

研究題目 神経発達障害の原因因子 PHAF 複合体の分子機能解析

研究組織

研究代表者：山野晃史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：小島和華（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

研究分担者：小谷野史香（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

研究分担者：菊池麗香（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

申請者らは損傷ミトコンドリアの選択的オートファジー（マイトファジー）の過程において、伸張途中のオートファジー膜（隔離膜）に集積する新規因子として PHAF1/C16orf70 と PHAF2/BCAS3 の2種類のタンパク質を同定した。BCAS3 と C16orf70 は安定な複合体（PHAF 複合体）を形成し、どちらか一方の欠損によりもう片方の因子の隔離膜集積が阻害される。また、BCAS3 にはホスファチジルイノシトール3リン酸結合ドメインが存在し、これを介して隔離膜に集積する（Kojima W. *et al.* 2021 *Autophagy*）。申請者らの論文発表の直後に BCAS3 が脳内鉄沈着を伴うヒト神経発達障害の原因遺伝子であることが報告された（Hengal *et al.* 2021 *Am J Hum Genet*）。しかし、培養細胞において BCAS3 や C16orf70 遺伝子をノックアウトしても、LC3 の脂質化修飾や p62 の蓄積に大きな変化が見られず、PHAF 複合体がオートファジーの制御に重要であるかを判断することができていなかった。また、PHAF 複合体に新たな構成因子が存在するのか、隔離膜上でどのような役割を担っているかなど不明な点が多く残っていた。PHAF 複合体の欠損がオートファジー阻害を介して、病態の発症に寄与していることを示すためには、上記の疑問を解明する必要がある。

[1-2]研究の方法・経過

申請者らはまず、HeLa 細胞の BCAS3 遺伝子を CRISPR/Cas9 法でノックアウトした BCAS3 KO HeLa 細胞を作製した。LC3 の脂質化修飾や p62 の蓄積は野生型 HeLa 細胞（WT HeLa）と比較して、有意な差が観察できなかったため、オ

ートファジー活性をより高感度に検出できる HaloTag プロセッシングアッセイを本研究に応用した。HaloTag を GFP に融合させた Halo-GFP は通常、オートファジーによってリソソームで分解されるが、Halo リガンドを培地に添加すると、HaloTag 部分はリソソームでの分解に耐性になるため、その量によってオートファジー活性を定量することが可能になる。パルスチェイスも可能であるため、高感度でオートファジー活性を検出することができる。

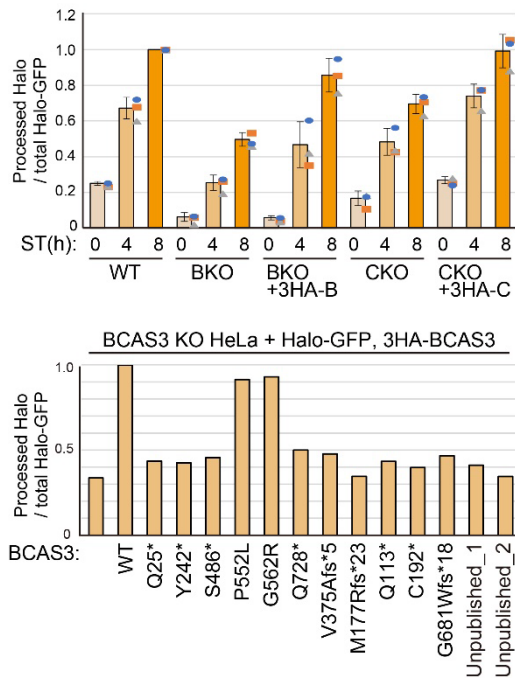
さらに、PHAF 複合体の相互作用因子の同定には質量分析法を用いた。BCAS3 KO HeLa 細胞と、その細胞に FLAG タグを付加した BCAS3（3FLAG-BCAS3）を発現した細胞を準備し、Parkin 依存性マイトファジーを誘導した後、抗 FLAG 抗体の磁気ビーズで共免疫沈降を行ない、質量分析で相互作用因子を網羅的に探索した。

【2】研究成果

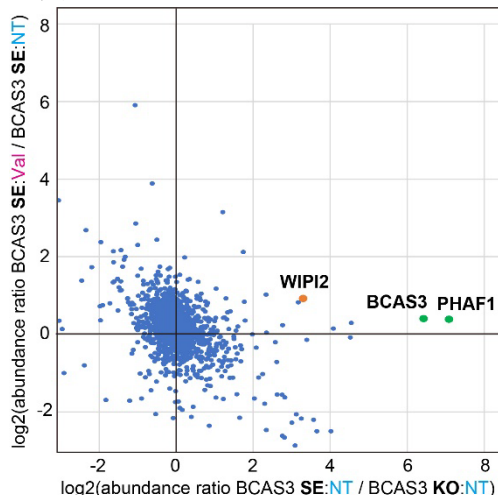
[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

まず、HaloTag プロセッシングアッセイから BCAS3 および C16orf70 をノックアウトするとアミノ酸飢餓時に観察されるリソソーム内 HaloTag の量が、野生型 HeLa と比較して減少した。また、BCAS3 KO 細胞に野生型 BCAS3、C16orf70 KO 細胞に野生型 C16orf70 を発現させるとリソソーム内 HaloTag の量が回復したため、PHAF 複合体の欠損によるオートファジー阻害を検出することに初めて成功した（図1上）。さらに BCAS3 KO 細胞に神経発達障害を引き起こす BCAS3 変異体を発現させても、ほとんどの変異体でリソソーム内 HaloTag の量は増加しなかったため、BCAS3 の疾患変異により、オートファジーの機能喪失を引き起こすことが強く示唆された（図1下）。

< 図 1 >



< 図 2 >



次に PHAF 複合体の相互作用因子を同定するために、3FLAG-BCAS3 を免疫沈降し、共沈降されるタンパク質を質量分析法で網羅的に探索した。BCAS3 KO 細胞と 3FLAG-BCAS3 発現細胞を比較したところ、PHAF1/C16orf70 に加えて、WIPI2 が BCAS3 の新規相互作用因子の候補として同定された (図 2)。BCAS3 と共沈降される WIPI2 の量はマイトファジーの有無で変化がなかったため、PHAF 複合体と WIPI2 は恒常的に結合している可能性が示唆された。WIPI2 は BCAS3 と同様、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸依存的に隔離膜に集積するタンパク質である。隔離膜上には多くのオートファジータンパク質が集積するが、今回の質量分析では WIPI2 以外の既知のオートファジー因子は同定されなかったため、特異的な相互作用で

ある可能性が高いと判断した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

BCAS3 は自身が有する WD40 ドメインを介して、隔離膜の形成場へと集積する。興味深いことに本共同研究で同定した WIPI2 も自身の WD40 ドメイン依存的に隔離膜に集積することが知られている。また、ヒトには WIPI1 から WIPI4 まで 4 つの WIPI タンパク質が発現しており、WIPI4 は SENDA/BPAN (脳内鉄沈着を伴う神経疾患) の原因遺伝子としても同定されている。したがって、BCAS3 と WIPI が相互にオートファジーの活性を制御しているならば、共通の発症原因が存在する可能性が高い。このような視点で今後研究を継続することで、BCAS3 や WIPI ファミリーの欠損がオートファジーに与える影響を詳細に調べつつ、発症の根本的原因に迫ることが可能であると考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

「BCAS3-C16orf70 複合体の機能解析」

小島和華、松田憲之、山野晃史

第 15 回オートファジー研究会 (ポスター発表)

「マイトファジーを利用した新規オートファジー因子の探索と機能解析」

小島和華

内分泌・代謝学共同研究拠点成果報告会・ワークショップ (口頭発表)

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究で見出した BCAS3 と WIPI タンパク質の相互作用は現段階では可能性の域を超えないため、生化学的に (AlphaFold2 などの構造予測も活用しながら) その相互作用を検証していく必要がある。また、BCAS3 や WIPI ファミリータンパク質の欠損によって、互いの隔離膜への集積が阻害されるかなど、細胞生物学的なアプローチも必要である。