

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790371

研究課題名(和文)ハエ培養細胞を用いた新規オートファジー関連遺伝子の網羅的同一化および機能解析

研究課題名(英文)Comprehensive identification and function analysis of new autophagy-related genes using fly cultured cells

研究代表者

廣田 有子(Hirota, Yuko)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50588259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは自己の細胞質成分を分解する細胞内の主要なリソソーム系分解機構である。研究代表者は新規蛍光タンパク質 "Keima" を用いたオートファジーおよびミトファジー検出法を構築し、Atg7、Atg12やLC3等を介した既存のオートファジーとは異なる経路で誘導されるオートファジー関連因子の同一化を試みた。その結果、ミトファジーは既存のオートファジーとは異なるオルタナティブな経路を介して誘導されることが明らかになった。また、2つのMAPキナーゼ、ERK2とp38によって制御され、これらのキナーゼ活性依存的にミトファジーが調節されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a catabolic process that degrades cytoplasmic components and organelles, which utilizes lysosomal degradative function. We observed macroautophagy and mitophagy using a sensitive method in HeLa cells using the pH-sensitive fluorescent protein Keima. Using this method, we found that mitophagy was barely induced by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine treatment, which is widely used as an inducer of Parkin-related mitophagy, whereas a small but modest level of mitochondria was degraded by mitophagy with starvation or hypoxia. Mitophagy induced by starvation or hypoxia was not suppressed by knockdown of Atg7 and Atg12, or LC3, which are essential for conventional autophagy. Finally, we found that the MAPKs ERK2 and p38 were required for mitophagy. Based on these findings, we conclude that mitophagy in mammalian cells predominantly belongs to an alternative autophagy, and requires ERK2 and p38 signaling pathways.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：オートファジー ミトファジー リソソーム

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞質や細胞内小器官を隔離膜と呼ばれる膜成分が取り囲み、オートファゴソームと呼ばれる小胞となり、細胞内の物質分解を担うリソソームと融合することで、取り込まれた物質を分解する機構である。このオートファジーは、栄養飢餓時に分解産物を栄養として再利用し、生命を維持してだけでなく、生理機構として定常的に働き、異常タンパク質蓄積の除去、抗がん作用、抗病原体侵入作用といった多様な疾病予防のメカニズムとして作用している。さらに、過食の時代といわれる昨今、飢餓時の生体応答のメカニズムを解明することで生活習慣病の予防及び治療につながることも期待されている。このように、オートファジーは非常に重要な研究対象であるが、その分子機構に関しては不明なことが多い。

オートファジーの研究は、酵母を用いた遺伝学的解析で同定されたオートファジー関連遺伝子 (ATG 遺伝子) の発見により急速に進歩した。高等真核生物でも、酵母で同定された ATG 遺伝子のホモログの解析を中心に研究され、酵母で起こっているオートファジーと高等真核生物のオートファジーは、関連遺伝子も分子機構もほぼ同一であることが明らかになっている。しかしながら、最近の研究から、酵母ではオートファジーに必須の遺伝子 *ATG5* や *ATG7* のノックアウトマウス由来 MEF 細胞でも、オートファジーが効率よく起こっていることが示され [Nishida, Y., et al. *Nature* (2009) 461, 654-658]、従来からよく研究されている酵母と同じタイプのオートファジー経路以外に、Atg5/Atg7 非依存的な新しいオートファジー経路が存在することが明らかとなった。Atg5/Atg7 非依存的オートファジーでは、古典的オートファジーの分子機構と大きな相違があると推測されるが、Atg5/Atg7 非依存的オートファジーに関連した遺伝子は全く見つかっていない。

2. 研究の目的

(1) 高等真核生物でオートファジーに関連している遺伝子を同定するために、ショウジョウバエの遺伝子に対する RNAi ライブラリーを用いてハエ細胞の遺伝子を網羅的にノックダウンし、Keima 法でオートファジーが抑制される遺伝子を同定する。

(2) 新規に同定された遺伝子のが関与するオートファジー経路の分子機構を解析する。複数の遺伝子が同定された場合、Atg5/Atg7 非依存的オートファジーに関連する遺伝子の機能解析を優先的に行う。

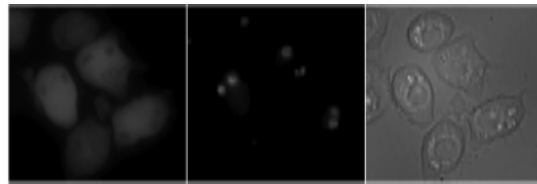
3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質 Keima によるオートファジー検出法の確立

pH 依存的に励起波長が変化する蛍光タンパク質 Keima は、中性環境では 440nm で、酸性環境では 590nm で励起される。細胞質に局在

する Keima は、オートファジーによってオートファゴソーム内に隔離された後リソソームと融合すると、周囲の環境が pH4 前後の酸性に変化する。従って、オートファジーによって取り込まれた Keima は酸性環境を観察する 590nm で励起されるようになる (図 1 : 細胞質に Keima を発現させたショウジョウバエ S2 細胞を飢餓条件下でオートファジー誘導し観察した。(左) 440nm の中性領域の Keima シグナル、(中央) 590nm の酸性領域の Keima シグナル、(右) 透過光画像)。既にこの手法は、ヒト細胞、ハエ細胞で成功しており、飢餓条件以外のオートファジー誘導条件の確立と実験精度の確認を行う。

図 1



- ① rapamycin など既知のオートファジー誘導薬物により 590nm 励起の蛍光シグナルが観察される否か。
- ② 3-methyladenine (3-MA) や wortmannin などのオートファジー阻害剤により、590nm 励起の蛍光シグナルが消失するか否か。
- ③ 飢餓条件や mTOR を介したオートファジー経路に存在する Atg5、Atg7、Beclin などの発現を dsRNA を用いたノックダウンにより 590nm 励起の Keima 蛍光シグナルが消失するか否か。
- (2) RNAi ライブラリーを用いたオートファジー関連遺伝子のスクリーニング
- (3) 新規同定タンパク質の既知のオートファジー経路への関与

同定されたタンパク質が、これまで明らかにされている Atg タンパク質を介したオートファジー経路に関与するか否かを以下のよう

- ① 各 Atg タンパク質ノックダウン時に、同定された遺伝子をノックダウンあるいは過剰発現させることにより、オートファジー誘導、オートファゴソーム形成あるいはリソソームとの融合・分解が正常に行われているのか抑制・促進されているのかについて、Keima、Atg8 の蛍光顕微鏡 (詳細な局在検討を目的とする場合は共焦点レーザー顕微鏡を用いる) での観察、ウエスタンブロッティングなどで検討を行う。
- ② Beclin や PtdIns 3-kinase (PI3K) 経路あるいは mTOR 経路の関与を確認するため、PI3K 阻害剤である 3-MA や wortmannin また rapamycin 処理時の影響について検討する。
- ③ オルガネラ特異的オートファジー (ミトコンドリア、ペルオキシソームなどのオルガネラを特異的に分解するオートフ

アジを各々マイトファジーあるいはペキソファジーなどと呼ぶ)に 関与するか否かについて、各オルガネラへのターゲッティングシグナルを付した Keima を発現させ、細胞質 Keima を発現させた系と同様の実験を行う。

4. 研究成果

本研究から得られた成果について以下に記す。

- (1) Tetracycline 添加非誘導性の HeLa 細胞を用いて細胞質に Keima を発現させた安定発現体を作製した。この細胞株がオートファジーを観察する系として機能することを、飢餓培地での培養や mTOR を阻害しオートファジーを誘導すると知られている rapamycin を処理することで検証した。その結果、新たなオートファジー検出法として有用であることを確認した。さらにオートファジー阻害剤 3-methyladenine などを用いて検証し、新たなオートファジー検出法として有用であることを確認した (図 2)。

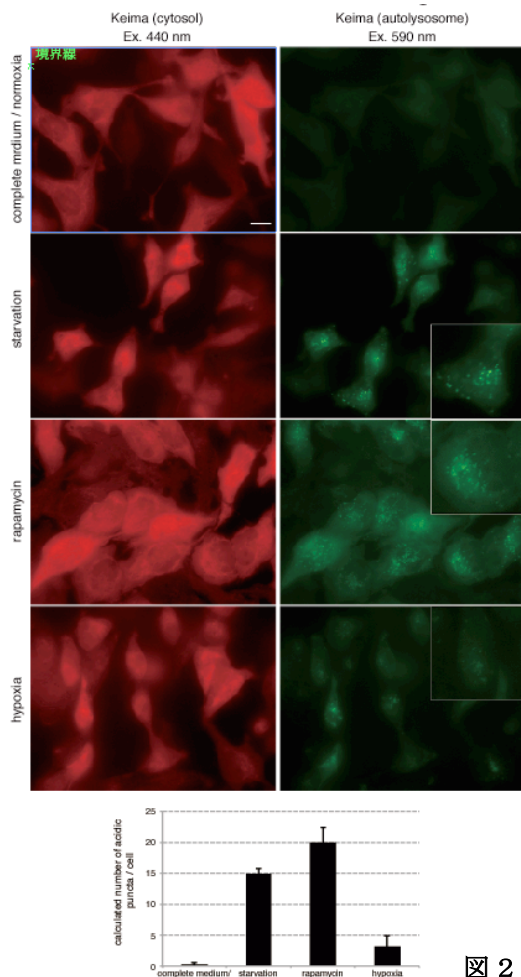


図 2

- (2) 上記 (1) で示した細胞質に Keima を発現させた細胞および新たにミトコンドリア移行シグナルを付加した Keima を発現させた細胞を同様に構築した。これらの細胞を用いて、バルクなオートファジーあるいはミトコンドリアを特異的に

分解するミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) を検出する系を確立した。さらに、マイトファジーもオートファジーと同様に、3-methyladenine 処理により飢餓で誘導されるマイトファジーも抑制されることが分かった (図 3)。

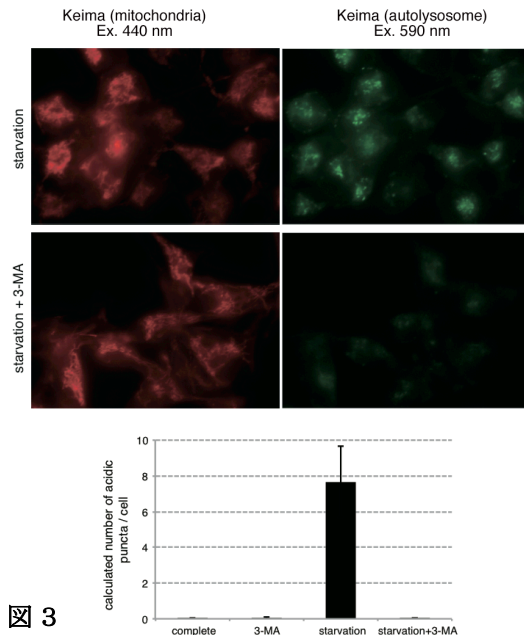


図 3

- (3) Keima を用いた実験系で観察されるマイトファジーは、一般的なオートファジー誘導剤である rapamycin やミトコンドリア脱共役剤 CCCP 等の処理では誘導されず、飢餓あるいは低酸素条件下 (1% O₂) で培養時に効率よく経時的に誘導されることが明らかとなった (図 4、図 5)。

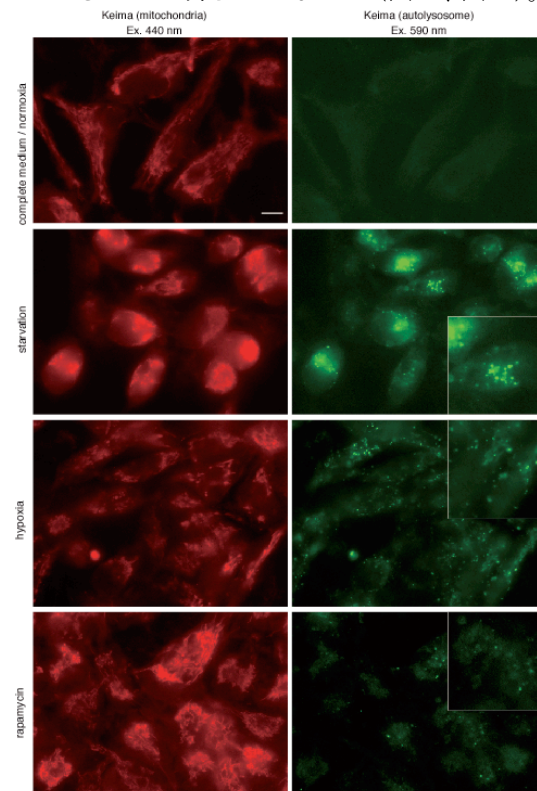


図 4

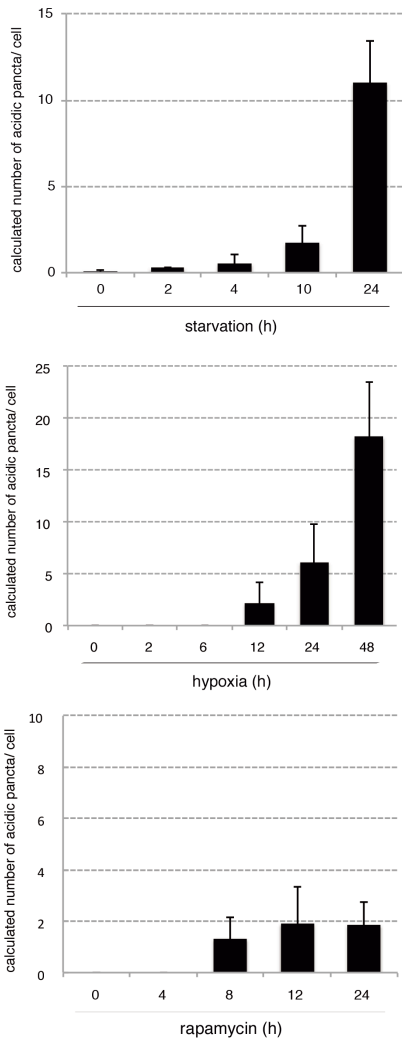


図 5

- (4) siRNA を用いたノックダウン実験より、飢餓や低酸素条件下で誘導されるマイトファジーは、オートファジーに必須であるとされる Atg 関連遺伝子 Atg7 あるいは Atg12、LC3 (酵母 Atg8 のホモログ) に非依存的なオルタナティブな経路を介することが明らかとなった。さらに、このマイトファジーは Rab9 によって制御されていることも明らかになった (図 6)。

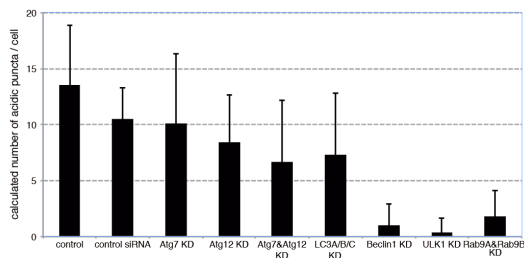


図 6

- (5) 飢餓や低酸素条件下で誘導されるマイトファジーは、MAPK である ERK2 および p38 によって制御されていることが、siRNA を用いたノックダウンによる実験 (図 7) および各 MAPK 阻害剤を用いた

実験により明らかとなった。他の MAPK のノックダウンによるマイトファジーへの影響は認められなかった。

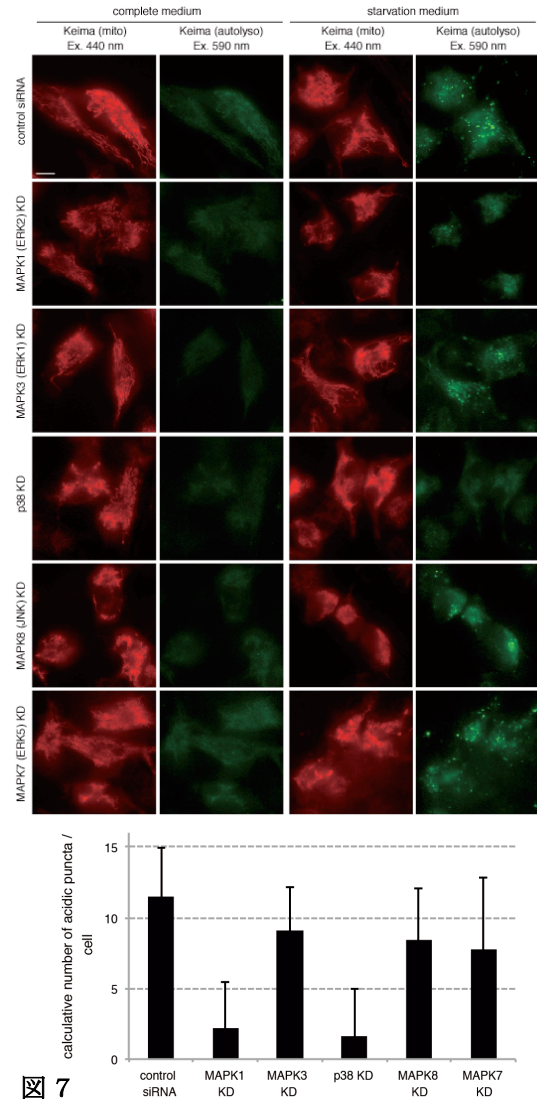


図 7

- (6) 飢餓あるいは低酸素条件下で培養時に、ERK2 の経時的なリン酸化の増加が認められマイトファジーの誘導と創刊することから、ERK2 の活性化がマイトファジーの誘導に寄与することが明らかになった (図 8)。

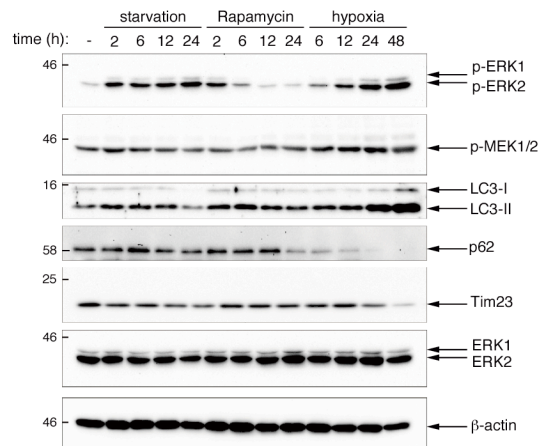


図 8

計画当初、新規オートファジー関連遺伝子の同定を目的として、ショウジョウバエの約13,000 遺伝子のノックダウンを行うために、この網羅的な遺伝子解析に必要な不可欠である RNAi ライブラリーを Ambion® もしくは Dharmacon® から購入予定であった（計画当初は購入可能であった）。しかしながら、購入時（平成23年10月）に発売中止となったことが明らかになったため、当初予定していたショウジョウバエ RNAi ライブラリーを用いたスクリーニングが不可能となった。

そこで、計画を変更し、ショウジョウバエと比較してこれまでのオートファジーに関する知見が豊富なヒト培養細胞を用いて新規オートファジー関連因子の同定を行うこととした。その結果以上のような知見が得られた。

これらの結果は、マイトファジーが既存のオートファジーとは異なる MAPK シグナル経路によって制御されていることを示唆しており、新たなオートファジーの分子メカニズムを解析するにあたって、非常に重要であると考えられる。また、マイトファジーシグナル経路の解明は、今後、より直接的なマイトファジー制御因子を明らかにするため、さらには損傷を受けたミトコンドリアの細胞内蓄積によって発症するミトコンドリア関連疾患の根治への大きな前進であると考えている。

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5件）

- ① Aihara, M., Jin, X., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Matsushima, Y., Oku, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiyumi, T., Yamamoto, T., Sakai, Y., Kang, D., and Kanki, T.
The Tor and Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32.
J. Cell Sci. In Press, 2014 (査読有)
- ② Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiyumi, T., and Kang, D.
Casein kinase 2 is essential for mitophagy.
EMBO Rep. 14, 749-845, 2013 (査読有)
DOI: 10.1038/embor.2013.114.
- ③ Hirota, Y., Kang, D., and Kanki, T.
The Physiological role of mitophagy: new insights into phosphorylation events.
Int. J. Cell Biol. 2012, 354914, 2012 (査読有)
DOI: 10.1155/2012/354914.
- ④ Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y.,

Hirota Y., Saigusa, T., Uchiyumi, T., and Kang, D.

Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast.

J. Biol. Chem. 287, 3265-3272, 2012 (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M111.280156.

- ⑤ Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiyumi, T., and Kang, D.

Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy.

Mol. Biol. Cell 22, 3206-3217, 2011 (査読有)

DOI: 10.1091/mbc.E11-02-0145.

〔学会発表〕（計4件）

- ① 廣田有子、栗原悠介、金 秀蓮、三枝 徹、藤本景子、田中嘉孝、神吉智丈
ミトコンドリア分解シグナルの解明
生体機能と創薬シンポジウム
2013. 8. 29 (福岡)
- ② 金 秀蓮、神吉智丈、相原正宗、栗原悠介、廣田有子、三枝 徹、康 東天
The participation of mitophagy-related genes to phosphorylation events of Atg32.
第35回日本分子生物学会年会
2012. 12. 11 (福岡)
- ③ 栗原悠介、神吉智丈、廣田有子、青木義政、三枝 徹、内海 健、康 東天
出芽酵母に置けるマイトファジーの生理的役割
第44回酵母遺伝学フォーラム
2011. 9. 5 (福岡)
- ④ Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., and Kang, D.
Phosphorylation of Ser114 on Atg32 mediates mitophagy.
European Meeting on Mitochondrial Pathology.
2011. 6. 20 (Spain)

〔図書〕（計1件）

- ① Hirota, Y., Fujimoto, K., and Tanaka, Y.
Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? Rab GTPases in Autophagy.
InTech, 2013 (18 ページ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mitophagy.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 有子 (HIROTA, Yuko)

九州大学・薬学研究科 (研究院)・助教

研究者番号：50588259