

# 研究報告書

## 「恒常性維持・変容を支える細胞内分解系オートファジーの生理的意義」

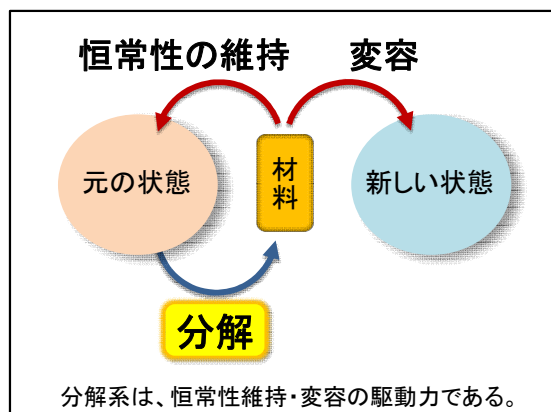
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 9 月～平成 28 年 3 月

研究者: 久万 亜紀子

### 1. 研究のねらい

生体は動的に恒常性を維持し、あるいは変容して生きている。恒常性の維持とは、生体の内部環境をほぼ一定に保つことであり、例えば古くなった物を新しい物と交換することで元の状態を維持する。一方変容とは、新しい状態を作り出すことであり、分化や環境変化(栄養飢餓など)への適応が挙げられる。例えば、分化に際しては細胞内構成因子が大きく入れ替わり、飢餓に対しては代謝系が大きく変化する。恒常性の



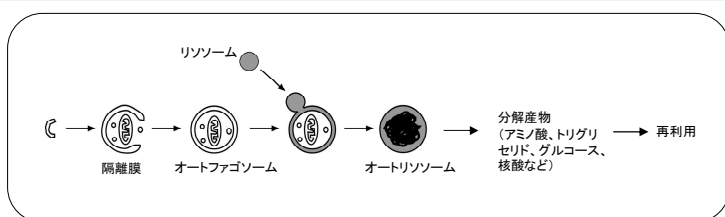
維持・変容を生み出すためには材料が必要である。代謝回転の盛んな生体では、材料の調達手段として分解系が特に重要となる。分解産物を新たな合成の材料として提供できるからである。また分解系によって、既存物を消去することも新しい環境を作るうえで有効である。よって、壊すこと(分解系)が作り出すことを支えていると言える。分解系の中でも、タンパク質分解は既存のタンパク質を分解してアミノ酸を細胞に供給し、それが新しいタンパク質の合成を可能にするため、恒常性の維持・変容においては特に重要であると考えられる。本研究のねらいは、「タンパク質分解系は恒常性維持・変容を生み出すための駆動力となるプロセスである」(図1)という立場から、細胞内の主要な分解系であるオートファジーを理解し、生体の恒常性維持・変容機構の解明に挑戦することである。具体的には、オートファジーの生理機能と制御機構に焦点を当てる。これらは、オートファジー分野における最重要課題の1つであるが、従来の方法ではオートファジーの一側面だけの評価であったり、生理条件を十分に反映させるのが難しかったりした。本研究では、申請者らが作製した新しいモデルマウスを活用し、メタボローム解析やグルコースクランプなどの実験手法を取り入れて、これらの問題に取り組む。これらの解析により、「分解系」という切り口から、生体の恒常性維持・変容機構の理解をめざす。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

オートファジーは、細胞質成分を分解するシステムである。オートファジーが誘導されると、膜が細胞質成分を包み込みながら伸長し、オートファゴソームと呼ばれる小胞を形成する。続いて、オートファゴソームがリソソーム(各種分解酵素を含むオルガネラ)と融合することで、オートファゴソームで包んだ中身が分解される。分解産物は、細胞内で再利用される(図)。オー

オートファジーは摂食・絶食によってその活性がダイナミックに制御されるが、その制御機構の詳細は不明である。さらに、これまでの研究からオー

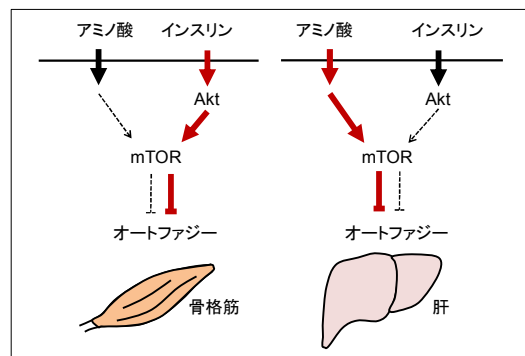


トファジーが生体内での様々な現象に関わることがわかってきているが、多様な基質をバルクに分解することから、新たな役割が十分に考えられた。そこで本課題では(1)個体におけるオートファジー制御機構の理解、(2) 栄養代謝におけるオートファジーの役割、(3)オートファジーの新たな生理機能の探索という3つのテーマを掲げて取り組んだ。(1)については、摂食によって大きく変動するインスリンおよびアミノ酸によるオートファジーの抑制効果を臓器別に解析した。これにより、肝臓ではアミノ酸、骨格筋ではインスリンによって強く制御されることを明らかにした。これらの単独投与によって、ほぼ摂食と同等にオートファジー活性が抑制されることから、アミノ酸およびインスリンが摂食によるオートファジーの主要な制御因子であると考えられる。(2)については、オートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損肝臓の解析を行った。メタボローム解析により、絶食時の  $\beta$  酸化が *Atg5* 欠損マウスで低下していること見出ししており、脂質代謝に重要な転写因子 *PPAR $\alpha$*  の活性低下がその原因として考えられた。(3)については、私たちはこれまでオートファジーの生理機能を調べるためにオートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスの解析を行ってきた。*Atg5* 欠損マウスは生後 1 日で死亡するが、その死因は明らかではなかった。今回、*Atg5* 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての *Atg5* 欠損マウスが新生仔死亡を回避したことから、*Atg5* 欠損マウスの死因は神経異常(吸啜障害を含む)であることが明らかになった。さらに、このマウスを用いて全身網羅的に表現型解析を行ったところ、新たな表現型として生殖器の異常と鉄吸収異常を見出した。これらの知見は、オートファジーの生理機能および病態への関与を理解する上で重要であり、今後の解析につなげたい。

## (2) 詳細

### 研究テーマ (1) 「オートファジーの制御機構」

**研究成果:** マウス個体において、オートファジーの活性は摂食・絶食によってダイナミックに制御される。本研究では、生体内におけるオートファジーの制御機構を理解することを目的に、摂食・絶食で大きく変動する因子であるインスリンとアミノ酸によるオートファジー抑制効果を、グルコースクランプ法を利用して検討した。その結果、これらの単独投与によって、ほ



ぼ摂食と同等にオートファジー活性が抑制されることから、アミノ酸およびインスリンが摂食によるオートファジーの主要な制御因子であると考えられた。また、骨格筋ではインスリンによってオートファジーが強く抑制されるのに対し、肝臓では抑制効果が弱いことが分かった。一方、アミノ酸は肝臓のオートファジーを強く抑制することが明らかとなった。

**達成状況:** 臓器による制御の違いが生じるメカニズム解明が課題として残ったが、インスリンとアミノ酸のオートファジー抑制効果を個体で評価した重要な仕事であると考え、平成 25 年 1 月に JBC に投稿し、6 月に受理された (JBC 288; 21074–21081, 2013)。

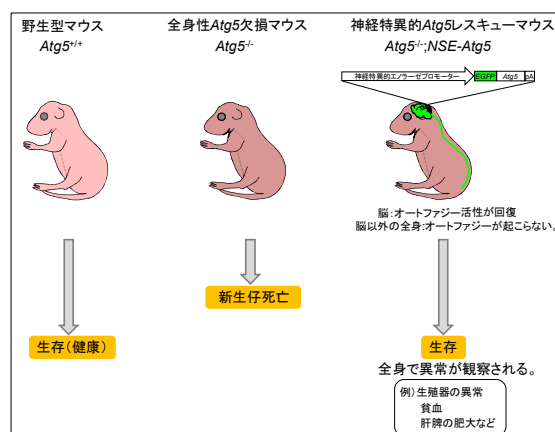
### 研究テーマ (2) 「栄養代謝におけるオートファジーの役割」

**研究成果:** オートファジーによる栄養素リサイクルの重要性を明らかにすることを目的に、肝特異的 *Atg5* ノックアウトマウスの肝臓のメタボローム解析を行った。オートファジー欠損により解糖系・ $\beta$  酸化・アミノ酸・リン脂質代謝系の代謝中間体に影響が出ることが明らかとなった。特に、*Atg5* 欠損肝では絶食時のアセチル CoA およびケトン体の濃度が低く、 $\beta$  酸化の低下が疑われたため、本研究では脂質代謝に注目した解析を行った。コントロールマウスでは、絶食により脂肪組織から供給された脂肪酸が肝臓でトリグリセリドとして蓄積されるが、*Atg5* 欠損肝では観察されなかった。脂肪酸代謝過程の主要因子の発現を mRNA レベルで調べたところ、*Atg5* 欠損肝では脂質代謝の主要制御因子である PPAR $\alpha$  の発現と活性化が強く抑制されていることが分かった。PPAR $\alpha$  の発現および活性低下は、培養細胞における *Atg5* ノックアウトおよびノックダウンでも確認され、オートファジー欠損によるプライマリーな異常であると考えられた。オートファジーが転写活性調節に関与する可能性を含め、解析を進めている。

**達成状況:** オートファジーによる栄養リサイクルの重要性を解明する目的であったが、肝臓では様々な表現型が観察されリサイクルのみを解析することが難しいと判断し、脂質代謝に注目した表現型解析に計画を変更した。このため進行が遅れた。

### 研究テーマ (3) 「オートファジーの生理機能」

**研究成果:** 私たちはこれまでオートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスを用いて、オートファジーの生理機能解析を行ってきた。*Atg5* 欠損マウスは生後 1 日で死亡するが、その死因は明らかではなかった。今回、*Atg5* 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての *Atg5* 欠損マウスが新生仔死亡を回避した。よって、*Atg5* 欠損マウスの死因は神経異常(吸啜障害を含む)であることが明らかとなった。



さらに、この神経特異的 *Atg5* レスキューマウスを用いて全身網羅的に表現型解析を行ったところ、成長不全、肝脾腫、複数組織における炎症、生殖器の委縮、鉄欠乏、貧血などを認めた。特に顕著であった生殖器の委縮と鉄欠乏について、詳細な解析を行った。

神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの雄では、精巣・精嚢が小さく、成熟精子の減少、唾液腺の導管発達不全が見られた。雌では、卵巣・子宮が小さく、黄体が形成されない。これらはテストステロンおよび性腺刺激ホルモン (LH、FSH) の低下によるホルモン制御異常に起因することが示唆された。また、神経特異的 *Atg5* レスキューマウスは鉄欠乏性貧血を呈し、小腸上皮細胞における鉄吸収に関連する因子 (フェロポーチン、DMT1) の発現低下が観察された。その原因としてこれらの因子の転写誘導不全が疑われた。

**達成状況:** (1) 神経でオートファジー活性を回復させれば *Atg5* 欠損マウスの新生仔死亡がレスキューされること、(2) アダルトマウスの全身表現型解析結果、これら2つをまとめて論文投稿した。さががけ研究期間内には、鉄吸収異常およびホルモン低下を伴う性腺委縮の発症機序までは明らかにできなかったが、オートファジーの生理機能理解への手掛かりとして今後の解析につなげたい。

### 3. 今後の展開

今回、神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの全身解析を通じて、オートファジー遺伝子欠損の影響が免疫系、脂肪組織、生殖器に大きく出ることが明らかとなった。また、鉄欠乏による貧血が確認された。今後は、これらの発症機序を明らかにすることで、オートファジーの生理機能および病態への関与を理解したい。また、今回、オートファジーによる細胞内クリアランス作用を臓器間で比較するなど、このマウスモデルでしか成し得ない貴重な知見を得ることができた。オートファジーによる細胞内タンパク質の品質管理における寄与は、肝や骨格筋で大きかったが、他の臓器では顕著ではなかった。このことから、従来言われているクリアランス不全がすべての表現型を説明できるわけではないことは明らかである。今後、このモデルマウスを用いて、各臓器におけるオルガネラの品質やオートファジー選択的基質 p62 蓄積の表現型への寄与などを評価することで、いままで一様に議論されていたオートファジーの生理的役割の臓器ごとの違いが明らかになると考えられる。オートファジーの生理的意義のさらなる理解へとつなげたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、3つの研究テーマを掲げて取り組んだ。

(1) 個体におけるオートファジー制御機構の理解

(2) 栄養代謝におけるオートファジーの役割

(3) オートファジーの新たな生理機能の探索

研究テーマ(1)と(3)については、一定の成果が得られ、おおむね当初の目的を達成できたと言える。研究テーマ(2)については、当初、オートファジーによる栄養リサイクルの重要性を解明する目的であったが、肝臓では様々な表現型が観察されリサイクルのみを解析することが難しいと判断し、脂質代謝に注目した表現型解析に計画を変更した。このため進行が遅れた。研究テーマ(3)で解明した *Atg5* 欠損マウスの新生仔死亡の原因については、2004年の論文報告以降、未解決の問題として分野に残された課題であり、本研究でこの問題を解決したことは特筆に値する。また、オートファジー遺伝子欠損マウスは生後1日で死亡するため、アダルトマウスにおける全身解析ができなかった。本研究において初めて全身網羅的解析が可能となり、全身観察結果を論文にまとめたことには大きな意義があったと考える。また、オートファジーによる細胞内クリアランスの作用を臓器間で比較するなど、このマウスモデルでしか成し得ない、貴重な知見を得ることができた。本研究をさらに発展させ、オートファジーの生理機能の理解へとつなげたい。



(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、オートファジーの生理機能と制御機構に焦点を当て、生体の恒常性維持・変容機構の解明に挑戦することであり、具体的には、摂食によるオートファジーの主要な制御因子は臓器によって異なり、肝臓ではアミノ酸、骨格筋ではインスリンであることを見出した。さらに、オートファジー遺伝子 Atg5 欠損マウスは生後 1 日で死亡するが、Atg5 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての Atg5 欠損マウスが新生仔死亡を回避できたことにより、オートファジー欠損での全身網羅的な表現型解析が可能となり、これらのマウスでは生殖器の委縮と鉄欠乏が特に顕著であることを見出し、その分子機序を解析中である。本マウスを用いた今後の研究により、さらにオートファジーの全身における生理的意義の理解が進むことが期待される。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施することができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国内の学会ではあるが招待講演も多数実施しており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、また、他領域のさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Takako Naito, Akiko Kuma, and Noboru Mizushima<br>Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> (2013) 288(29) 21074-81. |
| 2. Takako Watanabe-Asano, Akiko Kuma, Noboru Mizushima<br>Cycloheximide inhibits starvation-induced autophagy through mTORC1 activation. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> (2014) 445(2) 334-9.               |
| 3. 投稿中。  |

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### [招待講演]

- 久万亜紀子「新規モデルマウスによるオートファジーの生理機能解析」第 35 回日本分子生物学会年会、ワークショップ、福岡、2012 年 12 月 11 日
- 久万亜紀子「哺乳動物におけるオートファジーの生理機能」日本農芸化学会 2014 年度大会、シンポジウム、東京、2014 年 3 月 30 日
- 久万亜紀子「哺乳動物におけるオートファジーの生理機能」第 77 回日本生化学会大会、シンポジウム、神戸、2014 年 10 月 16 日

4. 久万亜紀子「Physiological role of autophagy in mammal」日本薬学会第 135 年回、シンポジウム、神戸、2015 年 3 月 27 日

[邦文著書]

1. 8 章:哺乳類におけるオートファジーの生理的役割  
水島昇・吉森保 編「オートファジー:生命をささえる細胞の自己分解システム」化学同人 100-116 (2015)
2. 久万亜紀子、水島昇「代謝とオートファジー」  
春日雅人 編集「糖尿病学イラストレイテッド」羊土社 285-290 (2012)

[邦文総説]

1. 久万亜紀子、水島昇 栄養代謝とオートファジー 生体の科学 65: 339-343 (2014)
2. 久万亜紀子、水島昇 オートファジーの生理機能 Diabetes Frontier 24: 493-500 (2013)
3. 吉井紗織、久万亜紀子、水島昇 オートファジーの生理機能 Bio Clinica 28: 622-626 (2013)
4. 貝塚剛志、久万亜紀子、水島昇 mTOR によるオートファジー制御 細胞工学 31:1313-1317 (2012)