

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08859

研究課題名(和文) 赤血球最終分化段階のミトコンドリア除去機構の解明と血球貪食症候群への応用

研究課題名(英文) An analysis of mechanism of mitochondria clearance by alternative autophagy during erythrocyte differentiation

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・プロジェクト講師

研究者番号：90532672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球及びMEFを用い、網羅的なプロテオーム解析によりミトコンドリア除去関連分子、新規オートファジー関連分子の探索を行った。また、これまでに同定していた新規オートファジー関連分子であるユビキチンリガーゼに関して詳細な解析を行った。赤血球を用いた解析では、同定した分子は残念ながらミトコンドリア除去への影響は見られなかったが、MEFを用いた解析から、新たに新規オートファジーのマーカーになりうる分子の同定に成功した。また、ユビキチンリガーゼに関して、これまでノックダウンによりゴルジ体の形態異常を示すことがわかっていたが、結合分子探索から、細胞内酵素がゴルジ体の形態維持に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、新たに新規オートファジーマーカー候補分子が同定された。新規オートファジーは未だマーカーとなる分子は同定されておらず、本研究で同定されたものがマーカーとして利用可能であれば、新規オートファジー研究が飛躍的に発展し、それにより疾患との関連なども明らかになると考えられる。また、ユビキチンリガーゼとゴルジ体の形態に関して、新たな関連分子が明らかになったことから、ユビキチン化によるゴルジ体形態維持のより詳細なメカニズムが明らかになっていくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using erythrocytes and mouse embryonic fibroblasts (MEF), we investigated candidate molecules related to mitochondrial removal and alternative autophagy-related molecules by comprehensive proteome analysis. In addition, a detailed analysis of ubiquitin ligase, an alternative autophagy-related molecule that had previously been identified, was performed. Unfortunately, the candidate molecules identified in the analysis using erythrocytes had no effect on mitochondrial clearance. However, analysis using MEF led to the identification of a new candidate molecule that could be a novel marker for alternative autophagy. In addition, it has been known that knockdown of alternative autophagy-related ubiquitin ligase results in abnormal Golgi morphology. The search for binding molecules revealed that intracellular enzymes are involved in the maintenance of Golgi morphology.

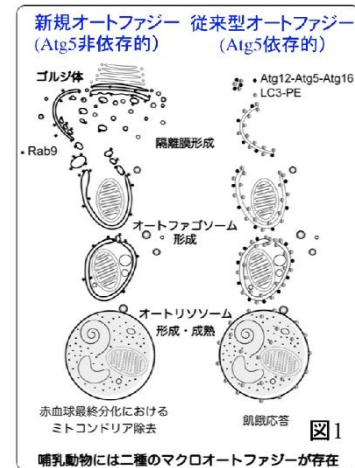
研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

赤血球分化時にはミトコンドリアをはじめとするオルガネラが分解される。我々は、赤血球成熟段階のミトコンドリア除去にAtg5やAtg7に依存しない新規オートファジーが関わっていることを報告した (Nat. commun. 2014)。

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。しかしながら、申請者のグループは、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し (図1)、従来のオートファジーの理解を根本から改める革新的な研究成果を得るに至った (Nature, 2009)。その後の研究で、従来型オートファジーが小胞体膜に由来するのに対し、新規オートファジーはトランスゴルジ膜に由来するなど、そのメカニズムは全く異なっていることを見出している。また、新規オートファジーに関わる複数の分子を同定し、それら遺伝子改変マウスを作製した。これらのうち、Ulk1欠損マウスにおいては、Atg5欠損マウスと異なり、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 (Nat. commun. 2014)、新規オートファジーが赤血球分化時のミトコンドリア除去に重要であることを明らかにした。



2. 研究の目的

本研究では、網羅的なプロテオーム解析により新規オートファジー関連分子を同定し、新規オートファジーによる赤血球分化時のミトコンドリア除去機構の解明を行う。

3. 研究の方法

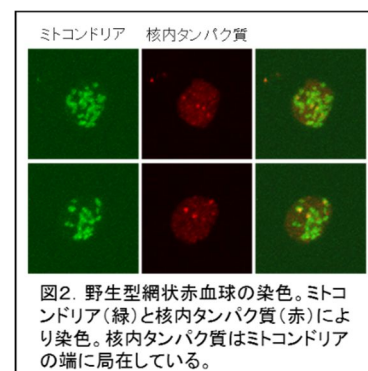
赤血球及びマウス胎仔線維芽細胞を用い、網羅的なプロテオーム解析により、ミトコンドリア除去関連分子、及び新規オートファジー関連分子を同定し、解析を行った。

また、これまで明らかにしている新規オートファジー関連候補分子の1つであるユビキチンリガーゼに関して、ノックアウトマウスを用いた解析及びその結合分子の探索などを行った。

4. 研究成果

(1) 赤血球を用いた解析

申請者らはこれまでに、胎仔赤血球成熟段階のミトコンドリア除去には、Ulk1 依存的な新規オートファジーが関わっていることを明らかにしていた。そのメカニズム解明のため、野生型とUlk1 欠損マウス胎仔から網状赤血球、循環血 (成熟赤血球) を単離し、プロテオーム解析により網羅的な発現タンパク質の解析を行った。その結果、野生型とUlk1 欠損マウス間で、網状赤血球から循環血への分化過程において発現の変動するタンパク質のうち、挙動の異なるものが多数確認された。その中で最上位変動タンパク質は驚くべきことに核内タンパク質であった。そのタンパク質を野生型の胎仔から単離した網状赤血球において染色したところ、ミトコンドリアに局在していることが明らかになった (図2)。これらのことから、この核内タンパク質がミトコンドリア除去に関与していることが考えられた。そこで、

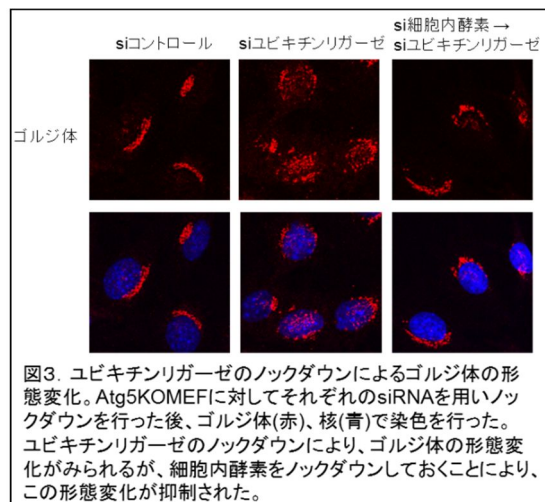


この核内タンパク質の欠損マウスを作製し、ミトコンドリア除去への影響を解析した。しかしながら、このマウスにおいて赤血球分化時のミトコンドリア除去への影響は認められなかった。このタンパク質のミトコンドリアへの局在変化が、ミトコンドリアの分解のために重要であると

考え解析を行ったが、ミトコンドリアの分解を抑制している可能性も考えられた。そこで、この欠損マウスと Ulk1 欠損マウスと交配することで、Ulk1 欠損で見られるミトコンドリアの分解異常が改善するかについて解析を行った。その結果、両欠損マウスと Ulk1 欠損マウスとの間に差は見られなかった。これらのことから、今回同定した核内タンパク質はミトコンドリアの除去には関与していないことが明らかになった。現在、プロテオーム解析で明らかになった他の分子に関して引き続き解析中である。

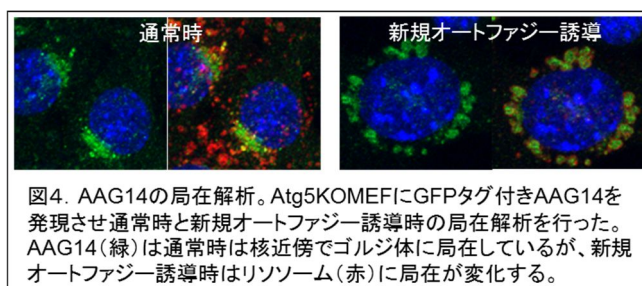
(2) 新規オートファジー関連候補ユビキチンリガーゼの解析

これまでの申請者の解析から、新規オートファジーの実行及びミトコンドリア認識に関与している可能性が高い分子として、あるユビキチンリガーゼを同定している。そこで、この遺伝子の欠損マウスを作製し、解析を行った。Crispr により作製された欠損マウスは、目立った表現系はなく成体になり、交配も可能であった。Ulk1 欠損マウスにおいて異常の見られる胎仔赤血球のミトコンドリアの除去に関して解析したところ、この遺伝子の欠損マウスではミトコンドリアの除去に変化は見られなかった。しかしながら、野生型と比較して赤血球分化マーカーの発現に若干の遅延が確認された。ミトコンドリア除去に変化が見られなかった原因として、この遺伝子のパラログの関与が考えられたため、このユビキチンリガーゼとそのパラログの両欠損マウスを作製し、解析を行った。両欠損マウスでは、ユビキチンリガーゼ単独欠損同様、赤血球分化マーカーの発現に若干の遅延が確認されたものの、ミトコンドリア除去に対する影響は見られなかった。これらの結果から、このユビキチンリガーゼはミトコンドリア除去には関与していないことが考えられた。しかしながら、マウス赤血球において野生型と比較して赤血球分化の細胞膜表面マーカーの発現に若干の遅延が確認されること、MEF 細胞においてこの分子のノックダウンがゴルジ体の形態異常を引き起こすことから、ゴルジ体の形態維持に重要な役割を果たしていることが考えられた。そこでこのユビキチンリガーゼと結合する分子を免疫沈降後のプロテオーム解析により同定を試みた。その結果、複数の候補分子が同定された。それぞれの遺伝子を siRNA によりノックダウンし、ゴルジ体への影響を解析したところ、ある細胞内酵素がユビキチンリガーゼを介したゴルジ体の形態維持に関与していることが明らかになった (図 3)。



(3) 線維芽細胞を用いた新たな新規オートファジー関連候補分子の探索

新規オートファジー関連分子の更なる探索のため、マウス胎仔線維芽細胞を用い新規オートファジー誘導による網羅的なプロテオーム解析を行った。その結果、新たな候補分子として膜タンパク質 AAG14 (Alternative Autophagy 14) を同定した。このタンパク質の局在を解析したところ、通常時はゴルジ体に局在するものの、新規オートファジーの刺激によりリソソームにその局在を変化させることが明らかになった (図 4)。この分子は従来型オートファジーの誘導では局在の変化は見られなかった。このような特徴から、AAG14 は新規オートファジーのマーカーになりうることが考えられた。このような局在化に関与する分子を同定するため、通常時・新規オートファジー誘導



時で変動する AAG14 の結合分子を、網羅的な質量分析により解析を行った。その結果、多数の分子が同定され、現在、それら分子の関与、及び AAG14 が新規オートファジーのマーカーになりうるかに関して解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Torii Satoru, Honda Shinya, Murohashi Michiko, Yamaguchi Hirofumi, Shimizu Shigeomi	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy involvement in oncogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3993 ~ 3999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Hirofumi, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Kimiko, Katoh Kaoru, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Fujikake Nobuhiro, Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18892-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H, Torii S, Tajima Sakurai H, Tsujioka M, Murohashi M, Shimizu S.	4. 巻 S0022-2836(20)
2. 論文標題 Association Between Atg5-independent Alternative Autophagy and Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 30068-30071.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.01.016.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Torii S, Honda S, Murohashi M, Yamaguchi H, Shimizu S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Autophagy involvement in oncogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3993-3999.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14646.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------