

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 3 月 27 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 東京医科歯科大学 難治疾患研究所
職 名 准教授
研 究 代 表 者 山野晃史

下記のとおり令和5年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号: 23009)

1. 共同研究課題名	線虫のミトコンドリアクリアランスにおける新規オートファジー因子の生理機能解析				
2. 共同研究目的	申請者らは哺乳類培養細胞を用いて、新規オートファジー関連因子(BCAS3 と C16orf70)の同定に成功したが、生理機能の理解のためには個体解析を進めることが不可欠である。そこで、生体膜機能分野との共同研究により、線虫の選択的オートファジーにおける BCAS3/C16orf70 の生理機能を明らかにする。本研究はオートファジー不全が引き起こすヒト疾患の発症理解の突破口となると期待される。				
3. 共同研究期間	令和5年4月1日 ～ 令和6年3月31日				
4. 共同研究組織					
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担		
(研究代表者) 山野 晃史	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	准教授	研究の総括		
(分担研究者) 小島 和華	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	学 振 特 別 研 究 員 PD	培養細胞を用いた実験・解析、実験材料の作製		
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	生体膜機能分野	氏 名	佐藤美由紀教授	

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

エネルギー産生や代謝の場となるミトコンドリアは、機能不全となった際や、受精や分化などの特定の生体イベント時に、オートファジーによって分解されることが知られている。BCAS3 および C16orf70 は、2021 年に申請者らが同定した新規オートファジー関連因子である (Kojima W. et al. **Autophagy** 2021)。培養細胞を用いた実験から、BCAS3 と C16orf70 は複合体 (PHAF 複合体) を形成し、伸張途中のオートファジー膜 (隔離膜) に局在することを見出した。しかし培養細胞では、それらの遺伝子ノックアウトでも LC3 の脂質化修飾や p62 の蓄積が見られなかった。一方、近年 BCAS3 は脳内鉄沈着を伴う神経発達障害の原因遺伝子であることが報告された。このような背景のもと、本研究ではまず、オートファジー活性を高感度に検出できる培養細胞の実験系を利用して、BCAS3 ノックアウトや C16orf70 ノックアウトにおけるオートファジー活性阻害を評価する。さらに、PHAF 複合体の生理的な機能を理解するためには、受精や分化などの特定の生体イベント時のミトコンドリア分解を *in vivo* で解析する必要がある。

本研究では高感度にオートファジーをモニターできる HaloTag プロセッシングアッセイを用いて、BCAS3 や C16orf70 の遺伝子ノックアウトによって、オートファジーに阻害が見られるかを検証する (ヒト培養細胞)。さらに生体調節研究所・生体膜機能分野との共同研究により、モデル生物である線虫を用いて、PHAF 複合体の生理機能の解析を目指す。具体的には、線虫個体でも哺乳類細胞と同様に、PHAF 複合体が隔離膜に局在するかを検討する。また、それぞれの遺伝子発現を抑制した条件で、体細胞におけるオートファジー、および受精時の精子ミトコンドリアを分解するオートファジーの進行に影響が出るかどうかを検討する。さらに PHAF 複合体は隔離膜の伸長に重要と考えられるため、顕微鏡観察によって精子ミトコンドリア分解時の隔離膜の形態を詳細に観察する。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

<ヒト培養細胞を使った結果>

アミノ酸飢餓による非選択的オートファジーや Parkin 依存性ミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) を誘導すると、ヒト培養細胞において、BCAS3 と C16orf70 は伸張途中の隔離膜 (あるいはオートファゴソームの形成場) へと集積する。BCAS3 と C16orf70 は恒常的に安定な複合体 (PHAF 複合体) を形成しており、片方の遺伝子をノックアウトすると、もう片方のタンパク質の隔離膜への集積が阻害されることを見出している。BCAS3 は N 末端に短い非天然変性領域、中央に WD40 ドメイン、C 末端に長い非天然変性領域を持つ。また、AlphaFold2 を利用した構造モデリングから、WD ドメイン内にも複数の長いインサート領域が存在することがわかった (図 1)。また、神経発達障害を引き起こす BCAS3 変異の多くはナンセンス変異とフレームシフト変異であるため、機能喪失型であると予想される。

本研究ではまず、BCAS3 の疾患変異体が、アミノ酸飢餓によって誘導される隔離膜に集積するかを調べた。BCAS3 の隔離膜への集積を共焦点顕微鏡で観察したところ、ほとんどの疾患変異体はその移行が顕著に阻害されることがわかった。BCAS3 タンパク質の中央部分に存在する WD40 ドメインは PI3P (隔離膜に含まれるリン脂質) 結合能をもち、そのドメインは隔離膜移行に必須であることを申請者らは以前に報告している。しかし、G681Wfs*18 や Q728*変異では C 末端は欠失しているものの、WD40 ドメインはインタクトである。そこで、C16orf70 との相互作用領域は BCAS3 の C 末端に存在し、BCAS3 疾患変異体は C16orf70 と相互作用できないために隔離膜に集積できなくなったという仮説を立てた。BCAS3 疾患変異体と C16orf70 の相互作用は Fluoppi という方法 (細胞内に人工的な液-液層分離を形成させ、タンパク質-タンパク質間相互作用を可視化する技術) で検証した。その結果、BCAS3 の C16orf70 結合領域は WD40 ドメインのインサート領域に加えて、C 末端の非天然領域にも存在することがわかった (図 1)。

次に BCAS3 ノックアウト細胞 (BCAS3 KO HeLa) でのオートファジー活性を HaloTag プロセッシングアッセイ

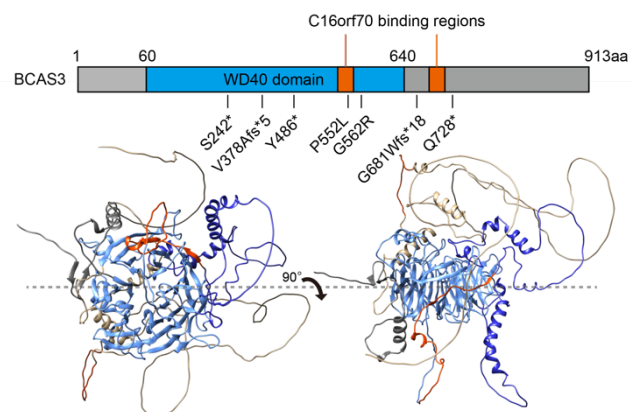


図 1: BCAS3 の疾患変異と構造モデル

で調べた。HaloTagとGFPの融合タンパク質であるHalo-GFPは、通常オートファジーによって分解されるが、Halo リガンドを添加することで HaloTag 部分のみがリソソームでの分解に耐性を示す。非常に高感度でオートファジー活性を検出できる方法である。その結果、アミノ酸飢餓での HaloTag の分解量が、BCAS3 遺伝子のノックアウトによって遅延することがわかった。重要なことに、BCAS3 KO HeLa に野生型 BCAS3 を入れ戻すと HaloTag の分解量は増加したが、BCAS3 疾患変異体では、そのような分解量の回復が見られなかった。これらの結果は BCAS3 の疾患変異がオートファジーの活性低下を引き起こすことを強く示唆している。

<線虫を使った結果>

BCAS3 および C16orf70 のホモログは線虫においても高度に保存されているが、これまで全く解析されていない。これら因子が動物個体でオートファジーに関与するかを検証するため、受精時の精子ミトコンドリアオートファジー（アロファジー）への関与を検討した。野生型では、受精後速やかに精子ミトコンドリア周囲にオートファゴソームが形成され、16 細胞期までにほとんどの精子ミトコンドリアが分解される。一方、BCAS3 ホモログの遺伝子欠損、または C16orf70 ホモログのノックダウンを行うと、オートファゴソーム膜の形成が遅延し 16 細胞期以降でも精子ミトコンドリアが残存することを見出した。さらに BCAS3 または C16orf70 ホモログと GFP の融合タンパク質を線虫生殖腺で発現するトランスジェニック線虫を作製したところ、受精後にこれら因子が精子ミトコンドリア周囲に局在する様子が観察された。このように BCAS3 および C16orf70 ホモログが動物個体内でオートファジーに関与することが明らかとなった。今後は、さまざまなオートファジー関連変異体やマーカー株との掛け合わせ、ライブイメージングなどを行い、アロファジーのどの段階で働くのかを詳細に検討する予定である。一方で、64 細胞期付近の胚全体で誘導されるオートファジーに対しては、これら因子の遺伝子欠損株またはノックダウンにおいても明らかな影響は見られなかったことから PHAF 複合体は特定のオートファジー経路で特に重要な働きをしている可能性が考えられる。この点についても、さまざまなオートファジーマーカー株を用いてさらなる検討を行う予定である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

（本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。） 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@ml.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

第 15 回オートファジー研究会, 2023 年 11 月 27 日-30 日, 「BCAS3-C16orf70 複合体の機能解析」小島和華, 松田憲之, 山野晃史(ポスター発表)

内分泌・代謝学共同研究拠点成果報告会・ワークショップ, 2023 年 12 月 15 日, 「マイトファジーを利用した新規オートファジー因子の探索と機能解析」小島和華(口頭発表)

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

定期的なメールによる情報交換と Zoom による進捗状況の確認・研究討議。

群馬大学で開催された内分泌・代謝学共同研究拠点成果報告会・ワークショップ(2023 年 12 月 15 日)において、申請分担者である小島が口頭発表。その後、対面による情報交換。

申請代表者が群馬大学生体調節研究所を訪問し(2024 年 2 月 28 日-29 日)、対面による情報交換。共同研究の進捗状況の確認と今後の研究の方向性について討議。