

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19004

研究課題名(和文)新規オートファジーのメカニズム解明と疾患治療薬開発への応用

研究課題名(英文)An analysis of the mechanism of the alternative autophagy

研究代表者

本田 真也 (Honda, Shinya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：90532672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規オートファジーの分子メカニズムの解明のため、野生型と新規オートファジー欠損マウスを用い、網羅的な解析から候補分子の探索を行った。その結果、ホスホリパーゼおよびユビキチンリガーゼが候補分子として見つかった。新規オートファジーに対する影響を解析した結果、両タンパク質が新規オートファジーの進行に重要な役割を果たしていることが示された。また、この解析過程で、従来型オートファジーが、細胞の遊走および中心体数の制御に関与していることを見出した。本研究結果は、新規オートファジーのメカニズムの一端を明らかにしただけでなく、従来型オートファジーの新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy is a central mechanism in cellular metabolism by degrading parts of their cytoplasm and organelles using lysosomal enzymes. Previously, our group discovered the macroautophagy independent of Atg5 and Atg7, named Alternative autophagy. Recently, we reported alternative autophagy have an essential role for mitochondria clearance during erythrocyte differentiation.

This project aims to unravel the mechanisms of the alternative autophagy. To determine the essential molecule for the progression of alternative autophagy, we examine the proteome and microarray analysis using erythroid cells derived from wild type and alternative autophagy deficient mice. From these analysis, we identified the two candidate proteins, phospholipase and ubiquitin ligase. Contribution of both proteins to the alternative autophagy was determined by an analysis using MEF cells. In addition, we identified new function of conventional autophagy for the cell migration and regulation of centrosome number.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 赤血球 がん 中心体

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、ユビキチン プロテアソーム系と並ぶタンパク質分解システムの1つで、リソソームを利用し、自己構成成分を大規模に分解するシステムである。オートファジーは、新陳代謝(旧くなったオルガネラの処理)、細胞リモデリング(外的環境変化に適応する為に、不要となった蛋白質を消化する)、細胞浄化(細胞内病的構造物の除去)などに貢献しており、細胞の営みの基盤となっている。一方、その破綻は神経変性疾患やがん等の温床となることから、オートファジー研究は生物学的のみならず、医学的にも重要な研究対象である。

オートファジーは当初非選択的な分解機構であると考えられていたが、近年の解析より基質選択的な分解の存在が多く報告されている。さらに、これまでは哺乳動物のオートファジーの進行には Atg5 や Atg7 が必要不可欠であると信じられてきたが、我々のグループは、Atg5/Atg7 に依存しない新しいメカニズムによるオートファジーを発見・報告している(Nature, 2009)。その後の解析から、新規オートファジーに関わる複数の分子を同定し、そのうちの1つ Uik1 欠損マウスにおいては、新規オートファジーが観察されず、赤血球内に本来除去されるべきミトコンドリアが残存することを報告している(Nat. Commun. 2014)。

2. 研究の目的

これまでの解析から赤血球成熟段階のミトコンドリアの除去には Uik1 が重要な役割を果たしていることを明らかにしているが、その詳細な分子メカニズムは不明なままである。本研究では、Uik1 の上流・下流でどのような分子が機能しているのかを解明することを目的とした。さらに、従来型オートファジーの未だ知られていない機能解明も試みた。

3. 研究の方法

本研究では新規オートファジーの実行機構探索のため、野生型と新規オートファジー欠損(Uik1KO)マウスから赤芽球と網状赤血球を単離し、Microarray による遺伝子発現の網羅的な解析を行うことと、それぞれのマウスの胎仔網状赤血球から膜画分を単離し、プロテオーム解析により発現パターンの異なるタンパク質を解析することから Uik1 の上流・下流で働きうる候補分子の探索を行った。候補分子として見つかったものに関しては、遺伝子導入と新規オートファジーの解析系が確立されているマウス胎仔線維芽細胞(MEF)を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 野生型と新規オートファジー欠損(Uik1KO)マウスの胎仔網状赤血球から膜画分を単離し、発現パターンの異なるタンパク質をプロテオーム解析により解析した。2 次

元電気泳動の結果、いくつかパターンの異なるスポットがみられ、そのうちの1つがホスホリパーゼの1種であることが明らかになった。MEF を用いた新規オートファジーに対する影響を解析した結果、遺伝子ノックダウンにより新規オートファジーの抑制が、過剰発現によりリソソーム内への蓄積が確認された。

また Uik1KO 赤血球において K48 ユビキチン化タンパク質の蓄積が明らかとなった。そこで E3 ユビキチンリガーゼに着目し、野生型と Uik1KO の赤血球分化時に発現変動する E3 リガーゼを Microarray の結果から選出した。その結果多くの E3 ユビキチンリガーゼが赤血球分化と共に発現変動しており、野生型と Uik1KO 間で変動パターンの異なるものも多く確認された。これらの遺伝子についても、MEF を用いて解析を行った。遺伝子過剰発現、及び siRNA によるノックダウンの結果、数種類の E3 ユビキチンリガーゼが新規オートファジーに関与していることが明らかになった(図1)。

これらの結果から、新規オートファジーの進行過程において、ホスホリパーゼおよびユビキチンリガーゼが重要な役割を果たしていることが示された。

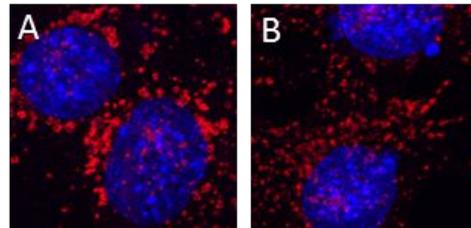


図1. 遺伝子ノックダウンによる新規オートファジーへの影響

Atg5KO MEF に Control si-RNA (A), si-ユビキチンリガーゼ (B) を導入後、新規オートファジーを誘導し、抗 LAMP1 抗体により染色した。コントロールでは肥大化したリソソームが観察され、新規オートファジーが誘導されているのに対し、ユビキチンリガーゼをノックダウンすると肥大化したリソソームが観察されず、新規オートファジーが抑制されている。

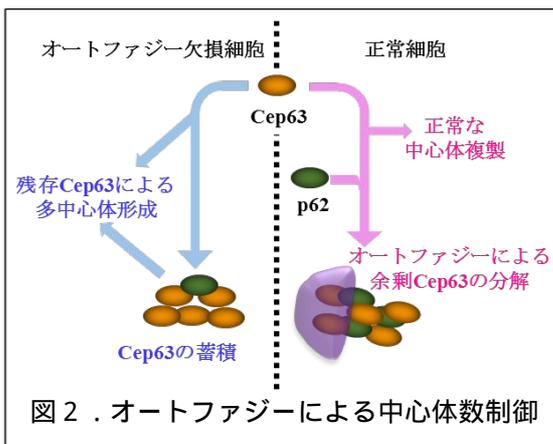
(2) また新規オートファジーの解析過程で、比較対象として観察していた従来型オートファジー欠損細胞において、細胞の遊走能が高くなること、および中心体数が増加していることを見出し、詳細な解析を行った。

細胞の遊走能に関しては、野生型と比較して Atg5KO MEF でスクラッチアッセイ・トランスウェルアッセイのどちらにおいても移動速度が速いことが観察された。この結果は、他のオートファジーにかかわる分子のノックアウト MEF でも観察された。細胞運動に関与する Rho の活性化の解析から、オートファジー欠損細胞では Rho の活性度合いが

強く保たれており、Rho の活性化因子である GEF-H1 がオートファジーにより分解されていることも明らかになった。これらの結果から、オートファジー欠損細胞では GEF-H1 が分解されないことで恒常的な Rho の活性化がおこり、細胞の遊走能が上昇していることが明らかになった。

また、中心体に関しては、野生型と比較して Atg5KO MEF において中心体数が増加していることを見出した。同様の結果は、siRNA によるオートファジー関連遺伝子のノックダウンや、オートファジー阻害剤の投与時にも観察され、従来型のオートファジー欠損により中心体数の増加を引き起こすことが確認された。中心体数の制御はこれまでユビキチン プロテアソーム系により制御されていると考えられていたが、本研究結果から、オートファジーも中心体数の制御を行っていることが明らかになった。中心体増加のメカニズム解明のために、詳細な解析を行った結果、基質認識分子 p62 を介したオートファジーが中心体タンパク質 Cep63 を分解しており、オートファジー欠損細胞では Cep63 が分解されずに蓄積し、それが中心体形成に参与することを明らかにした(図2)。

これらの結果から、オートファジーの異常からがんが発生する原因の1つとして中心体数の制御異常が関与しているものと考えられた。さらに、オートファジーの異常は高い遊走能を獲得することからがんの悪性度も高まる可能性が考えられた。



本研究結果は、新規オートファジーのメカニズムの一端を明らかにしただけでなく、従来型オートファジーの新たな機能を明らかにした。

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 4 件)

Honda S, Shimizu S.
Autophagy controls centrosome number.
Oncotarget. 査読有、

2017、8(9)、14277-14278.
DOI: 10.18632/oncotarget.15362.

Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S.
Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63.
Nat Commun. 査読有、
2016、7、13508.
DOI: 10.1038/ncomms13508

Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S.
Identification of PPM1D as an essential Utk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy.
EMBO Rep. 査読有、
2016、17(11)、1552-1564.

Yoshida T, Tsujioka M, Honda S, Tanaka M, Shimizu S.
Autophagy suppresses cell migration by degrading GEF-H1, a RhoA GEF.
Oncotarget. 査読有、
2016、7(23)、34420-9.
DOI: 10.18632/oncotarget.8883.

[学会発表](計 5 件)

本田真也、オートファジーによる中心体蛋白質 Cep63 の分解を介した中心体数の制御、細胞競合・ダイニングコード若手合同会議、2017.1.17 - 2017.1.19、ホテルコスモスクエア国際交流センター(大阪府、大阪市)

本田真也、渡辺雄一郎、小西昭充、室橋道子、荒川聡子、山口啓史、清水重臣、オートファジーによる Cep63 の分解を介した中心体数の制御、第 39 回日本分子生物学会、2016.11.30 - 2016.12.2、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

本田真也、オートファジーによる中心体タンパク質 Cep63 の分解を介した中心体数の制御、第 10 回オートファジー研究会、2016.11.14 - 2016.11.15、NASPA ニューオータニ(新潟県、南魚沼郡湯沢町)

本田真也、赤血球成熟段階のミトコンドリア除去における新規オートファジーの役割、酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議、2016.1.26 - 2016.1.28、一の宮シーサイドオーツカ(千葉県、長生郡一宮町)

本田真也、赤血球成熟段階のミトコンドリア除去における新規オートファジーの役割、第 9 回オートファジー研究会・第 3 回新学術「オートファジー」版会議、2015.11.15 - 2015.11.17、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県、淡路市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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

本田 真也 (HONDA, Shinya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：90532672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし