

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	甲 ㉔ 第	号	氏名	丸山 洋子
論文審査担当者	主査	小児科学	高橋 孝雄	
	小児科学	長谷川 奉延	先端医科学	佐谷 秀行
	微生物学・免疫学	吉村 昭彦		
学力確認担当者	岡野 栄之		審査委員長	長谷川 奉延
			試問日	平成27年 4月 6日
(論文審査の要旨)				
論文題名：LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy (LC3Bはp62の選択的オートファジーには必須であるが、恒常的オートファジーには必須でない)				
<p>酵母Atg8はオートファジーにおいて基質と直接作用し、オートファゴソーム内容物を分解に導く。本研究では、Atg8の哺乳動物ホモログmicrotubule associated protein 1 light chain 3 (LC3)およびGABA(A) receptor-associated protein (GABARAP)について、オートファジーの選択的基質であるp62/Sqstm1 (p62)の代謝における機能を検討した。研究に用いたHEK293T細胞は、LC3ファミリーではLC3Bのみを、GABARAPファミリーでは全てを発現していた。LC3BとGABARAPを同時にノックダウンした場合のみ恒常的オートファジーが阻害されたことから、LC3とGABARAPは相補的に機能することが示された。一方、LC3BはGABARAPに比しp62との親和性が高く、LC3B単独ノックダウンではp62が蓄積することから、オートファジーを介したp62の選択的代謝にはLC3Bが必須であることが示された。</p> <p>審査では、オートファジー機能の欠損による具体的な表現型を問われ、オートファジー欠損マウスは生後1日以内に死亡する、肝あるいは神経特異的欠損マウスは各々肝機能障害・肝腫瘍、神経変性疾患様症状を呈する、全身性モザイク状欠損マウスは長期生存可能であるが肝腫瘍が多発する、と回答された。長寿命タンパク質分解アッセイの原理を問われ、細胞を¹⁴C含有培地で培養、タンパク質を非特異的に標識した後¹⁴Cを含まない培地に交換、タンパク質分解により生じたアミノ酸の放射能とタンパク質として残存する放射能を比較すると回答された。p62の蓄積による生体への影響を問われ、本研究では表現型に異常はみられなかったが、過去の報告からユビキチン化タンパクとともに細胞質に凝集体を形成し、nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2)の活性化を介してがん細胞の増殖をきたすと予想される、と回答された。この点に関して細胞質内p62蓄積による病態を解析することが重要と助言された。GABARAPとLC3の発現様式や構造の相違を問われ、Atg8ホモログとして立体構造は共通の特徴を有し、ともにホスファチジルエタノールアミンと結合しオートファゴソーム膜に局在するが、組織により発現レベルや細胞内局在が異なる、と回答された。GABARAPに特異的な機能について問われたが、現時点ではGABARAPに特異的な基質は知られておらず、親和性の高い結合タンパク質についての解析が待たれると回答された。HEK293T細胞を使用した理由を問われ、生化学的解析が容易であり、得られた結果も明確であったためと回答されたが、他の細胞株での再現性も検証すべきとの助言がなされた。さらに飢餓状態での検討も行い、飢餓による大規模かつ非選択的なオートファジーにおけるp62の役割についても検討すべきと助言された。</p> <p>以上、本研究は検討すべき課題を残しているものの、p62の選択的オートファジーにLC3が必須であることを明らかにした点において、有意義な研究であると評価された。</p>				