

氏 名 庄 司 志咲子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第724号

学位授与の日付 平成15年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 AUTOPHAGY IS INVOLVED IN THE DEGRADATION  
OF MISFOLDED PROTEINS IN MAMMALIAN CELLS

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 徳永 万喜洋  
教授 荒木 弘之  
教授 山尾 文明  
助教授 平田 たつみ  
教授 大野 博司（金沢大学）

## 論文内容の要旨

This study provides a first direct evidence that autophagy suppresses intracellular abnormal protein accumulation related with disease.

Misfolded proteins expressed in cells, which have escaped chaperon mediated refolding or proteasome-dependent degradation, accumulate and aggregate. Aggregates of misfolded and damaged proteins might have several detrimental effects on cellular function by interfering with cellular processes for physical or mechanical reasons. Now, a large number of diseases are recognized as ‘conformational diseases’, caused by adoption of non-native protein conformations that lead to aggregation.

Current studies focus on the degradation pathway by which cells protect themselves from toxicity associated with protein misfolding and aggregation. The major cellular degradation systems for protein and organelle turn over are ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy. Autophagy is an intracellular degradation system in which cytoplasmic components, including organelles, are directed to the lysosome/vacuole by a membrane-mediated process. A linkage between UPS dysfunction and pathogenesis of conformational diseases has been well studied. On the other hand, the relationship between autophagy dysfunction and conformational diseases was not clear in previous studies.

In this study, I examined whether autophagy suppresses accumulation of two-type abnormal proteins. One is mutant  $\alpha_1$ -antitrypsin Z (ATZ), which accumulates in endoplasmic reticulum (ER). It is known that accumulation of the mutant ATZ in the ER causes liver injury. Other is expanded-polyglutamine (polyQ), which form aggregate in cytoplasm or in nucleus. The aggregates of proteins containing abnormal long length polyQ-tracts induce neurodegeneration and cell death in cultured cells. To determine whether autophagy is involved in the degradation of these abnormal proteins, I used two specific autophagy marker molecules: Apg5 that is an essential for autophagy and LC3 that is associated with autophagosome membrane.

*Part I* focused on the relationship between ATZ accumulation and autophagic degradation. First, I examined the effects of Apg5 gene disruption on ATZ accumulation. Western blot analysis using anti  $\alpha_1$ -antitrypsin antibody showed the steady-state intracellular level of ATZ was increased in Apg5-deficient (*APG5*<sup>-/-</sup>) mouse ES cells. Intracellular distribution of ATZ showed ER-pattern in both wild type and *APG5*<sup>-/-</sup> cells by fluorescence microscopy using CFP-tagged ATZ (ATZ-CFP). ATZ-CFP fluorescence intensity in *APG5*<sup>-/-</sup> cells was higher than that in wild type. These results indicate that ATZ accumulation in ER is accelerated in

autophagy-deficient cells. Next, I examined the fate of ATZ in *APG5*<sup>-/-</sup> cells by pulse-chase radiolabeling experiments. In *APG5*<sup>-/-</sup> cells, the degradation rate of ATZ was slowed down. This result shows that ATZ is degraded by autophagy. In addition, the result of pulse-chase experiment using various proteasome inhibitors showed that the contribution of autophagy to degradation of ATZ is coequal to that of proteasome. Further, I found that viability of *APG5*<sup>-/-</sup> cells expressing ATZ in presence of proteasome inhibitor was decreased. This result suggests that ATZ is more toxic in cells deficient in both autophagy and ubiquitin-proteasome system.

In *Part II*, I examined whether autophagy is induced by expanded-polyQ aggregation, and whether the poly-Q aggregation is enhanced by autophagy dysfunction. First, I performed western blotting of rat PC12 cells expressing proteins containing polyQ-tracts using anti LC3-antibody to know induction of autophagy. The amount of LC3-II that is the autophagosome membrane binding form of LC3 marked increased in cells expressing abnormal long length polyQ (Q79), which form aggregate. In contrast, such increase of LC3-II was not detected by expression of proteins containing short length polyQs (Q22), which do not form aggregate. To confirm autophagosome formation, I observed GFP- and YFP-LC3 stable transformant expressing long length polyQs (HA-Q79 and Q81-CFP) or short length polyQ tracts (HA-Q22 and Q19-CFP) in fluorescence microscopy. Punctate signals of GFP- and YFP-LC3 indicating autophagy induction were increased in the cells expressing abnormal length polyQs but not normal length polyQs. These results indicate that the formation of polyQ-aggregate induced autophagy. To know that autophagosome encloses polyQ-aggregate, I observed the higher magnified images of cells having polyQ-aggregates in laser scanning confocal microscopy and electron microscopy. Although I could not observe autophagosome enclosing large aggregates, small polyQ-aggregate and polyQ-proteins were detected in ring-structure of autophagosome. This result suggested that autophagosome sequesters small polyQ-aggregates and polyQ-proteins but not its larger aggregates. Next, I examined the effect of autophagy dysfunction on polyQ-aggregation by counting of number of aggregates and western blotting. The number of poly-Q aggregate and the amount of detergent-insoluble polyQ-proteins (aggregated polyQ proteins) were marked increased in *APG5*<sup>-/-</sup> cells. In addition, I found that polyQ-inducing cell death is enhanced in autophagy-deficient cells. These results show that autophagy suppresses polyQ-aggregate formation and reduces its cellular damage.

Taken all together, this study revealed that autophagy is involved in degradation of two-type abnormal proteins, ATZ and polyQ, even though the distribution of these proteins is different. This finding suggests that autophagy is general anti-conformational disease system.

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、オートファジーが異常蛋白質の細胞内蓄積を防いでいることを明らかにし、従来知られている機能の他に、新しい重要な役割を果たしている事を見いだした。

正しくフォールディングされず構造に異常を生じた蛋白質が細胞内に蓄積し凝集体を形成する事は、種々の病気を引き起こし、コンフォメーション病と総称されている。

本研究の独自性は、細胞内の異常タンパク質の分解機構として、真核細胞の主要な分解系の一つであるオートファジーの役割を明らかにした点である。オートファジーは、膜構造体であるオートファゴソームにより細胞中の対象物を包み込みリソソームと融合することによって分解するシステムであり、オルガネラをも対象とする大規模な分解系である。オートファジーが異常タンパク質の分解に関与している可能性がこれまでも考えられてはきたが、直接的な証拠は得られていなかった。この点を解明するため、哺乳動物におけるオートファジー特異的マーカーである LC3 と、オートファジーに必須な *APG5* 遺伝子を破壊したマウス ES 細胞株(*APG5*<sup>-/-</sup>細胞)を用い研究した。

PiZZ と呼ばれる遺伝性肝臓疾患の原因である  $\alpha_1$ -アンチトリプシン変異体 Z(ATZ) について解析した。ATZ はアミノ酸変異による構造異常により、肝細胞の小胞体に蓄積・凝集し病気を引き起こす。本研究は、ATZ の細胞内の蓄積及び凝集量が *APG5*<sup>-/-</sup>細胞で正常細胞(野生型)より増加すること、*APG5*<sup>-/-</sup>細胞に *Apg5* タンパク質を発現させるとその蓄積は低減すること、*APG5*<sup>-/-</sup>細胞内に蓄積した ATZ の局在は ER と同様のパターンを示すこと、ATZ の分解が *APG5*<sup>-/-</sup>細胞では低下していることを明らかにした。

次に、神経変性疾患であるポリグルタミン病における凝集体の蓄積に関して解析した。ポリグルタミン病では、長いポリグルタミン (polyQ) を含むタンパク質が、細胞質や核内に凝集体を形成する。本研究では、このような異常伸張した polyQ を発現させた細胞においてオートファゴソーム膜結合型の LC3-II が増加することを見出し、polyQ 凝集体によりオートファジーが誘導されていることを示した。また、ATZ と同様に、*APG5*<sup>-/-</sup>細胞では野生型よりも polyQ 凝集体の蓄積が増加し、*Apg5* タンパク質を発現させた *APG5*<sup>-/-</sup>細胞では polyQ 蓄積が低減した。これら一連の結果から、オートファジーは細胞内異常タンパク質の分解に関与することが判明した。

さらに、ATZ や polyQ を発現させた *APG5*<sup>-/-</sup>細胞は、生存能力が野生型よりも低下したことから、オートファジーが異常タンパク質の蓄積による細胞への障害を防ぐ点でも重要な役割を果たしていることを示した。

これらの結果は、オートファジーが異常タンパク質蓄積の新たな防御機構であることを明らかにした。また、オートファジーの哺乳動物における多彩な役割の解明に新たな一步を踏み出したという点でも、独自性の高い重要な研究である。

以上、庄司は、オートファジーに関し、新しい機能を果たしていることを見いだしており、関連分野への寄与は大きい。従って、審査委員会は、本研究が学位授与の要件を十分に満たすものと判断した。

公開発表会とそれに続く審査委員会の質疑応答における議論と、提出された論文を基に審議し、専門および関連分野の知識や理解力に関し学位にふさわしいと判断した。英文で書かれた博士論文により、英語に関して十分な実力を有していると判断した。