

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570155

研究課題名（和文）ホスファチジルセリン代謝異常は哺乳細胞のオートファジーを誘導するか？

研究課題名（英文）Does inhibition of phosphatidylserine synthase induce autophagy?

研究代表者

谷田 以誠 (TANIDA ISEI)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：30296868

研究成果の概要（和文）：

哺乳細胞におけるホスファチジルセリン合成異常とオートファジーおよびオートファジー性細胞死との関係性を明らかにするために、本研究では、ホスファチジルセリン合成異常変異 CHO 株を用いて、オートファジーの誘導と、その時のオートファジーはオートファジー性細胞死かどうか？について研究をおこなった。ホスファチジルセリン合成異常変異 CHO 細胞株は、ホスファチジルセリンを培地に添加していると生存できるが、ホスファチジルセリンを培地から欠乏させると、生存率が低下し、3日目には多くの細胞が死ぬ。このとき、制限条件におけるオートファジー誘導を調べると、ホスファチジルセリンを欠乏させて24時間以内にオートファジーのマーカーである LC3-II の顕著な蓄積が認められた。このオートファジーが誘導されたのち、24-48 時間後に細胞死が認められた。このことは、細胞死に至るまでにオートファジーが細胞保護的に働いている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the relation between a defect in phosphatidylserine synthesis and autophagic cell death, we focused on a CHO mutant that has a defect in an activity of phosphatidylserine synthase. When the mutant cells were cultured in a medium lacking phosphatidylserine, LC3-II, a promising autophagic marker, was increased within 24h. At 24-48h after induction of LC3-II, cell viability was decreased. The results suggested that the autophagy play a cytoprotective role, when phsophatidylserine depeletion-induced cell death.

交付決定額

3500,000 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	0	700,000
2010年度	700,000	0	800,000
2011年度	2,000,000	0	2,000,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：細胞内タンパク質分解

キーワード：オートファジー、リン脂質代謝、タンパク質分解、細胞死、ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞小器官・タンパク

質を含むバルクの分解機構で、主に飢餓により誘導される。ヒトにおいては、オートファ

ジーは飢餓応答のほかに、神経変性疾患、腫瘍形成、肝炎、心筋症、クローン病、細胞内クリアランス機構としての細胞内免疫システム、MHC class II 抗原提示、膵β細胞の増殖など様々な機能を果たしていることが明らかになってきた。オートファジーの際には、細胞小器官を含む細胞質をオートファゴソームが取り囲み、次にオートファゴソームがリソソームと融合することにより内容物を分解する。このようにオートファジーダイナミックな膜形成がおこるが、その脂質膜の供給源はいまだ明らかにされていない。また、虚血時（ある種の飢餓状態）では、脂質分解・脂肪酸放出などがおこるため、リン脂質合成・組成異常とオートファジーは密接に関連していることが予想される。しかしながら、哺乳細胞におけるリン脂質組成の異常とオートファジーの関係に関する研究はほとんど行われていない。特に生化学的解析からオートファゴソーム膜形成にはホスファチジルエタノールアミンが必須であるはずだが、ホスファチジルエタノールアミン、及びその前駆体としてのホスファチジルセリンがオートファジーに与える影響についての研究は皆無である。また、ホスファチジルセリン合成酵素異常変異 CHO 細胞では、制限条件下で最終的には細胞死に至るが、それがアポトーシスか、ネクローシスか、あるいはオートファジー性細胞死かについてきちんとした解析がなされていない。

この様な背景の中で、私は、オートファジーにおけるユビキチン様修飾反応の分子メカニズムを中心に解析をおこなってきた。オートファジーのマーカーとしての LC3/Atg8-ホスファチジルエタノールアミン結合体が明らかになってきたが、これまで脂質飢餓やリン脂質代謝異常により引き起こされるであろうオートファジーについての解析がほとんどなされてこなかった。またこれまでアミノ酸飢餓やグルコース飢餓、血清除去によるオートファジーは研究されてきたが、リン脂質異常によるオートファジーについてほとんど解析がなされてこなかったことに着目して本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、リン脂質のなかでもホスファチジルセリンに注目し、ホスファチジルセリン合成異常変異 CHO 株を用いて、制限条件下でオートファジーが誘導されるか？もし起こるとしたらオートファジーはリン脂質組成異常が起こる時期より前におこるのか、後におこるのか？その時のオートファジーはオートファジー性細胞死かどうか？について明らかにする。これらの研究をもとにリ

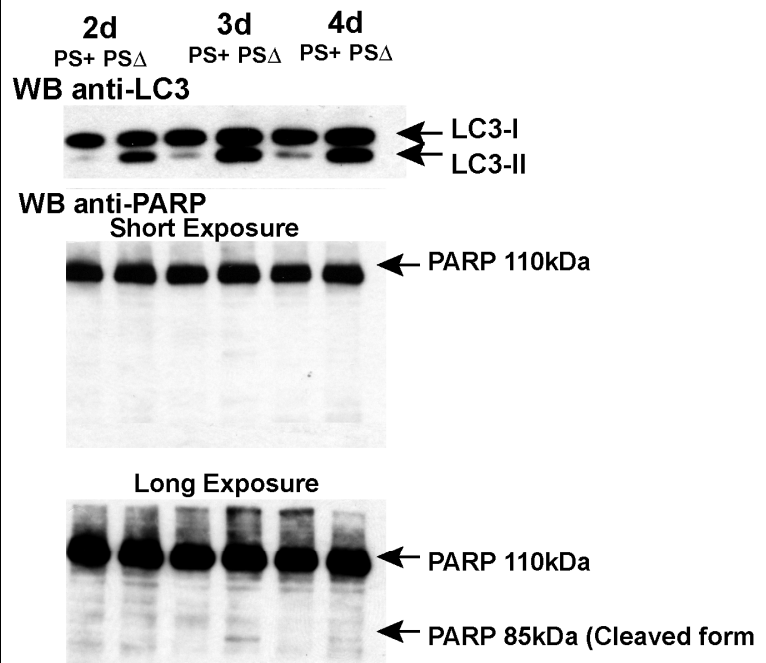
ン脂質合成におけるオートファジーの役割を明らかにしていく。

3. 研究の方法

ホスファチジルセリン合成異常 CHO 変異株について、制限条件下におけるオートファジー誘導および、細胞死の経時的関連について解析をおこなう。ホスファチジルセリン合成異常 CHO 変異株は増殖培地中にホスファチジルセリンが存在しないと約 2 日で増殖を停止し、3-4 日で細胞死をひきおこす。この細胞死が最終的にアポトーシスかオートファジー性細胞死であるかは解析されていない。そこで、ホスファチジルセリンを除いた増殖培地で変異細胞を培養し、24 時間ごとに、細胞の生存率、細胞内オートファジー活性の測定をおこなった。

4. 研究成果

ホスファチジルセリン合成異常変異 CHO 細胞株は、ホスファチジルセリンを培地に添加していると生存できるが、ホスファチジルセリンを培地から欠乏させると、生存率が低下し、3 日目には多くの細胞が死ぬ。このとき、制限条件下におけるオートファジー誘導を調べると、ホスファチジルセリンを欠乏させて、24 時間以内にオートファジーのマーカーである LC3-II の顕著な蓄積が認められた。



この時、アポトーシスの指標であるカスパーゼによる PARP の切断を調べると、制限条件下において 48 時間目に初めて、PARP の切断が認められた。

従って、制限条件下においては、オートファジーが誘導されたのち、24-48 時間後に細胞死が誘導されはじめるのを示している。このことは、細胞死に至るまでにオートファジーが細胞保護的に働いている可能性を示唆する。

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 13 件)

- ① Tanida I, Yamasaki M, Komatsu M, Ueno T.; The FAP motif within human ATG7, an autophagy-related E1-like enzyme, is essential for the E2-substrate reaction of LC3 lipidation. *Autophagy*. 査読有、8:88-97, 2012、[DOI:10.4161/autophagy.18339](https://doi.org/10.4161/autophagy.18339)
- ② Takagi-Akiba M, Asanuma K, Tanida I, Tada N, Oliva Trejo JA, Nonaka K, Asanuma E, Kominami E, Ueno T, Tomino Y.; Doxorubicin-induced glomerulosclerosis with proteinuria in GFP-GABARAP transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有、302:F380-9, 2012、[DOI: 10.1152/ajprenal.00502.2010](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00502.2010)
- ③ Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, Watanabe S.; Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、412: 618-25, 2011、[DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.012](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.012)
- ④ Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, Hiraoka Y, Taka H, Fujimura T, Takehana K, Yoshida M, Iwata J, Tanida I, Furuya N, Zheng DM, Tada N, Tanaka K, Kominami E, Ueno T.; Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*. 査読有、7: 727-736, 2011、[DOI:10.4161/autophagy.15371](https://doi.org/10.4161/autophagy.15371)
- ⑤ Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Sato S, Ishikawa K, Imoto M, Hattori N.; Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy*. 査読有、7:176-87, 2011、[DOI: 10.4161/autophagy.14074](https://doi.org/10.4161/autophagy.14074)
- ⑥ Tanida I, Waguri S.; Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods*

Mol Biol. 査読有、648:193-214, 2010、[DOI: 10.1007/978-1-60761-756-3_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_13)

- ⑦ Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, Mizuochi T.; Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J Immunol*. 査読有、183:7278-7285, 2009、<http://www.jimmunol.org/content/183/11/7278.long>
 - ⑧ Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K.; Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy*. 査読有、5: 937-945, 2009、<http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/9243/?nocache=162694941>
 - ⑨ Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S.; Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*. 査読有、45: 195-203, 2009、[DOI: 10.1007/s00535-009-0132-9](https://doi.org/10.1007/s00535-009-0132-9)
 - ⑩ Tanida I; Autophagy basics. *Microbiol Immunol*. 総説、査読有、55:1-11, 2011、[DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x)
 - ⑪ Tanida I; Autophagosome Formation and Molecular Mechanism of Autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 総説、査読有、14:2201-14, 2011、[DOI: 10.1089/ars.2010.3482](https://doi.org/10.1089/ars.2010.3482)
 - ⑫ 谷田以誠: オートファジー-リソソーム分解系～疾患・生理機能との関わりと分子機構、内分泌・糖尿病・代謝内科、和文総説、査読無、2011、33: 319-325, 2011、<http://www.kahyo.com/item/B201110-334>
 - ⑬ 谷田以誠、上野隆、和栗聡: オートファジーの評価方法、実験医学、和文総説、査読無、29、2054-2062、2011、http://www.yodosha.co.jp/bookdata/9784758103169/9784758103169_contents.pdf
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Tanida I, Koike M, Ueno T, Uchiyama Y.; Ubiquitin modifies an autophagic modifier to inhibit ALIP formation, Gordon Research Conferences "Autophagy in Stress, Development and Disease", Ventura, CA, USA, 2012.3.11-17
 - ② 谷田以誠、小池正人、上野隆、内山安男: 新

- 奇構造体 ALIPS 形成抑制のためのユビキチン・プロテアソームによる ATG12 分解制御, 第 3 4 回日本分子生物学会年、2011.12.15、横浜、
- ③ Tanida, I., Hanada, K.: Stability of luciferase activity during autophagy., 50th Annual Meeting of American Society of Cell Biology, 2010.12.11-17. Philadelphia, PA, U.S.A.
- ④ 谷田以誠、花田賢太郎: オートファジー条件におけるプロテアソームの活性化、BMB2010、2010.12.07-10、神戸
- ⑤ Tanida, I.: Autophagic Mechanism and Production of HCV Particles, World Congress of Virus and Infection-2010, Busan, Korea, 2010.7.30-8.4. (招待講演)
- ⑥ Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., Hanada, K.: Autophagy and mTor-signaling in production of infectious HCV-particles, Gordon Research Conferences "Autophagy in Stress, Development and Disease", Il Ciocco, Barga, Italy, 2010.4.25-30
- ⑦ Tanida, I., Koike, M., Tada, N., Iwata, J., Ueno, T., Uchiyama, Y., Kominami, E., Hanada, K.: Visualization of GABARAP in mice. 49th Annual Meeting of American Society of Cell Biology, 2009.12.8. San Diego, U.S.A.
- ⑧ Tanida, I.: Autophagy in Naive Hepatitis C Virus Production, 5th International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.
- ⑨ Ueno, T., Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Fujimura, T., Tanida, I., Furuya, N., Kominami, E.: Essential role of liver autophagy in maintaining blood glucose and plasma amino acids. 5th International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.
- ⑩ 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、上野隆、木南英紀、花田賢太郎: オートファジー関連遺伝子のノックダウンは HCV 粒子産生を抑制する。第 8 2 回日本生化学会大会、2009.10.23、神戸
- ⑪ 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎: オートファジーは HCV 粒子産生に関与している。第 5 7 回日本ウイルス学会学術集会、2009.10.25、東京
- ⑫ Tanida, I.: Autophagy Basics: International Symposium on Autophagy and Cell Death, Tokyo, Japan, 2009.7.6

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biochem/931-2nd.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷田 以誠 (TANIDA ISEI)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号 : 30296868