

研究課題別評価

1 研究課題名:哺乳動物におけるオートファジーの役割とその制御機構

2 研究者氏名:水島 昇

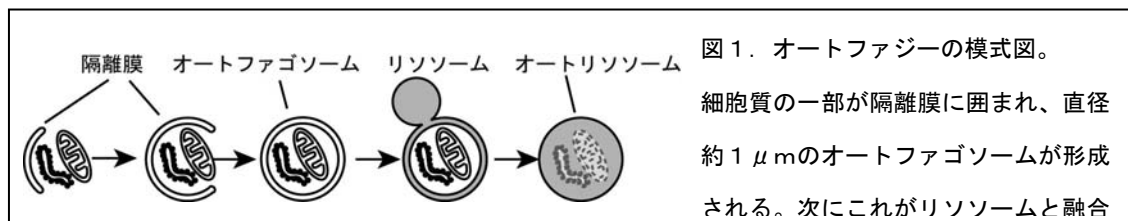
研究員:久万 亜紀子 (研究期間 H.15.4~H.16.3)

金澤 匠 (研究期間 H.16.4~H.17.3 (H.15.7~H.16.3 は技術員))

砂山 潤 (研究期間 H.16.11~H.18.3)

3 研究のねらい:

生体を最適な状態を保つためには自己の構成成分を合成するだけではなく、環境変化に応じてその構成要素を分解処理することも必要である。細胞内にはさまざまなタンパク質分解系が存在する。それらはユビキチン・プロテアソーム系に代表される選択的タンパク質分解系と、リソソームにおける原則として非選択的な分解系に大別される。オートファジー(自食作用)は後者の主要経路であり、細胞質の一部をまとめてリソソームで分解する方法である(図1)。これは一見大雑把で大胆とも思える分解方法であるが、全ての真核生物に備わっている普遍性の高い細胞機能である。本研究課題では、この不思議な分解系が、私たち哺乳類ではどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。



4 研究成果:

私たちはまずオートファジーがマウス個体において、いつ、どこで、どのくらいおこっているかを調べた。この目的のために、私たちがこれまで明らかにしてきたオートファゴソーム形成に関わる分子を利用し、全身のオートファゴソームが蛍光標識される「オートファジー検出マウス(GFP-LC3トランスジェニックマウス)」を作製、解析した。このマウスは蛍光顕微鏡を用いてオートファジーの活性を判断できるため、個体レベルでのオートファジー研究に非常に有効となった。実際私たちは絶食時にマウスのほぼすべての器官(脳を除く)でオートファジーが誘導されることを確認した。また、絶食だけではなく、出生直後の新生児の全身でもやはりオートファジーが激しくおこっていることを発見した。哺乳類の新生児は出生直後に激しい生理的飢餓に遭遇することが知られているた

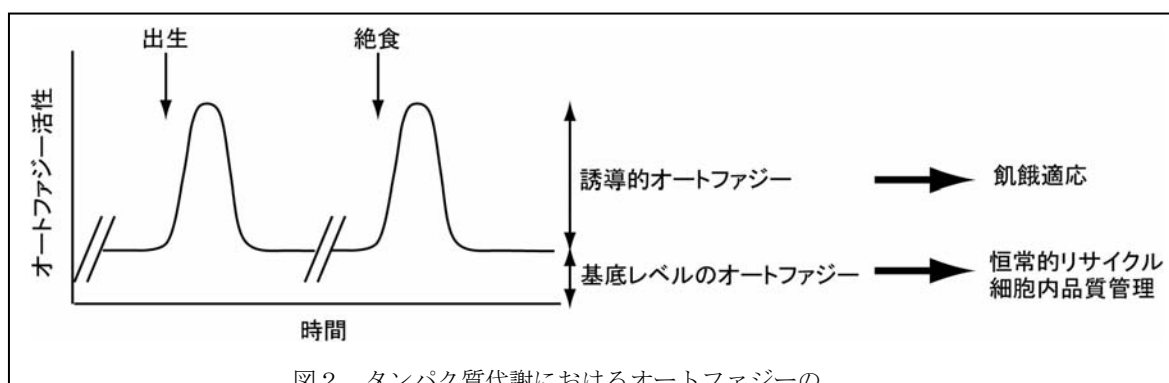
め、このことは糖や脂質のみならず、自らのタンパク質を分解することも重要であることを示唆した。

次にこの飢餓に応答して誘導されるオートファジーの生理的意義を知るために、私たちはオートファジーの能力を欠損したマウスを作製した。これにはオートファゴソーム膜の伸長に必要な Atg5 の遺伝子破壊を行った。このマウスは一見ほぼ正常に生まれてくるが、生後1日以内に死亡する。マウスの栄養状態を調べたところ、生直後は正常であった血中や組織内のアミノ酸濃度が生後10時間には著明に減少していることが判明した。このことは、新生児マウスはオートファジーを一過性に誘導することで、すなわち自己タンパク質の過剰分解によって産生したアミノ酸を利用することで、この新生児飢餓を凌いでいることを示している。

さらに生後の組織特異的オートファジーの機能を知るために、神経系特異的 Atg5 遺伝子欠損マウスを作製、解析した。神経細胞でオートファジーが機能なくなると、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積し、やがて神経変性疾患様の症状を呈することが明らかとなった。このことはオートファジーがアミノ酸産生だけでなく、神経細胞内の品質管理機構としても重要であることを示している。一方、目の水晶体や赤血球の分化過程で細胞内オルガネラが大規模に分解されることが知られているが、オートファジーノックアウトマウスを用いた解析から、これらの過程にはオートファジーは重要ではないことが明らかとなった。

またオートファジーの制御機構については、GFP-LC3 マウスを用いた解析から少なくともインスリンが重要なオートファジー抑制因子であることを確認した。さらに未知のオートファジー誘導因子の存在が示唆されたため、現在その同定を進めている。

本研究課題では、独自のオートファジーモニターマウスを利用して、タンパク質代謝に焦点をあてて哺乳類におけるオートファジーの生理的意義を解析した。上記の結果より、誘導的オートファジーは栄養制御に、恒常的な基底レベルのオートファジーは細胞内新陳代謝に非常に重要であることが理解される(図2)。オートファジーはこの他にも、細胞内侵入細菌除去や、抗原提示、細胞死、癌化などにおいて多彩な役割をもつことが明らかになりつつある。本研究課題の研究資材と研究成果が今後この分野の発展に大きく寄与することが期待される。



5 自己評価:

本研究課題によって得られた研究資材と、研究成果は提案当初の目標を達成し得たと考えられる。オートファジーを簡便にモニターしうる GFP-LC3 マウスはすでに 60 カ所を超える国内外の研究室で利用されており、その有用性が裏付けられている。また、遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析は哺乳類におけるオートファジーの生理的役割を世界に先駆けて報告するとともに、新生児期というユニークな時期における栄養代謝学における新たな視点を提供した。また神経変性疾患との関連は、今後臨床と直結すると思われる課題であり、抗加齢医学とも大きな接点をもつものであると考えられる。オートファジー研究は現在大きく展開している時期であり、国際的な競争に負けないためにも博士研究員の参加の意義は絶大であった。特に新生児マウスの研究はさきがけの博士研究員が筆頭著者としてなした仕事であり、本研究システムの機動性やメリットが十分に活用されたと考えられる。

6 研究総括の見解:

オートファジーの生理学的役割についてまったく新しい視座を導入し、国際的にもこの分野の第一人者と目されるに至った。近く本研究者主導で国際学会を主催することになった。当該研究者によれば、開発されたオートファジー能力欠損マウスは世界中で利用されているという。その結果、栄養学、加齢医学領域でもオートファジー現象を踏まえての新たな視座を中心に胎動が始まっている。今後の展開を見守りたい。

7 主な論文等:

論文

1. Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., Mizushima, N. Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 485-489 (2006).
2. Mizushima, N. A β generation in autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 171, 15-17 (2005).
3. Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 12, 1535-1541 (2005).
4. Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., Sasakawa, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727-731 (2005)
5. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 432, 1032-1036 (2004).
6. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A.,

- Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., Yoshimori, T. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 306, 1037–1040 (2004).
7. Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani–Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form–II formation. *J. Cell Sci.* 117, 2805–2812 (2004).
 8. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15, 1101–1111 (2004).
 9. Mizushima, N., Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2491–2502 (2004).
 10. Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. Mouse Apg16L, a novel WD–repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12–Apg5 conjugate *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688. (2003)

(他英文 11 編、和文総説 15 編)

受賞

平成 17 年 12 月 第 3 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞

招待講演

1. 水島昇 哺乳類オートファジーの生理的意義：特に新生時期について 第77回日本生化学会大会 シンポジウム「Uncover the mystery of proteolysis」 横浜 2004年10月
2. Mizushima N, “Molecular dissection and visualization of autophagy in mammals”, 16th International Congress of the International Federation of Association of Anatomists, Symposium “Endosomal/lysosomal system in mammalian cells” 京都 2004年8月
3. Mizushima N “The role of autophagy in the embryonic and neonatal periods” Gordon conference “Autophagy in stress, development and disease” イタリア 2005 年 4 月
4. 水島昇 Autophagy: nutrient regulation and intracellular clearance 第 78 回日本生化学会大会 シンポジウム「Autophagy unveiled: defense and survival by self-eating」 神戸 2005 年 10 月
5. 水島昇 タンパク質代謝におけるオートファジーのふたつの役割 第 28 回日本分子生物学会 シンポジウム「多彩なタンパク質分解マシナリー」 福岡 2005 年 12 月

(他 5 件)