

## 学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	渡邊 貴子
論文審査担当者	主 査 清水 重臣 副 査 吉田 雅幸、仁科 博史
論文題目	Cycloheximide inhibits starvation-induced autophagy through mTORC1 activation
<p style="text-align: center;">(論文内容の要旨)</p> <p>&lt;要旨&gt;</p> <p>シクロヘキシミド (CHX) のようなタンパク質合成阻害剤は、オートファジーを含むタンパク質分解を抑制することが知られる。CHX がオートファジーを抑制する機序は、これまで新規に合成されるタンパク質がオートファジーに必須なのだと解釈されてきた。しかし、CHX は細胞内アミノ酸レベルを上昇させることによりオートファジーの主要な抑制性制御因子である mTORC1 を活性化させることでも知られる。したがって、CHX はオートファジー活性を新規タンパク質合成抑制および／もしくは mTORC1 シグナルを修飾することによりオートファジーに影響しうる。本研究では、オートファジーに特異的なマーカーを用いて CHX のオートファジーに対する効果を調べ、CHX は飢餓誘導オートファジーを抑制するが、mTORC1 抑制剤 Torin1 誘導オートファジーは抑制しないことを示した。CHX はまた、同じく mTORC1 に制御されるオートファジー形成過程の初期マーカーである飢餓誘導 GFP-ULK1 点状構造物の形成も抑制した。CHX はオートファジーを誘導しうる飢餓条件下でも mTORC1 を活性化した。そして、CHX による飢餓誘導オートファジーの抑制効果は、Torin1 によって解消された。以上より、CHX は mTORC1 活性化を介して飢餓誘導オートファジーを抑制すること、及び少なくとも飢餓急性期にはオートファジーは新規タンパク質合成を必要としないことが示唆された。</p> <p>&lt;諸言&gt;</p> <p>オートファジーは細胞内の主要な分解機構であり、二重の膜によって細胞内成分を取り囲み、リソソームと融合し、リソソーム内の酵素によって内容物および内側の膜が各栄養素の構成単位まで分解される。オートファジーは mTORC1 に抑制的に制御されており、mTORC1 が抑制されることによりオートファジー関連タンパク質の翻訳後修飾および関連脂質の修飾により制御されていると考えられている。しかし、最近の研究では、転写制御も関与していることが示唆されている。</p> <p>70-80 年代の研究でシクロヘキシミド(CHX)などのタンパク質合成阻害剤が、タンパク質分解もまた抑制する、ということが示されていた。より近年の研究では、相反する結果が報告されている。出芽酵母において、液胞内に蓄積する飢餓誘導オートファジーが CHX 投与によって強力</p>	

に抑制される、という報告がある一方、mTORC1 抑制剤誘導オートファジーは CHX 投与でサイズが小さくなるものの誘導は阻害しなかった、という報告がある。哺乳類細胞では、CHX はオートファゴソーム形成を阻害するという報告がある一方で、CHX を 3 時間前投与すると、オートファジー誘導には影響ないが、リソソームとの融合を阻害する、という報告もある。これらの報告は、いずれも CHX がオートファジーを抑制しているが、抑制する段階は各報告により異なるようである。そして、ほとんどの研究は新規合成タンパク質がオートファジーに必要であると提唱している。

タンパク質合成を阻害することは、細胞内アミノ酸消費量を減少させることで細胞内アミノ酸濃度を上昇させる。CHX が細胞内アミノ酸濃度を上昇させることで主要なオートファジーの抑制性制御因子 mTORC1 を活性化させることはよく知られている。したがって、CHX がオートファジーを抑制する機序として、新規合成タンパク質の抑制および mTORC1 シグナル経路の修飾の二つが考えうる。本研究では、オートファジー特異的マーカーを用いて CHX がオートファジーを抑制するのか、抑制するならばどの段階で抑制するのかを調べた。

#### <方法>

オートファジー関連蛋白である LC3 および ULK1 に緑色蛍光タンパク質 GFP を連続させた GFP-LC3 および GFP-ULK1 をトランスジェニックしたマウスから確立した GFP-LC3 発現マウス線維芽細胞(MEF)および GFP-ULK1 MEF を用いて、CHX がオートファジーに与える影響を観察した。また、細胞内シグナル分子の動態を調べるために HEK293T 細胞、MEF の溶解液をタンパク質変性剤で処理し、ウェスタンブロット法にて目的のタンパク質を検出した。アミノ酸飢餓には、アミノ酸を除いた DMEM 培地に 10%透析血清を添加した培地を用いた。

#### <結果>

オートファジー関連タンパク質である LC3 は、通常 LC3-I 型として細胞質に存在し、オートファジーが誘導されると脂質と共有結合した LC3-II 型となる。アミノ酸飢餓および Torin1 でオートファジーを誘導すると LC3-II 型が増加する。CHX の 5 分間前投与によって飢餓下の LC3-II 型増加が抑制されたが、Torin1 投与下の LC3-II 型は増加したまま変化しなかった。GFP-LC3 発現 MEF 細胞では、アミノ酸飢餓および Torin1 投与で GFP-LC3 点状構造物が多数形成されオートファゴソーム/オートリソソームを示す。同様に CHX 前投与により飢餓誘導 GFP-LC3 点状構造物形成は阻害されるが、Torin1 誘導 GFP-LC3 点状構造物形成は阻害されなかった。

CHX 前投与すると 1 時間のアミノ酸飢餓でも mTORC1 の基質 S6K および 4E-BP1 はリン酸化したままであった。

すでにアミノ酸飢餓にさらされている GFP-LC3 発現 MEF でも、CHX 投与で GFP-LC3 点状構造物形成が阻害された。アミノ酸飢餓下でリソソーム阻害剤クロロキン (CQ) を投与すると LC3-II はさらに増加するが、CHX 投与によって CQ による LC3-II 増加は消失した。飢餓下でも CHX 投与で S6K および 4E-BP1 のリン酸化レベルは上昇した。アミノ酸飢餓下、アミノ酸飢餓感知キナーゼとして知られる GCN2 のリン酸化レベルは CHX 投与によって著明に抑制された。

ULK1 は mTORC1 の基質の一つであり、オートファゴソーム形成の初期段階に機能し、閉じ

ていない未完成のオートファゴソーム上にいるが、完全に閉じたオートファゴソーム上には存在しない。飢餓下、GFP-ULK1 点状構造物が多数形成されるが、CHXによって抑制された。したがって、CHXはオートファジー形成の初期段階から抑制していることが示唆される。

45分間のアミノ酸飢餓後30分間CHXを投与した細胞にTorin1を45分間投与したところ、GFP-LC3点状構造物の数は同時間アミノ酸飢餓においた細胞と同程度まで増加した。

以上より、CHXは新規タンパク質合成阻害というより細胞内アミノ酸レベルを上昇させmTORC活性化を通して初期段階からオートファジーを抑制すること、飢餓誘導オートファジーは新規タンパク質合成を必要としないことが示唆された。

#### <考察>

本研究の知見より、CHXは細胞内アミノ酸プールを増加させ、mTORC1活性化を通して飢餓誘導オートファジーを抑制することを提唱する。この仮説は、タンパク質合成阻害剤がオートファジーを抑制するのは短寿命のタンパク質の新規合成がオートファジーに必須であるため、とする過去研究の仮定とは異なる。CHX投与下、Torin1投与でオートファジーを誘導しうることは、少なくともわれわれの実験系では飢餓誘導オートファジーは新規合成タンパク質を必要としないことを示唆する。しかし、より長期の飢餓で転写および翻訳制御が重要である可能性は否定できない。近年、いくつかの転写因子がオートファジー制御に関与していることが示唆されている。FoxOファミリーの転写因子はオートファジーを修飾し、TFEB、ZKSCAN3、p53、E2F1、NF- $\kappa$ Bもいくつかのオートファジー遺伝子発現を誘導しうる。特にオートファジーに必須の因子LC3/Atg8はオートファジーによって分解されるため、その発現レベルを回復させることは重要であることが予想される。

また、本研究の知見から、CHXはタンパク質代謝回転アッセイには注意深く用いるべきことが再強調される。とくにタンパク質の半減期を測定する伝統的手法であるラジオアイソトープを用いた「パルス-チェイス実験」は、新規合成タンパク質供給を止めるためしばしばCHX投与下で行われる。しかしながら、CHXはオートファジーを強力に抑制するため、オートファジーによって選択的に分解されるタンパク質の半減期が人工的に長く測定されてしまう可能性がある。ゆえに、このような実験は分解におけるオートファジーの寄与が無視しうる程度の場合のみ用いるべきであることを推奨する。

## 論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲 第 4 6 6 2 号	渡邊 貴子
論文審査担当者	主 査 清水 重臣 副 査 吉田 雅幸、仁科 博史	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)を細胞に投与すると、飢餓誘導性オートファジーが抑制されるという知見は、古くから知られていた。しかしながら、この現象がどのようなメカニズムによって実行されているかは不明であった。</p> <p>そこで申請者は、(1)飢餓誘導性オートファジーの実行には新たに合成される蛋白質が必要である可能性、(2)蛋白質合成が抑制されているため、飢餓誘導にも関わらずアミノ酸濃度が維持されている可能性、の2つの仮説をたて、本論文において、その検証を行なった。その結果、1) CHXは飢餓誘導性オートファジーを抑制するが、mTORC1 阻害によって誘導されるオートファジーは抑制しないこと(即ち、オートファジー実行に必要な分子は備わっている)、2) CHX の作用部位は、オートファジー機構より上流である事(オートファジー形成の最上流で見られる ULK1 の点状構造物が見られないため)、を見出し、仮説(1)は否定的である事を示した。さらに、細胞内アミノ酸プールの多寡を、アミノ酸センサー分子 GCN2 のリン酸化で評価した時に、CHX 投与は飢餓時の細胞内アミノ酸濃度を高く維持していた。これらの結果は、CHX による飢餓誘導性オートファジー抑制の作用点が、細胞内アミノ酸濃度の維持であることを支持している。</p> <p>本研究は、これまで明らかにされていなかった、CHX による飢餓誘導性オートファジー抑制機構の一端を明らかにした研究であり評価できる。</p>		