

学位論文題名

FIP200結合性 E3ユビキチンリガーゼ MUL による
オートファジー誘導制御の可能性

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Mulibrey 小人症 (MUScle-Liver-BRAIN-EYE nanism、MUL; OMIM 253250)は、特徴的な顔貌、心筋症、肝腫大を伴い胎児期発症で重篤な成長不全を呈する常染色体劣性形式の遺伝性疾患である。この Mulibrey 小人症は、MUL 遺伝子の変異によって生じることが判明しており、これまでに世界中から 14 種類の変異が報告されている。MUL タンパク質はそのドメイン構造より、RING フィンガードメイン、B-Box ドメイン、coiled-coil ドメインの 3 つを有する tripartite motif (TRIM) ファミリータンパク質の一つである。他の TRIM ファミリータンパク質と同様に MUL も E3 ユビキチンリガーゼとして働き自己ユビキチン化能を有することが報告されている。しかし、その酵素としての基質タンパク質は未だ同定されておらず、その分子レベルの機能は未知のままである。Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa (FIP200)は、Pyk2 のリン酸化能を抑制して負の制御を行うタンパク質として同定されたが、最近この FIP200 がオートファジーの制御に関わっていることが報告されている。酵母において TOR 依存性に過剰にリン酸化を受けていた Atg1 と Atg13 は、栄養飢餓状態で TOR の活動が抑制されると互いに結合し更に Atg17 と結合して複合体を形成し、これによってオートファゴソーム形成が促進される。FIP200 はこの Atg17 の哺乳類ホモログと考えられ、Atg1 の哺乳類ホモログである ULK、Atg13 の哺乳類ホモログと複合体を形成し mammalian TOR (mTOR) の制御下でオートファジーに関与していることが示唆されている。今回の研究において、酵母ツーハイブリッド法を使用して MUL と結合するタンパク質のスクリーニングを行い、FIP200 を同定した。FIP200 は E3 ユビキチンリガーゼとしての MUL の基質の一つであると考えられ、この 2 つのタンパク質の相互作用がオートファジー誘導下で変化する可能性がある。FIP200 が関わっているとされるオートファジーは、アルツハイマー病を含むさまざまな神経変性疾患に関わっている可能性があり、その分子メカニズムを明らかにすることが病態の解明につながると考える。

【方法と結果】 MUL と相互作用するタンパク質を同定するため、酵母ツーハイブリッド法を用いてマウス脳 cDNA ライブラリーからスクリーニングを行った。bait としてマウス MUL cDNA のカルボキシル基端側の部分を用いて同定された複数の陽性クローンは、マウス FIP200 の cDNA 配列の断片を有していることが判明した。次に得られた陽性クローンからマウス FIP200 cDNA 断片(FIP200(CTF))をクローニングして、全長の MUL とともに真核細胞発現ベクターをそれぞれ作製した。これらのベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入しタンパク質を発現させ、その細胞の溶解液で免疫沈降を行った。MUL は FIP200(CTF)と共発現させた時に免疫沈降され、これらのタンパク質は結合することが確認された。さらに全長のヒト FIP200 においても同様に、免疫沈降法で MUL との結合を確認した。MUL は E3 ユビキチンリガーゼ活性を有していることが報告されている。

FIP200 が MUL の基質であるか細胞内ユビキチン化アッセイにて検討した。FIP200、FLAG-MUL、His6-ユビキチンをそれぞれ発現するベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、その細胞溶解液を Ni²⁺-アフィニティーレジンでプルダウンし、抗 FIP200 抗体でイムノブロットした。MUL を過剰発現させた細胞のレーンにおいて FIP200 と考えられる位置からより高分子量の範囲にスメアの形成がみられ、これはポリユビキチン化された FIP200 を示していると考えられた。さらに FIP200 の細胞内での安定性に対する MUL の影響を検討した。FIP200 と野生型の MUL(WT)もしくはユビキチンリガーゼ活性を欠失した MUL(Δ RB)の発現ベクターをそれぞれ HEK293T 細胞に遺伝子導入し、シクロヘキシミドの存在下で培養して、回収後溶解した上でイムノブロットにより FIP200 の発現量を確認した。すると MUL(WT)との共発現では FIP200 の分解が促進されたが、MUL(Δ RB)とではその分解促進効果が認められず、MUL を発現させていないときよりも分解が遅延した。これらの結果から MUL は FIP200 と結合し、これを基質としてポリユビキチン化しプロテアソーム系を介した分解を進めることが示唆された。オートファジーを誘導させることで、MUL と FIP200 の相互作用にどのような影響が生じるかを検討した。FIP200 と FLAG-MUL の発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、飢餓刺激を加えたものと加えないものに分けて細胞を回収し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、抗 FIP200 抗体でイムノブロットした。細胞溶解液での発現量はほとんど変化ないにもかかわらず、飢餓刺激を加えた場合に MUL と共免疫沈降された FIP200 のタンパク質量が減少していることが認められた。これによりオートファジー誘導下では MUL と FIP200 との結合親和性は減弱することが考えられた。

【考察】今回の研究において、酵母ツーハイブリッド法により MUL と相互作用するタンパク質として FIP200 を同定した。MUL のカルボキシル基側の 292 アミノ酸配列を bait として用いたため、FIP200 との結合部位はこの部位に含まれていると考えられる。スクリーニングされた FIP200 の断片化された cDNA はカルボキシル基側の 400 アミノ酸の中に集中していた。細胞内での結合実験でもこのカルボキシル基側 400 アミノ酸配列の中に MUL との結合部位が含まれていることが判明した。MUL との結合が確認された FIP200 はその MUL によってポリユビキチン化され、プロテアソーム系を介したタンパク質分解を受けた。したがって、MUL は FIP200 に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが示唆された。FIP200 は細胞内でさまざまな機能を有すると考えられており、MUL はその制御因子として機能することが考えられた。今回の結果から、MUL と FIP200 の結合は、飢餓状態でオートファジーを誘導するとその親和性が低下することが判明した。このことから通常状態では MUL によって分解されることで負の制御を受けている FIP200 は、飢餓などの刺激でその親和性が低下し MUL と離れ ULK-Atg13-FIP200 複合体を形成することでオートファゴソーム形成を促進する方向に働くのではないかと推測される。アルツハイマー病でも、大脳皮質や海馬の変性した神経細胞内にオートファジー小胞の異常な蓄積が認められておりその病態にオートファジーの関与が示唆されている。また、アルツハイマー病患者の脳において、後頭葉で MUL の発現量が上昇していることも報告されている。さらに、神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞系で MUL をノックダウンしたところ細胞生存性が低下することが報告されている。以上より、MUL は FIP200 を介してオートファジーを制御することで神経保護的に働いているのではないかと推測される。

【結論】今回、MUL はオートファジー関連因子の一つである FIP200 を基質として認識しポリユビキチン化して分解することが判明した。さらに、その結合親和性がオートファジーを誘導したときに低下することが判明した、以上より、MUL がオートファジー機構の制御に関与する可能性があることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

FIP200結合性 E3ユビキチンリガーゼ MUL による オートファジー誘導制御の可能性

Mulibrey 小人症は胎児期発症の成長不全を呈する常染色体劣性遺伝疾患であり、MUL 遺伝子の変異によって生じる。MUL タンパク質はユビキチンリガーゼとして自己ユビキチン化能を有することが報告されているが、その細胞内機能はほとんど解明されていない。

今回の研究において、酵母ツーハイブリッド法によって MUL 結合タンパク質のスクリーニングを行い Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa (FIP200) を同定した。最近、FIP200 はオートファジーの制御に関わることが報告されている。オートファジーはさまざまな神経変性疾患に関わっており、MUL と FIP200 の相互作用を解析することで病態の解明につながると考えた。

HEK293T 細胞に MUL と FIP200 を発現させ、免疫沈降法によってこれらが結合することを明らかにした。In vivo ユビキチン化アッセイにより、FIP200 が MUL によってポリユビキチン化されることが明らかとなった。また、パルスチェイスアッセイにより MUL との共発現で FIP200 の分解が促進されることが判明した。これらのことより、FIP200 が E3 ユビキチンリガーゼ MUL の基質である可能性が示唆された。さらに、オートファジーを誘導させることにより、MUL と FIP200 の親和性が低下することを明らかにした。したがって、栄養が保たれた状態では FIP200 は MUL によりユビキチン化され分解されているのに対し、飢餓刺激が入ると親和性が低下して ULK1/2 や Atg13 との複合体形成が促進されることでオートファゴソームが形成されることが推測された。これまでにアルツハイマー病において機能不全に陥ったオートファゴソームの異常な蓄積が変性した神経細胞に認められている。以上より、アルツハイマー病の脳における異常亢進したオートファジーに対して、MUL が FIP200 を介して抑制的に働き神経保護的な機能を有する可能性が示唆された。

副査の佐々木秀直教授から、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において MUL や FIP200 の組織での発現について質問がなされた。発表者は、MUL は正常組織では脳などの神経細胞や精巣、膵臓での発現が高いこと、アルツハイマー病患者の脳で MUL の発現が高い報告があるがそれ以外の変性疾患での報告はまだないことを回答

した。FIP200 の発現に関する報告はまだ確認していないことを回答した。ここで同教授より神経変性疾患における MUL と FIP200 の病理学的検討を行うよう助言があった。次いで副査の畠山鎮次教授から、Mulibrey 小人症において遺伝子変異の違いによる病態の差異はみられるか、との質問があった。発表者は、変異の違いによる臨床症状の差は認めないことを文献を引用して回答した。さらに細胞接着や細胞遊走への影響について検討しているか質問がなされた。発表者は腫瘍に関連して細胞接着や細胞遊走などへの影響は今後検討すべきであるとした上で、まず神経変性疾患に関わるオートファジーの関与を優先的に検討したことを回答した。また、MUL の変異により FIP200 を介して細胞の移動などの機能障害が生じることが Mulibrey 小人症の病態と関係する可能性について検討することの助言を頂いた。さらにこの研究においてプロテアソームインヒビターが与える影響についてどのように推測されるかという質問がなされた。発表者は、プロテアソームインヒビターにより MUL による FIP200 の分解が阻害されるとオートファジー誘導が促進され、特にアルツハイマー病において異常に亢進したオートファジーを抑制することができずに神経変性が進行することが推測されると回答した。最後に主査の田中伸哉教授から、自己転写活性能を有する MUL の欠損株を作製する際にどのように部位を選択したか、という質問があった。他の TRIM ファミリータンパク質の報告から TRIM ドメインに転写活性能があることが予想されたためアミノ末端からの欠失部位を段階的に広げた truncate を 4 種作製しその最も短い断片で自己転写活性能が十分低下することを確認して、その後の実験に用いたことを回答した。またスクリーニングで同定されたタンパク質は FIP200 だけであるかという質問がなされた。得られた 6 つの陽性クローンのうち 4 つが FIP200 であったが、残りのうち 1 つはタンパク質をコードしておらず、もう 1 つは転写に関わるタンパク質であったためさらなる解析をしていないことを回答した。さらに、神経変性疾患で組織の免疫染色を行った場合、MUL や FIP200 がどのような発現パターンをとることが予想されるか質問がなされた。変性疾患においてオートファジーが異常に亢進した病変で MUL や FIP200 の発現が高まっていることが予想されることを発表者は回答した。

この論文は、MUL の細胞内機能の解明への手がかりの一つとして高く評価され、FIP200 を介したオートファジーへの影響について更なる発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判定した。