

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：上西達也

所属機関名・部局名・職名：大阪大学大学院医学系研究科 助教

(3) 研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。）

オートファジー抑制因子 Rubicon の機能発現機構の解明

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：中川敦史（研究室名：超分子構造解析学）

(5) 研究成果の概要（公開）

オートファジーは全ての真核生物に保存されている現象で、飢餓条件下において細胞がエネルギー源確保のために行う自己消化作用として知られている。しかし実は通常状態でもオートファジーは働いており、必要に応じて不要物を分解することで細胞の恒常性の維持に寄与していることが次第に明らかになってきた。近年では、ヒトでのオートファジー機能の低下が、神経性疾患、糖尿病や動脈硬化、痛風、がん、クローン病など様々な疾患の発症に繋がっていることが示唆されている。オートファジーが誘導されると、まず細胞質内で扁平な脂質二重膜構造(隔離膜)が形成され、タンパク質やオルガネラを包み込むようにして伸長する。次に隔離膜の先端部が融合し、閉じた脂質二重膜のオートファゴソームが形成された後に、その外膜がリソソームと融合する。こうして生じたオートリソソームの内部で、内膜とともに取り込まれた細胞質成分が分解される。この一連のプロセスに決定的な役割を果たすのが、VPS15 および BECN1 と VPS34 が形成するクラス III PI3K (phosphoinositide 3-kinase)であり、ATG14 と結合した複合体は初期過程のオートファゴソームの形成に必須である。また ATG14 の代わりに UVRAG と結合すると、後期過程のオートファゴソームとリソソームの融合のみならずエンドサイトーシス経路も促進するが、さらに Rubicon が結合すると一転してこれらを抑制するようになる。加えて個体レベルでも、Rubicon の発現上昇によるオートファジー機能の低下が肝障害を引き起こすことや、加齢に伴い増加する Rubicon を抑えるとオートファジーが活発化し、モデル生物の老化現象が改善するだけでなく寿命が伸びることが明らかになった。こうしたことから、Rubicon を標的とした小分子化合物が今まで有効な薬物治療が存在しなかった脂肪肝の治療や健康寿命の延伸に効果を発揮するのではと期待されている。

そこで理化学研究所の長田裕之博士のグループとの共同研究で、独自に開発された化合物アレイ法を用いて、Rubicon に結合する小分子のスクリーニングを行ったところ、有力な候補として化合物 X が得られた(ここでは名前を伏せる)。さらに、現所属研究室で開発された tandem fluorescent LC3(tfLC3)法を用いて、この小分子が Rubicon に物理的に結合するだけでなく、その機能を阻害するかどうかを検討したところ、化合物 X は濃度依存的にオートファジーを促進する、すなわち Rubicon の機能を阻害することが明らかになった。また Rubicon がリソソームとの融合を負に制御していると、オートファゴソームに蓄積する LC3 を特異的な抗体で検出できるが、化合物 X の存在下では Rubicon による抑制が解除され、LC3 がオートリソソームで効率的に分解されていることから、同様の結論が導かれた。

このように、化合物 X は Rubicon を標的とした新規薬剤の候補として非常に魅力的であるものの、いかなる機構によりその効果を発揮しているのか現時点では全く不明である。そもそも Rubicon がクラス III PI3K と協働してオートファジーを負に制御しているメカニズムについても曖昧な点が多く、それ以外にも多数のタンパク質と相互作用することが報

【2021 研究成果報告書（共同研究員・NMR・クライオ・客員フェロー）】

告されているものの、Rubicon の立体構造もその殆どが明らかになっていない。したがって本研究では、Rubicon と化合物 X の複合体の構造解析を行うことで化合物 X の作用機序を解明するだけでなく、Rubicon 単体および他のタンパク質との複合体の構造解析を行うことでそのオートファジー抑制機構を明らかにすることを目的としている。

2021 年度には、ドメインを欠損させた Rubicon の複数の変異体にエピトープタグを導入し、それぞれが小分子を架橋したセファロースビーズと結合するかどうかを調べたところ、C 末端側の一部の領域がこの小分子との相互作用に重要であることを示唆する結果を得た。また Rubicon との相互作用が既に報告されているタンパク質と上記のドメイン欠損変異体をヒト培養細胞で一過性に発現させ、両者が共沈する組み合わせ・条件を検討したところ、結合に必要とされているドメインに依存した相互作用を 14-3-3 タンパク質および NEMO について確認できた。さらに、研究室で実施されたインタラクトーム解析から複数の新規因子を得ており、その中の膜タンパク質との相互作用を調べたところ、両者が共沈することを見出した。