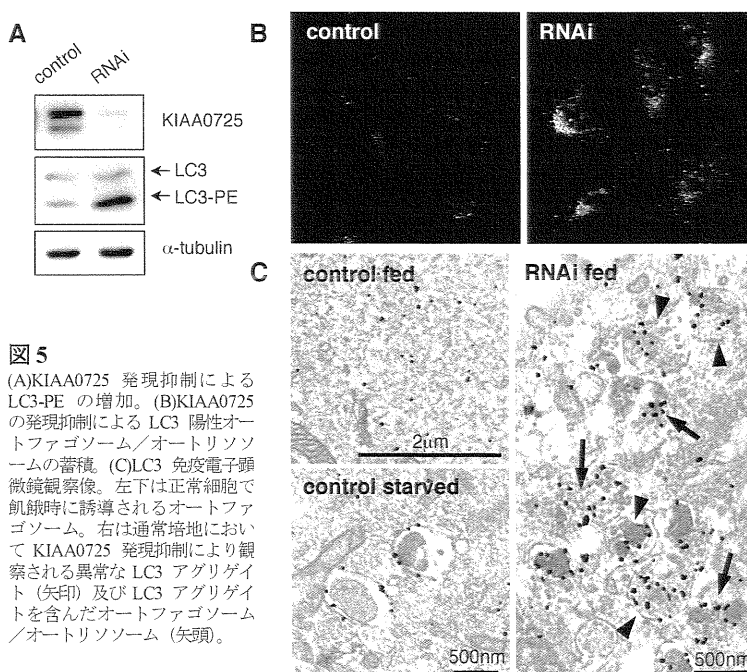


図 5
(A) KIAA0725 発現抑制による LC3-PE の増加。(B) KIAA0725 の発現抑制による LC3 陽性オートファゴソーム/オートリソソームの蓄積。(C) LC3 免疫電子顕微鏡観察像。左下は正常細胞で飢餓時に誘導されるオートファゴソーム。右は通常培地において KIAA0725 発現抑制により観察される異常な LC3 アグリゲイト (矢印) 及び LC3 アグリゲイトを含んだオートファゴソーム/オートリソソーム (矢頭)。

けることが知られている p70S6K のリン酸化状態を指標に調べた。その結果、コントロール細胞と KIAA0725 発現抑制細胞に差は見られなかった (図 6B)。また、オートファジーの初期段階には、隔離膜の形成が生じるが、隔離膜のマーカである Atg5 による可視化を行なったところ、KIAA0725 発現抑制細胞における隔離膜形成の増加は認められなかった (図 6C)。これらの結果から、KIAA0725 の発現抑制下ではオートファジーが亢進しているのではなく、基底レベルのオートファジーに停滞が生じている可能性が示唆された。

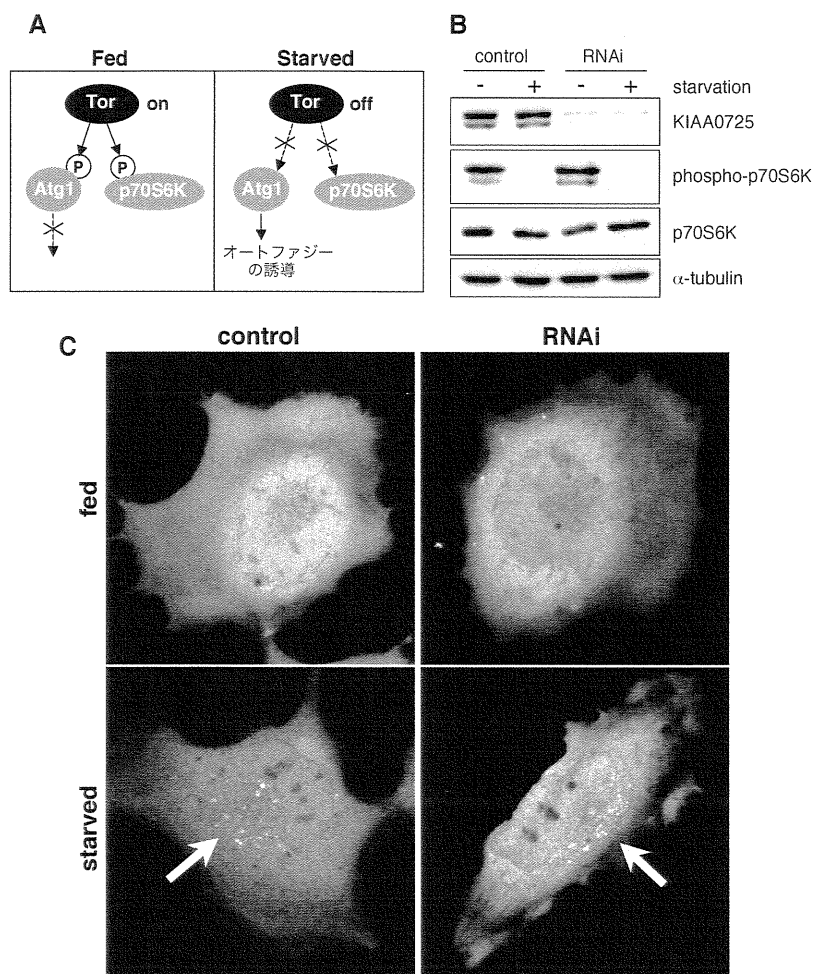


図 6 KIAA0725 発現抑制細胞では、オートファジーは亢進していない (A)オートファジー誘導シグナルについて。(B)KIAA0725 発現抑制細胞では、Tor のリン酸化状態に異常はない。(C)mCherry-Atg5 による隔離膜の可視化。矢印が飢餓により誘導された隔離膜。KIAA0725 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比べて過剰な隔離膜の誘導は生じていない。

KIAA0725 発現抑制により、オートファジー分解に異常は生じない

KIAA0725 の発現抑制により基底レベルのオートファジーに停滞が生じていると考えられたが、その一つの原因としてオートリソソームにおける分解機構に異常を来している可能性を検証した。具体的には、オートファジー特異的に分解されると言われている p62 の飢餓状態における分解速度について KIAA0725 発現抑制細胞とコントロール細胞で比較した。その結果、KIAA0725 発現抑制細胞において p62 の分解速度の異常は見られなかった (図 7)。従って、KIAA0725 はオートファジーによる分解機構以外の何らかの分子機構を介してオートリソソームの最終的な除去を制御していると考えられた。

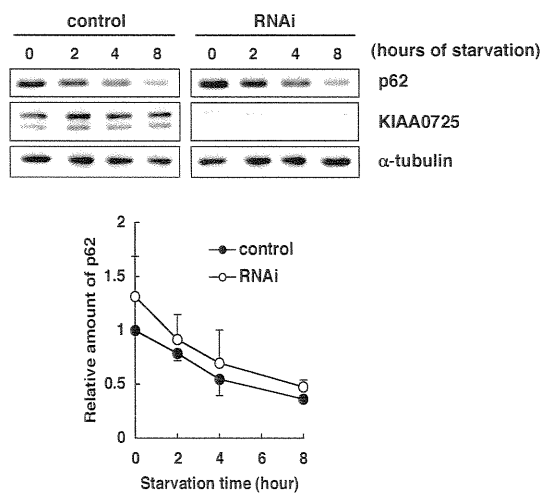


図 7 オートファジーによる p62 の分解 飢餓状態においてオートファジーが誘導される際の p62 の分解速度を KIAA0725 発現抑制細胞とコントロール細胞で調べた。

【まとめと考察】

オートファジーの分子メカニズムは部分的には明らかにされつつも、不明な点が多く残されている。本研究では、細胞内型 PLA₁ の一つである KIAA0725 が Atg8 ファミリーと結合し、オートファジーの最終過程の制御に関与することを明らかにした。これまでに、オートリソソームがどのような過程をたどり細胞内から消えるのか全く解明されてこなかった。このような表現型を示す変異体や発現抑制系はこれまでに報告がなく、今回の結果から細胞内型 PLA₁ がこれまで全く定義されて来なかったオートファジーの後期過程の調節因子であると考えられる。

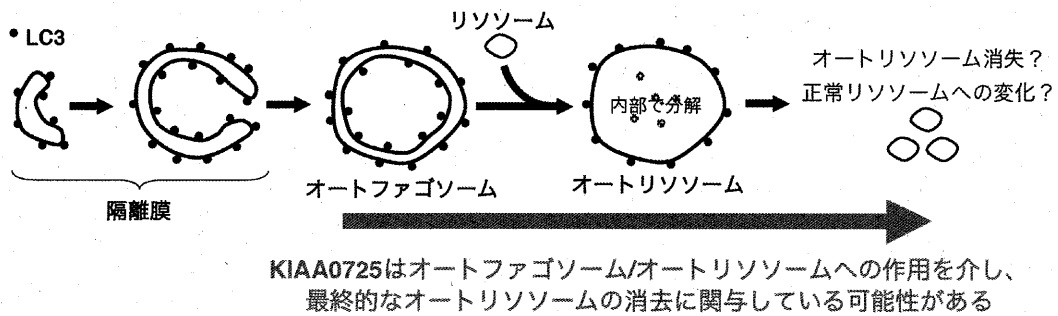


図8 オートファジーにおける KIAA0725 の機能についてのモデル