

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08420

研究課題名(和文)新規オートファジー活性によりポリグルタミン病が改善する分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of a molecular mechanism to improve polyglutamine diseases by activating alternative autophagy

研究代表者

荒川 聡子 (ARAKAWA, Satoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：90415159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：(I)新規オートファジーは酵母細胞から哺乳動物まで保存されており、タンパク分泌の抑制によって誘導されることを見出し論文作成した。また(II)酵母細胞において新規オートファジー不能変異株Aag4の単離に成功し、Aag4欠損マウスの作出とその生理機能を解析した。また、(III)新規オートファジー誘導化合物として選定した化合物の一つが、ポリグルタミンを発現させた細胞において、ポリグルタミンの蓄積を劇的に改善する結果を得た。この細胞を電子顕微鏡にて観察しポリグルタミンの細胞内蓄積の形態的基盤と、その蓄積が化合物添加によって改善するときの微細構造の変化について詳細に観察した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular process that degrades subcellular constituents, and is conserved from yeast to mammals. Although autophagy is believed to be essential for living cells, cells lacking Atg5 or Atg7 are healthy, suggesting that a non canonical degradation pathway exists to compensate for the lack of autophagy. We first showed that the budding yeast lacking Atg5 undergoes bulk protein degradation using Golgi mediated structures to compensate for autophagy when treated with amphotericin B1 a polyene antifungal drug. We next identified Aag4 as a molecule essential for alternative autophagy, we clarified the mechanism of alternative autophagy and its physiological roles. Finally, we discovered several chemicals to induce alternative autophagy but not conventional autophagy. One of them reduced the polyglutamine aggregation in the cytosol, which causes polyglutamine diseases. We are currently observing the process of the aggregation formation and the drug effects on it using EM.

研究分野：微細構造

キーワード：オートファジー ポリグルタミン病

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の Atg5/Atg7 依存的オートファジー機構に関する研究は世界中で広く行なわれ、その分子機構や生理学的、病理学的役割が明らかにされつつある。具体的には、酵母の遺伝学を基に哺乳動物細胞のオートファジー分子が同定され、これらの欠損マウス作製によって Atg5/Atg7 依存的オートファジーの生理機能が明らかにされつつある。

一方で、申請者は Atg5/Atg7 に依存せず LC3 の局在化を伴わない新しいメカニズムによるオートファジーを発見した (Nature 2009)。

この新規オートファジーと従来の Atg5 依存的オートファジーとは、細胞の種類や刺激の種類、基質の選択などにおいて、巧みに使い分けられているものと考えられる。例えば、赤血球においてはミトコンドリアの除去には主に新規オートファジーが関わり、細胞質成分の除去には Atg5 依存的オートファジーが関与していた (Nature Commun 2014, 2016)。

また、オートファジーは様々な疾患に関与していることが報告されているが、実際に、新規オートファジーにおいてもその不全マウスが貧血症を呈することなどが明らかとなった (Nature Commun 2014)。このことから、さらに新規オートファジーの分子機構を解明し、疾患への関与を明らかにすることが重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、新規オートファジーの分子メカニズムを解明し生理機能を明らかにするため (1) 新規オートファジー分子の同定とシグナル伝達機構の解明と生理機能の解明、(2) 新規オートファジーのポリグルタミン病の病態改善する分子機構の解明、(3) および低分子化合物の改良を行い、前臨床までの薬剤開発研究を行うことを目

的に研究を行った。

3. 研究の方法

新規オートファジーの分子メカニズムを解明し生理機能を解析する為(1)酵母遺伝学を用いた特異的遺伝子の同定、(2)哺乳動物細胞における遺伝子変異株の解析、(3)新規オートファジー欠損マウスの作製、(4)ケミカルバイオロジーを用いた新規オートファジーの誘導あるいは阻害する低分子化合物の同定、(5)これらの化合物が有効な疾患モデル動物の同定を行った。

4. 研究成果

(1) はじめに、Atg5やAtg7に依存する通常のオートファジーとは異なる新規オートファジーの分解機構を明らかにするため、Atg5を欠損した酵母細胞に様々な化合物を添加し、オートファジーを誘導できる化合物を探索した。その結果、抗生物質のアンホテリシンB1を見出した。そしてアンホテリシンB1を投与した細胞では ゴルジ体から細胞膜への分泌が阻害されていること、 ゴルジ体が集積・伸長すること、 貯留したタンパク質などをゴルジ体のトランス膜が取り囲むことで細胞質から隔離すること、 その後液胞と融合して内容物が分解されることを明らかにした。

さらにゴルジ体から細胞膜への分泌阻害が起きる様々な遺伝子欠損株を観察した結果、すべてにおいて同様のゴルジ体の変形と分泌タンパク質の分解の活性化が明らかとなった。すなわち、分泌されず細胞内に貯留したタンパク質の分解にこのオートファジーが機能していると考えられた。

またこの分解は哺乳動物の培養細胞でも同様に観察されることを見出した。そこで、ゴルジ体を経由して分泌されるインスリンの挙動にもこのオートファジーが関与するか検討した。インスリンを合成する膵臓のインスリン分泌細胞(β細胞)では、低血糖状態でインスリン分泌が抑制される。我々は、この時β細胞

内に貯留したインスリンの一部も新規オートファジーにより分解されることを見出した。そこで、この新しい機構をGolgi membrane-associated degradation pathway (GOMED)と名付け論文に発表した (EMBO J. 2016)。

(2) 上記の酵母の系を用いて、新規オートファジーに関与する5個の実行分子を同定し、そのすべてが哺乳動物まで保存されていることを見出した。さらにこれらのノックアウトマウスを作成したところ、すべて胎生致死となり、新規オートファジーが個体発生において重要な役割を担っていることが伺えた。そこで現在は血球系や各臓器ごとの部位特異的遺伝子欠損マウスを作製している。このうち Aag4 遺伝子に関しては、すでにその分子メカニズムを解析し、またその生理的機能を解析し論文を準備中である。

(3) また、5万種類の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングにより新規オートファジーを誘導/阻害できる化合物を、同定した。このうちの誘導化合物の一つが、ポリグルタミン蓄積の見られる神経培養細胞において、その蓄積を改善することを見出した。まず最初に GFP融合ポリグルタミン(GFP-polyQ)を発現したPC12細胞に約5万種類の低分子化合物を投与し、ハイスループットアッセイによりGFP-polyQの発現を抑制できる24種の化合物を選定した。さらにこれらの化合物をPolyQ病モデルショウジョウバエ (polyQを複眼に発現させ複眼変性を誘導) に摂食し、変性を改善できる化合物2種 (PQ1とPQ2)を選定した。これらではポリグルタミンmRNA量は変わらず、作用点はタンパク質分解や安定性にあると考えられた。化合物PQ2を脊髄小脳変性症 (PolyQ病) モデルマウスに投与したところ、オートファジーが活性化され脳内の変性タンパク質の蓄積が抑制された。また神経細胞の脱落も抑制され顕著な病態改善を

認めた。また、PQ2の標的分子の同定に成功した。さらに、ポリグルタミンを発現させた細胞を電子顕微鏡にて観察しポリグルタミンの細胞内蓄積の形態的基盤と、その蓄積がPQ2添加によって改善するときの微細構造の変化について詳細に観察した。これに関しても論文作成中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

(原著論文)すべて査読あり

Nagata M, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Endo H, Tsujioka M, Honda S, Nishida Y, Konishi A#, Shimizu S#. Dram1 regulates DNA damage-induced alternative autophagy **Cell Stress**. 2 (3):55–65, 2018. doi: 10.15698/cst2018.03.127.

Yamaguchi T, Suzuki T, Sato T, Takahashi A, Watanabe H, Kadowaki A, Natsui M, Inagaki H, Arakawa S, Nakaoka S, Koizumi Y, Seki S, Adachi S, Fukao A, Fujiwara T, Natsume T, Kimura A, Komatsu M, Shimizu S, Ito H, Suzuki Y, Penninger JM, Yamamoto T, Imai Y, Kuba K. The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. **Sci Signal**. 11(516) pii:eaan3638, 2018. doi: 10.1126/scisignal.aan3638.

Yotsumoto S, Muroi Y, Chiba T, Ohmura R, Yoneyama M, Magarisawa M, Dodo K, Terayama N, Sodeoka M, Aoyagi R, Arita M, Arakawa S, Shimizu S, Tanaka M. Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation. **Sci Rep**. 7(1):16026, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-15668-z.

Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y,

Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. **Cell Death Differ.** 24(9):1598-1608, 2017. doi: 10.1038/cdd.2017.84.

Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, and Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. **Nature Commun.** 7:13508, 2016. doi: 10.1038/ncomms13508.

Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. PPM1D is an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. **EMBO R.** 17(11):1552-1564, 2016. doi: 10.15252/embr.201642565

Yamaguchi H, Arakawa S*(equally contribution), Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. **EMBO J.** 35(18):1991-2007, 2016. doi: 10.15252/embj.201593191.

Nasu Y, Benke A, Arakawa S, Yoshida GJ, Kawamura G, Manley S, Shimizu S, Ozawa T. In Situ Characterization of Bak Clusters Responsible for Cell Death Using Single Molecule Localization Microscopy. **Sci Rep.** 6:27505, 2016. doi: 10.1038/srep27505.

Arakawa S*, Nakanomyo I* (equally contribution), Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Komuro I, and Shimizu S. Identification of a novel compound that inhibits both mitochondria-mediated necrosis and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** 467(4): 1006-11, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.022.

(総説)すべて査読あり

Arakawa S, Honda S, Torii S, Tsujioka M, Shimizu S. Monitoring of Atg5-Independent Mitophagy. **Methods Mol Biol.** Apr 30, 2017 doi: 10.1007/7651_2017_16.

Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 93(6):378-385, 2017. doi: 10.2183/pjab.93.023.

〔学会発表〕(計 11件)

(口頭発表)

ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見、荒川聡子、山口啓史、清水重臣、ワークショップ「細胞機能を司るオルガネラゾーンの解読」、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)第40回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2017.12.06

生体内における多様な細胞死シグナルの可視化・検出系の開発「オートファジー細胞死の個体での解析」、荒川聡子・清水重臣、新学術ダイニングコード～細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明～第3回領域班会議、熊本県阿蘇、ホテルグリーンピア南阿蘇、2017.05.19

ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見、荒川聡子、山口啓史、金関恵、清水重臣、第39回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜 2016.12.01

ゴルジ体を介したタンパク質分解システムの発見、荒川聡子、第4回新学術「オートファジー」班会議・第10回オートファジー研究会、越後湯沢、NASPA ニューオータニ、2016.11.14

オートファジー細胞死の個体での解析、

荒川聡子、辻岡政経、桜井一、山口啓史、
吉野育代、清水重臣、第 25 回日本 Cell
Death 学会学術集会、東京都品川、品川
区立総合区民会館 きゅりあん、
2016.09.10

ポスター発表

Role of Atg5-dependent cell death in the
embryonic development of *Bax/Bak*
double-knockout mice, Satoko Arakawa,
Shigeomi Shimizu, Australia-Japan Meeting
on Cell Death, Tokyo, Ichijo Hall, Yayoi
Auditorium, The Univ. of Tokyo,
2018.05.22

Golgi membrane-associated degradation
pathway in yeast and mammals, Satoko
Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Shigeomi
Shimizu, The 8th International Symposium
on Autophagy, Nara, Nara Kasugano
International Forum IRAKA, 2017.05.30

ゴルジ体を介したタンパク質分解シス
テムの発見、荒川聡子、山口啓史、金関
憲、清水重臣、第 39 回日本分子生物学
学会年会、横浜、パシフィコ横浜 2016.12.01

Induction of Atg5-independent alternative
macroautophagy by a disturbance of insulin
secretion of Pancreatic cell, Satoko
Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Toku
Kanaseki, Hirotaka Watada, and Shigeomi
Shimizu, 第 38 回日本分子生物学会、神
戸ポートアイランド 2015.12.02

新規オートファジーの微細構造解析、荒
川聡子、金関憲、清水重臣、第九回オー
トファジー研究会（第三回新学術「オー
トファジー」班会議、淡路夢舞台国際会
議場, 2015.11.16

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒川 聡子 (ARAKAWA, Satoko)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：90415159