

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689020

研究課題名(和文)新規オートファジーの変調による血球貪食症候群の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the role of alternative autophagy in hemophagocytotic syndrome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円、(間接経費) 6,240,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Atg5やAtg7に依存しない新規オートファジーの赤血球分化への関与を詳細に明らかにする事を目的とし、新規オートファジーに必須のUlk1 遺伝子の欠損マウスを作製した。その胎仔肝臓から赤血球を単離しオートファジーの有無を検討したところ、最終分化過程でミトコンドリアの除去が実行されなかった。一方、Atg5欠損赤血球では正常であった。これらの事実より、赤血球マイトファジーは、新規オートファジーにより実行される事が明らかとなった。次に貧血の有無を検討したところ、Ulk1欠損マウスの胎仔は貧血に陥っており、これはアポトーシスが起きやすく、マクロファージに貪食されるためであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy degrades subcellular constituents and some evidences indicate that it is involved in elimination of some organelles. In erythrocyte differentiation, mitochondria are removed from reticulocytes and it has been suggested that macroautophagy is required for it. Although it is believed that Atg5 and Atg7 are indispensable for macroautophagy, their role in this process is controversial. Recently, we discovered that mammalian cells possess Atg5/Atg7-independent macroautophagy as well as Atg5/Atg7-dependent macroautophagy and Ulk1 regulates the former process. We hypothesized that Ulk1-mediated Atg5/Atg7-independent macroautophagy is involved in the elimination of mitochondria from reticulocytes. In this study, we demonstrated the removal of mitochondria in Ulk1-deficient erythrocytes was impaired. Furthermore, Ulk-1 deficient embryo becomes anemia. This would be attributed to the more susceptibility of the erythrocytes to the apoptosis and the engulfment by macrophage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：オートファジー マイトファジー 赤血球 血球分化

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分解するシステムであり、細胞の飢餓や薬剤ストレスなどで誘導される。これまでに酵母の遺伝学的研究から、オートファジー遺伝子(ATG)が 30 余り同定されており、これらは哺乳動物に至るまで広く保存されている。

しかし我々は、オートファジーに必須であるとされてきた Atg5 や Atg7 に依存しない新たなメカニズムによるオートファジーを発見し、「オルタナティブ・オートファジー」と命名した (Nature 2009)。そして、このオートファジーは従来のコンベンショナル・オートファジーに必須と考えられてきた Atg5 遺伝子欠損マウスの胎仔期において、赤血球の成熟段階におけるミトコンドリアの除去(マイトファジー)に働いている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、このオルタナティブ・オートファジーと赤血球分化との関連の詳細を明らかにする事、この現象の異常と疾病との関係を明らかにする事を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) オルタナティブ・オートファジー遺伝子欠損マウスの作成

これまでに Ulk1 遺伝子がオルタナティブ・オートファジーに必須の遺伝子であることを我々は見出しており、この遺伝子を欠損したマウスを作製する。

(2) 赤血球分化度の解析

赤血球の分化マーカー(Ter119, CD71)の変化をフローサイトメトリーで解析する。

(3) マイトファジーの解析

a. ミトコンドリアを蛍光標識し、脱核後にミトコンドリアの残存している血球をフローサイトメトリーで測定する。

b. オートファジーの有無を測定する。オルタナティブ・オートファジーの多寡はライソソームの膜タンパクである Lamp2 のドット形成の多寡により蛍光顕微鏡下で測定する。

c. 電子顕微鏡観察により赤血球中の残存ミトコンドリア数およびマイトファジー数の測定や、形態異常を解析する。

4. 研究成果

赤血球分化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いるかどうかを検討した。

Ulk1 遺伝子のノックアウトマウスの胎仔肝臓(胎仔期において肝臓は造血器官)から赤血球を単離し、Atg5 依存的オートファジーとオルタナティブ・オートファジーの有無を検討した。その結果、Ulk1 欠損赤血球ではオルタナティブ・オートファジーが殆どみられず、赤血球の最終分化過程でミトコンドリアの除去が実行されなかった。一方、Atg5 欠損赤血球においてはこの過程は正常であった。これらの事実より、赤血球マイトファジーは、新規オートファジーに大きく依存している事が明らかとなった。

さらに、赤血球マイトファジーに関わる分子の検索を行なった。その結果、HSP90-Cdc32 複合体や Atg13 に関してはその関与がほぼない一方、Nix については関連性が示唆された。

次に、Ulk1 欠損マウスでの貧血の有無を検討したところ、野生型マウス胎仔と Atg5 欠損マウス胎仔は、ほぼ同じ赤血球数、ヘモ

グロビン濃度であったが、Ulk1 欠損マウス胎仔では貧血に陥っていた。この原因を探索したところ、Ulk1 欠損赤血球では、アポトーシスが起きやすく、マクロファージに貪食される可能性が高い事が明らかとなった。

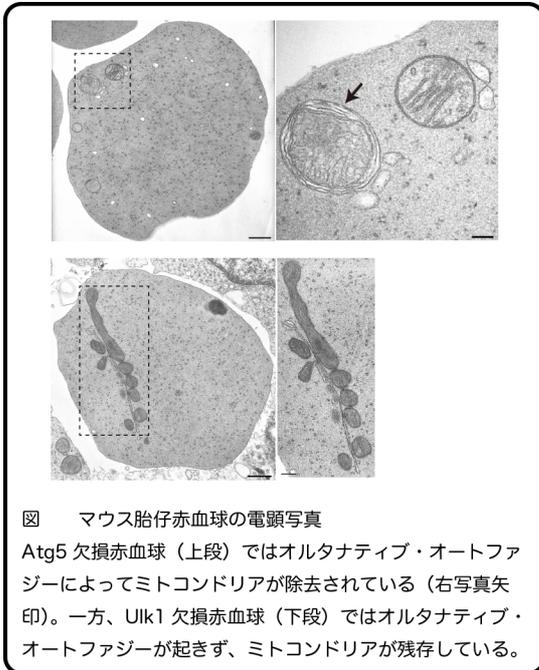


図 マウス胎仔赤血球の電顕写真
Atg5 欠損赤血球（上段）ではオルタナティブ・オートファジーによってミトコンドリアが除去されている（右写真矢印）。一方、Ulk1 欠損赤血球（下段）ではオルタナティブ・オートファジーが起きず、ミトコンドリアが残存している。

これらの研究成果をまとめた論文は、*Nature Communications* に受理された。

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 1 件）

査読あり

Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, and Shimizu S. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes, *Nature Commun. in press*. 2014. doi: 10.1038/ncomms5004.

〔学会発表〕（計 4 件）

(1) Analysis of programmed cell death during mice development

荒川聡子、吉野育代、辻本賀英、清水重臣
日本分子生物学会 2013 年 12 月 5(3-6)日、神戸

(2) 中心体数の制御機構の解明

荒川聡子、本田真也、渡辺雄一郎、小西昭充、清水重臣

新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」第二回領域会議 2013 年 11 月 28-29 日、名古屋

(3) Analysis of programmed cell death during interdigital web development

荒川聡子、吉野育代、辻本賀英、清水重臣
第 2 回日本 Cell death 学会学術集会、2013 年 7 月 19-20 日京都

(4) A Cell-Death Inducing Chemical Targets on the Centrosome

Satoko Arakawa, Yuichiro Watanabe, Michiko Murohashi, Shinya Honda, Akimitsu Konishi, Hirofumi Yamaguchi and Shigeomi Shimizu

The 25th CDB Meeting Cilia and Centrosomes, from Fertilization to Cancer, 2013 年 6 月 17 日(17-18)、神戸

〔図書〕（計 3 件）

(1) Shimizu S, Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H. Alternative macroautophagy and mitophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 50:64-66. 2014. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.016

(2) Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, Arakawa S. Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci.* 15(2): 3145-3153. 2014. doi:10.3390/ijms15023145

(3) 荒川聡子、清水重臣. オートファジー細胞死. *医学のあゆみ* Vol.246, No. 5, 364-368. 2013.

〔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/index.html>

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・助教

研究者番号：90415159

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：