

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 7 年 3 月 31 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 東京科学大学(旧・東京医科歯科大学)
職 名 准教授
研究代表者 山野 晃史

下記のとおり令和6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	線虫を利用した新規オートファジー制御因子によるミトコンドリア分解機構の解明			
2. 共同研究目的	申請者らは 2021 年に哺乳類培養細胞を用いて隔離膜に集積する新規オートファジー制御因子である BCAS3-C16orf70 複合体を同定したが、そのオートファジーにおける制御機構と生物個体における生理機能は不明なままである。そこで、生体膜機能分野との共同研究により、線虫の精子ミトコンドリア分解の過程に BCAS3-C16orf70 複合体のオートファジーとしての機能が必要であることを検証する。			
3. 共同研究期間	令和6年4月1日 ～ 令和7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	東京科学大学(旧・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	東京科学大学(旧・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

ヒト BCAS3 はその機能欠失変異(loss of function)により、脳内鉄沈着を伴う神経発達障害が引き起こされる。申請者らは、Halo タグを利用したオートファジー活性測定法を利用して、BCAS3 の遺伝子欠損(および BCAS3 の相互作用パートナーである C16orf70 の遺伝子欠損)が、飢餓時のオートファジー活性を低下させることを見出した。さらに、BCAS3 の疾患由来変異体を発現させても、オートファジー活性の回復が見られなかった(培養細胞: 小島ら未発表データ)。そこで本研究ではヒト BCAS3 と C16orf70 の線虫ホモログをクローニングし、線虫 BCAS3 遺伝子に疾患変異を導入する(申請者研究室)。そして、それらの変異体を線虫の BCAS3 ホモログ欠損変異体で発現させ、アロファジーに影響が見られるかを検討する(生体膜機能分野)。また、野生型の BCAS3-C16orf70 複合体は隔離膜に集積する。そこで BCAS3 の疾患由来変異で、その集積がどう変化するか、顕微鏡観察で詳細に観察する(生体膜機能分野)。

7. 共同研究の成果

計 13 種類の BCAS3 の疾患由来変異体を発現するプラスミドを構築し、哺乳類培養細胞(BCAS3 ノックアウト HeLa 細胞)に安定発現させた。そして、アミノ酸飢餓または Parkin による損傷ミトコンドリア分解を誘導し、これらの BCAS3 変異体がオートファジーの膜(隔離膜)に集積できるかを観察した。その結果、ほとんどの疾患由来変異が隔離膜への局在を阻害することが明らかになった。

さらにこれらの疾患変異におけるオートファジー活性を Halo タグを利用したアッセイで検討した。Halo タグを利用する実験系は、アミノ酸飢餓の誘導とともにオートファジー活性をパルスラベルすることができるため、高感度にオートファジー活性を検出することができる。その結果、ほとんどの疾患由来変異でオートファジー活性が低下すること、また、隔離膜局在能を失なう変異体では、必ず、オートファジー活性を失なうため、BCAS3 の隔離膜への集積がオートファジーの活性に必須であることがわかった(図 1)。

さらに、これらの疾患由来変異はいずれも、stop コドンを生じることにより C 末端側の BCAS3 と C16orf70 の相互作用部位を欠損させるものであった。BCAS3 と C16orf70 の相互作用はこれらの複合体の隔離膜局在に必須であることは申請者が以前の研究で明らかにしている。今回の研究により、疾患由来変異は C16orf70 との相互作用に影響することで隔離膜局在を阻害し、オートファジー機能を消失させることが示唆された。

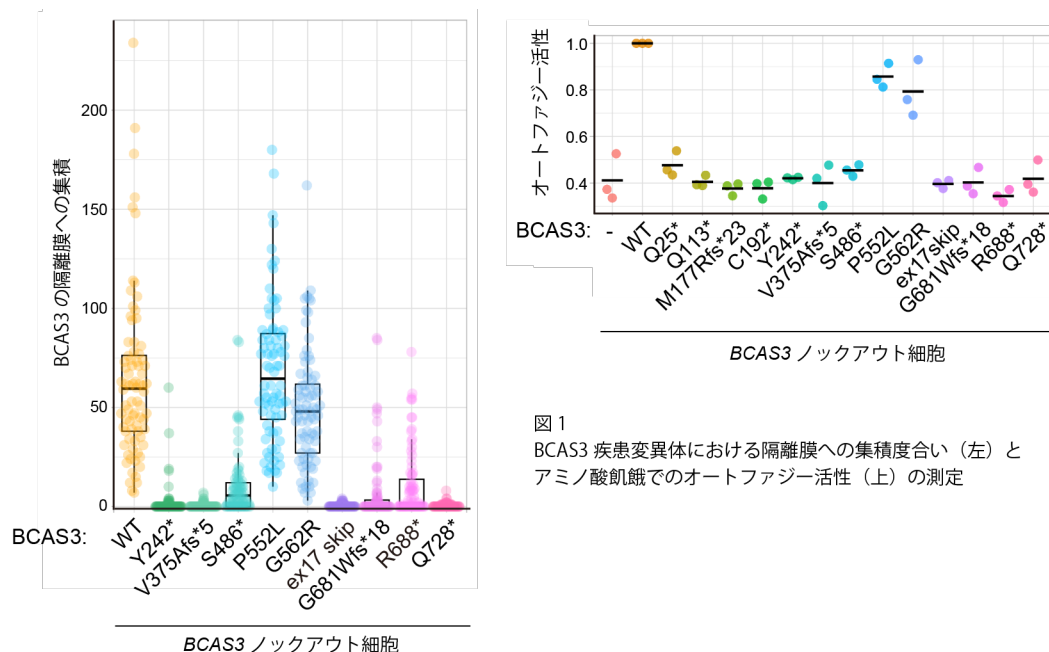


図 1
BCAS3 疾患変異体における隔離膜への集積度合い(左)と
アミノ酸飢餓でのオートファジー活性(上)の測定

また、線虫における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 BCAS3 や C16orf70 ホモログの関与を検討したところ、BCAS3 ホモログの遺伝子欠損変異体ではアロファジーに異常を示した。また、C16orf70 ホモログの変異体はストックセンターに存在しなかったため、ゲノム編集により欠損変異体を作製したところ、BCAS3 ホモログ変異体同様にアロファジーに異常がみられた。これらの変異体では精子オルガネラを取り

囲む隔離膜の形成が不完全であったことから、膜の伸長に異常が生じている可能性が考えられた。

また、GFP-BCAS-3 を生殖腺で発現する株を作製したところ、隔離膜近傍への集積が観察された。今後は疾患由来変異を導入した GFP-BCAS-3 を作製し、相補活性や局在性を検討する予定である。

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@jimu.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16回オートファジー研究会(静岡)、口頭発表、2024年10月15日、
ヒト神経疾患に関連した BCAS3-C16orf70/PHAF1 複合体の機能解析
小島 和華、松田 憲之、藤田 尚信、山野 晃史

・第16回オートファジー研究会(静岡)、口頭発表、2024年10月15日、
線虫父性ミトコンドリア分解における PI3P 結合タンパク質 BCAS3 ホモログの機能解析
法月 拓也、佐々木 妙子、小島 和華、山野 晃史、松田 憲之、佐藤 健、佐藤 美由紀

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。
学会参加時に対面で研究内容について議論(細胞生物学会、オートファジー研究会など)。