

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	KHAMBU Bilon
論文題目	Translational repression stabilizes messenger RNA of autophagy-related genes. (翻訳抑制によるオートファージ関連遺伝子の mRNA の安定化)		
(論文内容の要旨)			
細胞は環境の変化を感じし、様々なストレスに応答して自身を保護する機能を備えている。栄養飢餓もそのようなストレスの一つであり、アミノ酸のような栄養素が低下した時に、タンパク質合成をとめて代謝を抑制し、オートファジーと呼ばれる機構を誘導することで対処する。オートファジーは、細胞質内の成分を分解して細胞内に遊離アミノ酸を供給し、アミノ酸飢餓から細胞を保護すると考えられている。オートファジーの実行過程には、哺乳類でオートファジー関連遺伝子(ATG 遺伝子)と呼ばれる 26 個の遺伝子が関与し、その実行機構は分子レベルで解明されつつあるが、その制御機構に関しては未解明の部分が多い。そこで本研究では、オートファジーの制御機構に関する研究を行った。 これまで、オートファジーにおける ATG 遺伝子の発現調節については、系統的な研究は行われていない。そこで本研究ではまず、これら 26 個の遺伝子全てについて、栄養飢餓における mRNA レベルの発現量を HeLa 細胞を用いて調べた。その結果、26 個の遺伝子のうち、ULK1 (ATG1)、LC3B (ATG8B)、そして ATG12 の mRNA 発現量が顕著に増加していた。続いて、栄養飢餓がどのようにしてこれら遺伝子 mRNA の蓄積を導くのかを検討した。すでに述べたように、栄養飢餓によって、タンパク質合成が抑制される。そこで、mRNA 発現とタンパク質合成抑制との関連について調べた。シクロヘキシイミド、アニソマイシン、ピューロマイシンという三種類のタンパク質合成阻害剤で細胞を処理し、ATG 遺伝子 mRNA の発現量を調べたところ、栄養飢餓の場合と全く同じ結果を得た。このことは、タンパク質合成の阻害が三つの ATG 遺伝子 mRNA の蓄積を導くことを示唆する。 mRNA の発現上昇は、一般に転写の活性化によって引き起こされる。そこで、LC3B 遺伝子のプロモーター活性をレポーターアッセイによって検討したところ、アミノ酸飢餓の有無で差は見られなかった。つまり、mRNA の蓄積は転写活性化によるものではないと考えられた。mRNA 蓄積に対する別の可能性として、mRNA の安定化の寄与が考えられる。この可能性を検討したところこれら三つの mRNA は、タンパク質合成阻害時には半減期が二倍以上に増大していることが明らかとなった。つまり、タンパク質合成阻害によって ULK1、LC3B、そして ATG12 の mRNA は安定化され蓄積していくことが明らかとなった。さらに、この安定化には、5'あるいは 3'側の非翻訳領域ではなく、翻訳領域が寄与していることも明らかにしている。 続いて、これら mRNA 安定化の生理的な役割を検討した。これら三つの遺伝子は、栄養飢餓において、タンパク質レベルでは発現が減少していた。従って、オートファジー過程を継続するためには、これらのタンパク質を補充する必要があると考えられる。事実、飢餓時には、これら三つのタンパク質の生合成速度は上昇していた。さらに、siRNA 法によって mRNA の蓄積を阻害したところ、栄養飢餓によって誘導されるオートファジーは著しく阻害された。これらのことから、mRNA の蓄積は対応するタンパク質の合成量を増加させ、オートファジーの持続に重要な働きをしていることが示唆された。 これまで、飢餓におけるタンパク質合成の抑制は、エネルギー消費を抑えることが目的であると考えられてきた。しかしながら、本研究によって、オートファジーを援助する役割も担っていることが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

飢餓状態は少なくとも二つの細胞過程に影響を与えることが知られている。翻訳過程の抑制とオートファジーの誘導である。オートファジー実行過程の分子基盤に対する理解は深まっているにもかかわらず、オートファジー誘導と翻訳抑制との間の相関はよく理解されていない。本研究では、飢餓状態における翻訳抑制が *ULK1*, *LC3B*, *ATG12* という 3 つのオートファジー関連 (*ATG*) 遺伝子の mRNA を安定化させることを見出した。これらの 3 つの遺伝子の mRNA 安定化を通じて、翻訳抑制はオートファジーの持続に役立つ可能性がある。

以前の遺伝学的な解析から、26 個の *ATG* 遺伝子がオートファジーの様々な過程に関与することが示されている。本研究では、これら *ATG* 遺伝子の飢餓状態における発現解析を HeLa 細胞で行い、*ATG1(ULK1)*、*ATG8B(LC3B)*、*ATG12* 遺伝子の mRNA の選択的な上昇を認めた。これら 3 つの遺伝子の発現上昇は、種々の翻訳阻害化合物によっても同様に観察され、飢餓状態における翻訳抑制が *ULK1*、*LC3B*、*ATG12* mRNA レベルを増加させることが示唆された。

mRNA レベルの増加は転写促進によって引き起こされることがよくある。この可能性を検討するために、*LC3B* の 1、2、3、4kb 上流領域を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。飢餓状態においても、ルシフェラーゼ活性及びルシフェラーゼ mRNA レベル共に顕著な増加は見られなかった。これにより、*LC3B* 遺伝子 mRNA の増加は、転写活性化によるものではないと考えられた。次に、転写後の mRNA 安定化の可能性を調べた。発現増加した三つの *ATG* 遺伝子の mRNA 半減期をアクチノマイシン D によって新たな mRNA 合成を遮断することによって測定した。*ULK1*、*LC3B*、*ATG12* の mRNA の半減期は顕著に増大していた。さらに、一連の欠失変異体を用いた検討から、mRNA の安定化は *ATG* 遺伝子転写産物の翻訳領域によって制御されていることが示唆された。

続いて、飢餓状態におけるこれら mRNA 安定化の生理的役割について検討した。mRNA の増大にもかかわらず、*ULK1*、全 *LC3B* 及び遊離 *ATG12* のタンパク質量は飢餓時に減少していた。飢餓状態でオートファジータンパク質がかなりのターンオーバーをしている可能性がある。そこで我々は一つの仮説を立てた。つまり、飢餓時においてオートファジーを持続させるために、ULK1、LC3B、ATG12 タンパク質は安定化された mRNA から新たに生合成して補充されているのではないかと考えた。³⁵S メチオニン、³⁵S システイン代謝ラベルによってこれらタンパク質の生合成を調べたところ、3 つのオートファジータンパク質の生合成は実際に増大していた。一方、飢餓時に増大する mRNA を siRNA 法によって減少させたところ、オートファジー活性は顕著に減少した。これらの結果は、*ULK1*、*LC3B*、*ATG12* の mRNA 蓄積によって、減少したタンパク質プールが補われ、オートファジーの持続に貢献しているという考え方に一致する。

以上の研究はオートファジーの制御機構の理解に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 6 月 23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。