

「ヒト全遺伝子を対象とした網羅的探索による新規オートファジー遺伝子の発見 —効率的なゲノム編集技術 CRISPR (クリスパー) 法を用いたスクリーニング—

1. 発表者：

守田 啓悟 (東京大学大学院医学系研究科 博士課程4年生)

水島 昇 (東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 教授)

2. 発表のポイント

- ◆オートファジー (注1) の活性を測定できる蛍光プローブと CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を組み合わせることで、ヒト全遺伝子を対象としたオートファジー関連遺伝子の網羅的スクリーニング法を確立しました。
- ◆この方法により、出芽酵母などで発見されていた既知のオートファジー関連遺伝子に加えて、オートファジーに必須である新規遺伝子 *TMEM41B* を発見しました。
- ◆*TMEM41B* は出芽酵母には存在しないため、本発見を契機として、ヒトのオートファジーの分子機構がさらに明らかされることが期待されます。

3. 発表概要：

マクロオートファジー (以後、オートファジー) は、オートファゴソーム (注2) という膜構造体によって担われる細胞内分解システムです (図1)。細胞質の一部がオートファゴソームによって取り囲まれ、リソソームと融合することで分解されます。オートファゴソーム形成は数多くのオートファジー関連遺伝子が必要です。今回、東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授らの研究グループは、同研究科の間野博行教授 (現国立がん研究センター研究所) と同大学院理学系研究科の濡木理教授らのグループと共同で、ヒト全遺伝子を対象としたオートファジー関連遺伝子の網羅的スクリーニングを実施し新たなオートファジー関連遺伝子 *TMEM41B* を発見しました。*TMEM41B* を欠損させた細胞ではオートファゴソームの形成がほぼ全く起こりませんでした。また、*TMEM41B* は出芽酵母には存在しないため、本発見を契機として哺乳類オートファジーの分子機構がさらに明らかにされることも期待されます。

本研究は国立研究開発法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 ERATO「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト」及び日本学術振興会 新学術領域研究「オートファジーの集学的研究」 (領域代表：水島昇) の計画研究「オートファジーの生理・病態生理学的意義とその分子基盤」として行われました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

オートファジーは細胞内の主要な分解系であり、タンパク質や細胞内小器官の代謝回転に必要なシステムです。オートファジーは飢餓時の栄養のリサイクルや細胞内の品質の維持に重要な役割を果たします。

オートファジーは、オートファゴソームという膜構造体によって担われます (図1)。オートファゴソームは、複雑で動的な構造体であり、非常に短い時間 (5~10分間程度) で形成されます。オートファゴソームの形成には数多くの遺伝子 (オートファジー関連遺伝子群) が必要であることが知られています。

オートファジー関連遺伝子群は、1990年代から大隅良典博士ら複数のグループにより、出芽酵母を用いてその多くが同定されてきました。その後も、線虫など多細胞のモデル生物を用いたスクリーニングや、個別の解析によって、出芽酵母が持っていないオートファジー関連タンパク質が少数同定されてきました。一方、哺乳類細胞においては遺伝子操作の難しさのため、大規模なスクリーニングは限られた形でしか実施されてきませんでした。しかし、近年登場した CRISPR-Cas9 を利用したゲノム編集技術によって、全遺伝子網羅的なスクリーニングが可能になってきました。

(2) 研究の内容

本研究では、ヒト全遺伝子を対象として網羅的かつ効率的な大規模スクリーニングを実施しました。オートファジー関連遺伝子の網羅的な探索には、1) 全遺伝子スクリーニングを行うための遺伝子編集法と、2) オートファジー関連遺伝子か否かを判定するための評価系の二つが必須です。私たちは、1) として、CRISPR-Cas9 システムを利用しました。CRISPR-Cas9 システムは近年目覚ましい発達を遂げているゲノム編集技術です。個別的な遺伝子解析のみならず、全遺伝子に対して機能欠損を起こせるようにガイド RNA を設計することにより網羅的な解析にまで応用されるようになりました。2) としては、最近私たちの研究室で独自に開発された蛍光プローブ (図2) を用いて評価を行いました。

オートファジー活性を評価する蛍光プローブを安定的に発現する細胞を作成し、CRISPR-Cas9 システムによって遺伝子欠損細胞ライブラリーを作成しました。この細胞集団の中から、蛍光強度に基づいて細胞を分取することができる装置 (フローサイトメトリー) を用いてオートファジー不全細胞を分取しました。その後、次世代シーケンサーを用いてオートファジー不全細胞で欠損している遺伝子 (すなわち、オートファジーに必須な遺伝子) を網羅的に同定しました (図3)。

本研究で検出されたオートファジー関連遺伝子の中には、これまでに知られていたオートファジー関連遺伝子が広範囲かつ数多く含まれていました (図3、緑の点)。その中には、大隅良典博士らによって同定されていたオートファジー必須遺伝子のみならず、線虫のスクリーニングで同定された遺伝子群や、個別研究で同定されてきた遺伝子群も数多く含まれており、非常に網羅性の高いスクリーニングが行われたことを示唆しています。さらに、既知の遺伝子のみならず、新規オートファジー関連遺伝子として *TMEM41B* を新たに同定することに成功しました (図3、マゼンタの点)。詳細な機能解析により、*TMEM41B* はオートファゴソーム形成に必須な小胞体膜タンパク質であることが示されました。本研究成果によって、オートファゴソーム形成における小胞体の役割が明らかになることが期待されます。また、*TMEM41B* の中央部にはバクテリアの機能未知タンパク質と類似した領域があるため、オートファジーが進化の過程でどのように獲得されたかを探る鍵になると考えられます。

(3) 社会的意義

オートファジーとヒト疾患の関わりについては、近年ますます注目が集まっています。特に、神経変性疾患との関わりは深いと考えられます。オートファジー不能動物で神経変性疾患様の症状を呈すること、いくつかのヒト神経変性疾患でオートファジー関連遺伝子の変異が見つかっているからです。しかし、オートファジーと神経変性疾患の具体的な関わりはもとより、オートファジーの基本的なメカニズムについても未解明な点が多く、応用研究の足枷になっています。今回発見された *TMEM41B* は出芽酵母には存在しないため、本研究が端緒となり、ヒトでのオートファジーの研究がいつそう進むことが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*The Journal of Cell Biology*」 8月9日（米国東部夏時間）オンライン版

論文タイトル：Genome-wide CRISPR screen identifies TMEM41B as a gene required for autophagosome formation

著者：Keigo Morita, Yutaro Hama, Tamaki Izume, Norito Tamura, Toshihide Ueno, Yoshihiro Yamashita, Yuriko Sakamaki, Kaito Mimura, Hideaki Morishita, Wataru Shihoya, Osamu Nureki, Hiroyuki Mano, and Noboru Mizushima* (*corresponding author)

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野
教授 水島 昇（みずしま のぼる）

Tel：03-5841-3440、Fax：03-3815-1490

E-mail：nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel：03-5841-3304、Fax：03-5841-8585

E-mail：ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1） （マクロ）オートファジー

細胞の主要な分解機能の一つ。オートファゴソームが細胞質基質やミトコンドリアなどの細胞内小器官を取り囲み、リソソーム（分解酵素を格納している細胞内小器官）と融合する。（図1）。その生理的機能としては、飢餓への適応や細胞内の恒常性維持などが知られており、近年では特に神経変性疾患などとの関連が注目されている。

（注2） オートファゴソーム

オートファジー分解を仲介する細胞内小器官で、細胞質に存在するタンパク質やミトコンドリアなどを包み込む（図1）。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素によって内容物が消化される。

8. 添付資料：

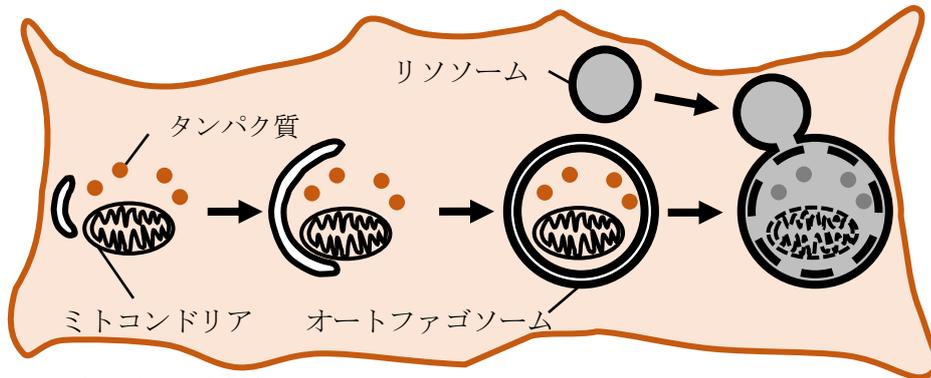


図1) オートファジー経路の概要

オートファジーが誘導されると、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームは細胞質のタンパク質やミトコンドリアを取り囲む。オートファゴソームはリソソーム（分解酵素を多く含む）と融合し、リソソーム内の酵素によって基質を分解する。

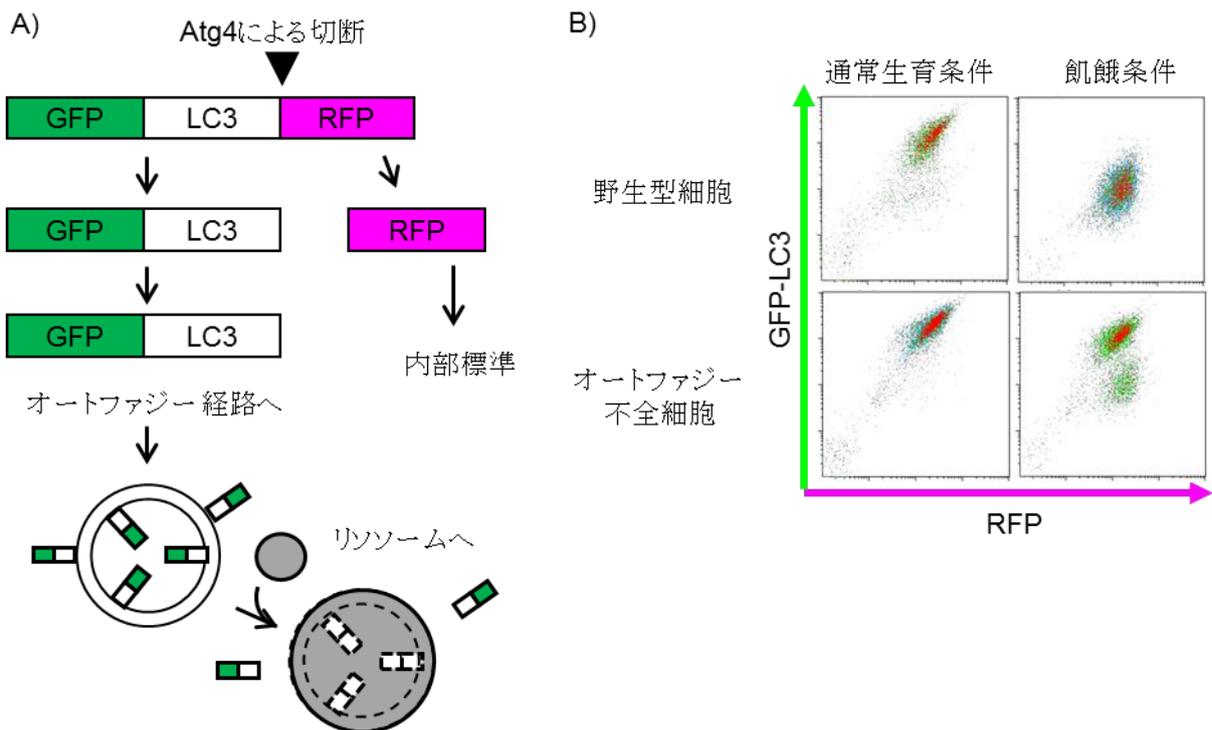
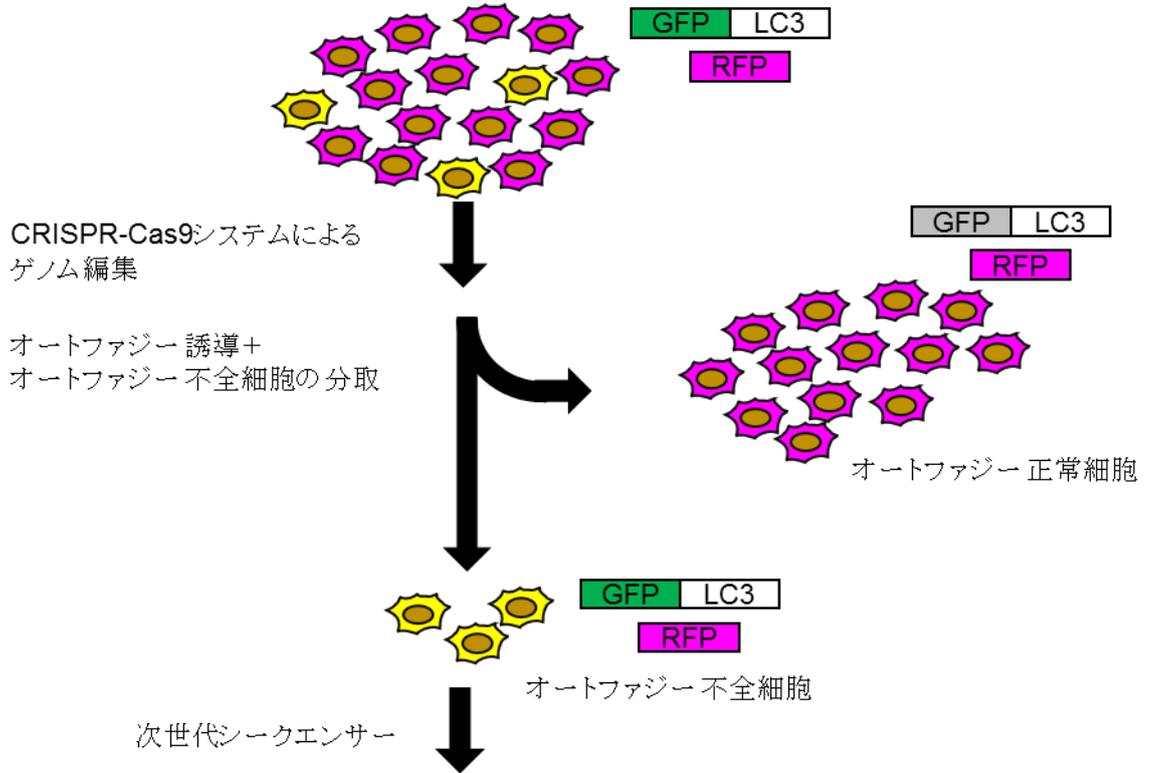


図2) オートファジー活性評価プローブと、フローサイトメトリーによる解析

A) オートファジー活性評価プローブ **GFP-LC3-RFP** は、オートファゴソームタンパク質である **LC3** を緑色蛍光タンパク質 (**GFP**) と赤色蛍光タンパク質 (**RFP**) で挟んだものである。このプローブは細胞内では **Atg4** によって切断され、**GFP-LC3** と **RFP** に分かれる。**GFP-LC3** はオートファゴソームに結合し、オートファジーによって分解される。一方、**RFP** は細胞質に留まり内部標準としての機能を果たす。

B) 野生型細胞では飢餓条件（オートファジー誘導条件）において、**RFP** の蛍光強度は一定であるのに対し、**GFP** の蛍光強度の減弱がみられる。オートファジー不全細胞では **GFP** の減弱が阻害される。

オートファジー活性評価プローブ発現細胞



●: 既知オートファジー関連分子

図3) ヒト全遺伝子を対象とした網羅的スクリーニング (ゲノムワイドスクリーニング)
オートファジー活性評価プローブ発現細胞を作成し、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて全ゲノム遺伝子を対象として個々の欠損体を作成する。その中からオートファジー不全細胞を分取し、次世代シーケンサーを用いてオートファジー必須遺伝子を同定する。既知のオートファジー関連遺伝子 (緑の●) が多く認められるなかで、*TMEM41B* という遺伝子が新規オートファジー必須分子として同定された (マゼンタの□)。