

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770054

研究課題名（和文） 新規オルタナティブ・オートファジーの機能部位の解析

研究課題名（英文） Analysis of the physiological role of the alternative autophagy in vivo.

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・助教

研究者番号：90415159

研究成果の概要（和文）：

オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを、細胞質から膜内へと隔離、分解するシステムである。我々は、これまで知られていたメカニズムと異なる機構により起きる、新規のオートファジーを発見した。本研究により、この新規オートファジーが胎児期の心臓、肝臓、脳など各臓器で機能していること、さらに、赤血球の成熟時におけるミトコンドリアの除去に機能し、血球の分化過程にも必須の働きをしていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We provide evidence that mammalian macroautophagy not only involves an ATG5/ATG7-dependent conventional pathway, but also an ATG5/ATG7-independent alternate pathway. In vivo, Atg5-independent alternative macroautophagy was detected in several embryonic tissues (cf. brain, liver, heart). It also had a function in clearing mitochondria during erythroid maturation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1800000	540000	2340000
2011年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：微細構造、オートファジー、

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを、細胞質から膜内（オー

トファゴソーム)へと隔離、分解するシステムである。この機構は、飢餓によって誘導されることがよく知られている。また、DNA 傷害

など、細胞にストレスが加わったときにも亢進する。これまでに酵母を用いた遺伝学的解析から、オートファジーには ATG 遺伝子とよばれる約30あまりの遺伝子が関与することが明らかとなっている。申請者らは、これらの遺伝子のうち必須といわれていた Atg5 や Atg7, LC3(Atg8)に依存しない、新規のマクロオートファジーを哺乳動物細胞にて発見し、これをオルタナティブ・オートファジーと名付けた。

## 2. 研究の目的

動物組織において、我々の発見した Atg5/Atg7 非依存的な新規オルタナティブ・オートファジーと、従来の Atg5/Atg7 依存的マクロオートファジーとの機能部位を調べ、それぞれの役割を明らかにするため、<1> オルタナティブ・オートファジーの特異的タンパク質を同定し、これら <2> 二つのオートファジーを峻別し <3> それぞれの組織特異性を調べる。これにより、オートファジーの生理機能を包括的に明らかにする。

## 3. 研究の方法

- <1> オルタナティブ・オートファジーの指標タンパクの探索と同定
- <2> オルタナティブ・オートファジーの機能部位の同定と解析
- <3> 生体内におけるオルタナティブ・オートファジーの組織特異性と、その機能解析

## 4. 研究成果

(1)これまで Atg5 や Atg7, LC3(Atg8)は隔離膜形成に関わるとされていたが、我々の発見したオートファジーでは、隔離膜がトランス・ゴルジ由来の膜とエンドソームから

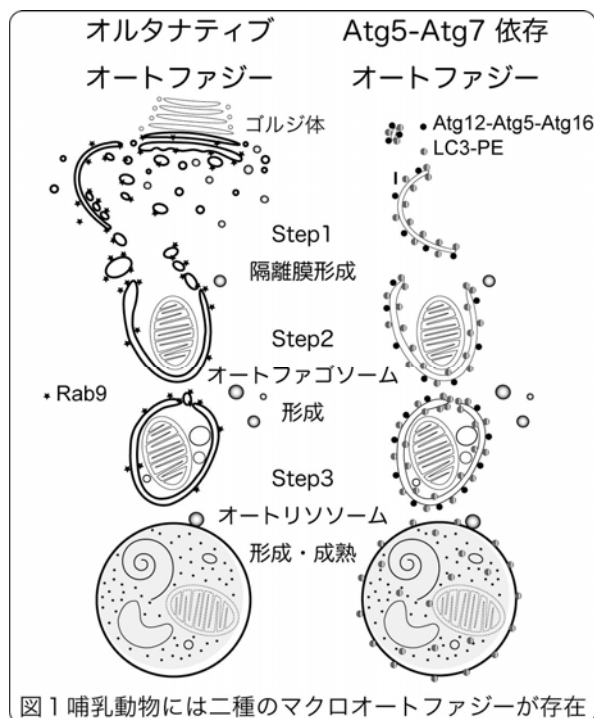
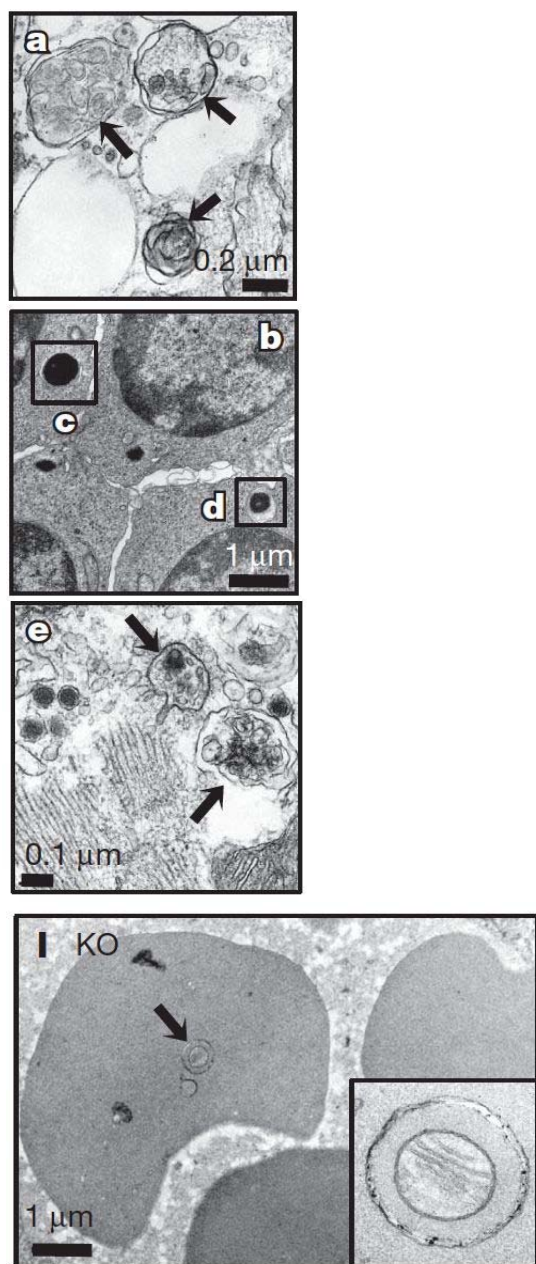


図1 哺乳動物には二種のマクロオートファジーが存在

形成されており、この形成には small G タンパクである Rab9 の関わっていることを明らかにした(図1)。一方で、Ulk1 (Atg1)や Beclin1 (Atg6)は、新規に見出したオルタナティブ・オートファジーにも関与していた。

(2) これまでのマウスの解析では、Atg5 あるいは Atg7 遺伝子欠損マウスは生後一日以内に栄養飢餓により死亡するが、胎児期においては特段の異常は見られない。これに対し、Beclin1(Atg6) 遺伝子欠損マウスは胎生致死となることが確認されている。このことは、発生段階においてはオルタナティブ・オートファジーが重要な機能を担っていることを示唆している。そして実際にオルタナティブ・オートファジーが、胎児期の心臓(図 a)、肝臓(図 b)、

脳(図 e)など各臓器で観察された。



加えて、赤血球の成熟時におけるミトコンドリアの除去にオルタナティブ・オートファジーが機能しており(図 I)、細胞の分化過程にも必須の働きをしている機構であることがわかった。

さらに、新規オートファジーにおいて特異的に働くタンパク質を15個同定しており、現在、これらの分子の中からマーカータンパク質を選定するため、蛍光タ

ンパク質を融合させ、細胞内、組織内、マウスへ導入して詳細に検討している。また、候補のマーカー遺伝子を導入した細胞、組織、マウスを用いて、様々な誘導刺激により亢進したオートファジーを蛍光で捉え、特異性を検討中である。

(3) オルタナティブ・オートファジー関連分子の遺伝子欠損マウスをこれまでに3系統作製した。これらのうち一系統は胎生致死、他の二系統においては①オルタナティブ・オートファジーが観察されず、それによる②異常なミトコンドリアの蓄積と赤血球の分化異常が認められた。これらの事実から、オルタナティブ・オートファジーは赤血球最終分化におけるミトコンドリア除去に重要な役割を果たしており、その機能破綻は貧血症などの発症原因となりうるものと考えられた。

##### 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7件)

1. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration.

**Curr Biol.** In press, Current Biology-D-12-00054R1.

2. Konishi A, Arakawa S, Yue Z, Shimizu S. Involvement of beclin 1 in engulfment of apoptotic cells. **J Biol Chem.** 287(17): 13919-13929. 2012.

3. Fukumatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Suzuki M, Nakayama K, Shimizu S, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. **Cell Host Microbe**. 11(4):325-336. 2012.

4. Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. **J Neurosci**. 31(46): 16872-16883. 2011.

5. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S, Inoki K, Shimizu S, Narita M. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. **Science**. 332(6032): 966-970. 2011.

6. Kamiya K, Tsumoto K, Arakawa S, Shimizu S, Morita I, Yoshimura T, Akiyoshi K. Preparation of connexin43-integrated giant Liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. **Biotechnol Bioeng**. 107(5): 836-843. 2010.

7. Nabeyama A, Kurita A, Asano K, Miyake Y, Yasuda T, Miura I, Nishitai G, Arakawa S, Shimizu S, Wakana S, Yoshida H, Tanaka M. xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. **Proc**

**Natl Acad Sci U S A**. 107(14): 6436-6441. 2010.

〔学会発表〕（計 1 件）

Arakawa S, Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S.

Analysis of programmed cell death during interdigital web development

〔図書〕（計 4 件）

1. Autophagy takes an alternative pathway

Shimizu S, Arakawa S, Nishida Y  
*Autophagy*. 6(2): 290-291. 2010.

2. 新しいオートファジー機構の発見  
Discovery of Novel Autophagy Pathway  
*DENTAL DIAMOND*. 35(500): 72-76. 2010.

清水重臣 荒川聡子 西田友哉

3. Atg5やAtg7を必要としない新規オートファジー機構の発見(カレントトピックス)  
*実験医学*. 28(3): 448-451. 2010.

荒川聡子、西田友哉、清水重臣

4. Atg5やAtg7を必要としないオートファジー機構の発見(HOT PRESS)  
*細胞工学*. 29(2):186-187. 2010.

西田友哉、荒川聡子、清水重臣

〔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〕  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/research-content.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 ( )

研究者番号：

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：