

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390079

研究課題名 (和文) 脂肪組織分化と脂質代謝におけるオートファジーの役割

研究課題名 (英文) The role of autophagy in adipocyte-differentiation and lipid metabolism

研究代表者

木南 英紀 (KOMINAMI EIKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10035496

研究成果の概要：

細胞質成分の大規模分解系であるオートファジーと脂質代謝および脂肪細胞の分化との関わりを明らかにする目的で、脂肪組織特異的オートファジー不能マウスおよびオートファジー不能細胞を脂肪細胞へと分化させ解析した。その結果、オートファジーは細胞内の中性脂肪を蓄積するオルガネラである脂肪滴の形成機構には関わらないが、前駆細胞から脂肪細胞への分化に転写レベルで関わっていることが認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：オートファジー、脂肪滴 (Lipid droplet)、脂肪細胞、細胞分化、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞質成分の大規模分解系である。オートファジーは単膜構造体の隔離膜が伸張して細胞質成分を取り囲み、二重膜のオートファゴソームを形成し、最終的にリソソームと融合することによって内容物の細胞質成分を分解する基本的には非特異的な分解系である。オートファゴソーム膜の形成は、ユビキチン様結合システムにより進行し、E1様酵素 (Atg7) を共有する 2 つの反応系

(Atg12 結合システムおよび LC3 結合システム) が必須である。我々は哺乳動物において、オートファゴソームの膜形成に関わる様々なエレメントの同定、それらの機能解析などを行い、さらにオートファジー不能マウス (ATG7 欠損マウスおよび条件付き ATG7 欠損マウス) の作成をし、哺乳類におけるオートファジーの生理機能、高次機能の解析を行ってきた。肝臓特異的なオートファジー不能マウスを用いた研究では、生体内でもオートファジーが大規模分解に寄与すること、また不能マウスでは、絶食によるオートファジ

一が起こらず、オルガネラ・タンパク質の肝細胞内蓄積によって著名な肝肥大、肝機能異常、生存率の低下をもたらすことを示した。さらに摂食時における基準レベルのオートファジーも傷害を受けたオルガネラや細胞成分の除去に極めて重要な役割を果たしていることを個体レベルで示した。その後、神経変性疾患の遺伝的素因を持たないマウスを用いて脳特異的オートファジー不能マウスを作成したところ、これらのマウスはユビキチン凝集体の蓄積を伴う神経変性疾患様症状を呈することが明らかとなった。このことから常に富栄養化状態にあり、栄養制御を受けない脳でも基準レベルのオートファジーが神経変性疾患を未然に防ぐ、細胞保護作用として働いていることが明らかとなった。

またオートファジーは上記の代謝制御や細胞浄化作用に加えて、細胞に進入してくる病原性細菌の除去に関与することが多くの細菌について次第に明らかにされつつある。このことはオートファジーが一種の自然免疫のような感染防御機構としても働くことを示している。

このようにオートファジーの新しい機能が報告され始めていたが、本研究はオートファジーの予想外の新しい機能を明らかにしようとしたものであった。我々は、肝臓特異的なオートファジー不能マウスを解析した際に、コントロールマウスでは肝細胞に脂肪滴が多数見られるのに対して、オートファジー不能マウスでは脂肪滴が殆ど見られないということに気付いていた。この観察に基づき、脂肪滴の形成あるいは脂肪組織の形成・分化へのオートファジーの関与について研究を始めた。

2. 研究の目的

本研究は、オートファジーの分子装置が脂質代謝および脂肪組織の分化にどのような役割を果たしているのか明らかにすることを目的として、オートファジー不能細胞、脂肪組織特異的オートファジー不能マウス、肝臓特異的オートファジー不能マウスを用いて研究を行った。

3. 研究の方法

脂肪組織特異的オートファジー不能マウスの解析

条件付き ATG7 欠損マウスと脂肪組織特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウス (Fabp4 Cre マウス) を交配し、脂肪組織特異的オートファジー不能マウス (Atg7^{F/F}:Fabp4-Cre マウス) を作成した。このマウスおよびコントロールのマウスから白色脂肪組織 (WAT) と褐色脂肪組織 (BAT) を採取し、生化学的解析、組織学的

解析に供した。

オートファジー不能マウス胚性線維芽細胞を用いた脂肪細胞分化の解析

帝王切開により摘出したマウス胚より胚性線維芽細胞を採取し、各細胞クローンの遺伝子型を確認後、3-Isobutyl-1-methylxanthin、Dexamethasone、Insulin で刺激し脂肪細胞へと分化させ、分化の進行を生化学的および形態的にモニタリングした。

誘導性肝臓特異的オートファジー不能マウスにおける脂肪滴形成の解析

誘導性肝臓特異的オートファジー不能マウスを用いて、オートファジー不能化直後および7日後の肝臓を採取し、生化学的および組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

オートファジーと脂肪滴形成の関連を検討するために、脂肪組織特異的オートファジー不能 (Atg7^{F/F}:Fabp4-Cre) マウスおよびオートファジー不能 (Atg7^{-/-}) マウスより単離したマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いて解析を行なった。

脂肪組織特異的オートファジー不能マウスの白色脂肪組織 (WAT) は野生型に較べて重量が減少していた。また顕微鏡下においては脂肪滴の小型化が観察され、生化学的解析の結果、トリアシルグリセロール (TAG) レベルの有意な低下が認められた。一方、褐色脂肪組織 (BAT) は野生型と大きさに違いが認められず、TAG レベルも有意な差が認められなかった。脂肪滴に局在するタンパク質お

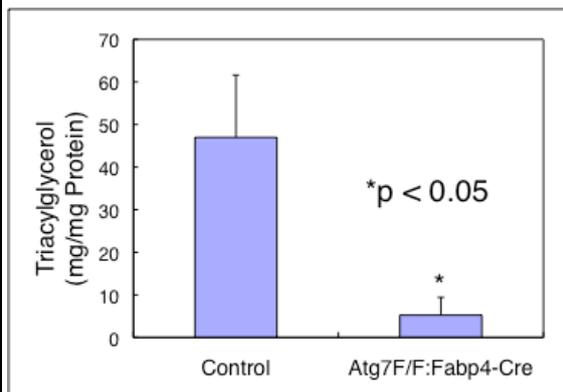


図 1. 脂肪組織特異的オートファジー不能マウスの白色脂肪組織トリアシルグリセロールレベル

よび脂肪細胞分化マーカーのウェスタンブロット解析を行なったが、脂肪組織特異的オートファジー不能マウスの WAT、BAT ともに野生型との大きな差異は見いだせなかった。

オートファジー不能 MEF を脂肪細胞分化誘導培地にて分化させたところ、野生型の細

胞と比較して脂肪細胞に分化した細胞（大きな脂肪滴を形成した細胞）は少なく、TAGの蓄積も有意に低くなることが明らかとなった。

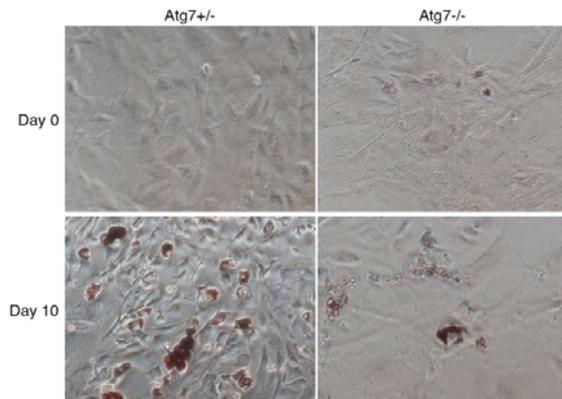


図 2. 脂肪細胞に分化させたオートファジー不能マウス胚性線維芽細胞 (MEF)

また Pelilipin, Adiponectin, HSL などの脂肪細胞特異的タンパク質の発現は野生型と比較して低下しており、脂肪細胞の分化にオートファジーが関与することが示唆された。定量 PCR 法により脂肪細胞分化に関わる因子の mRNA 発現レベルを解析したところ、TAG 合成、分解に関わる遺伝子の発現に有意な変化は認められなかったが、オートファジー不能 MEF において、分化に関わる転写因子 C/EBP α , β の発現が高く、また脂肪細胞分化を負に調節する因子である Pref-1 の発現が亢進していることが明らかとなった。これらの発現上昇に関与が予測される複数の細胞内シグナル経路に関して検討を行ったが、まだその同定には至っておらず、解析を継続している。

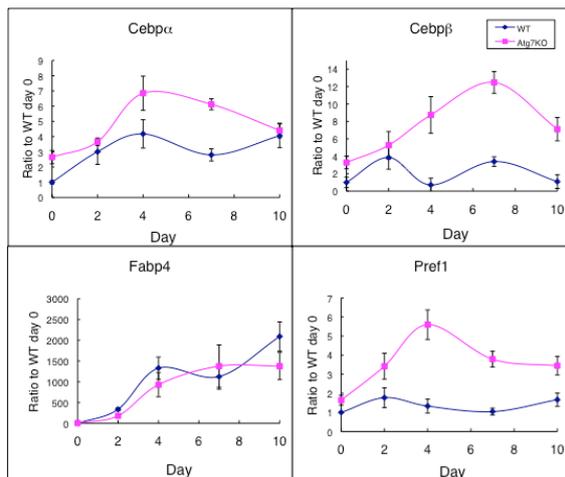


図 3. 脂肪細胞分化過程における C/EBP α , β , Fabp4、Pref1 mRNA の変化

肝特異的オートファジー不能マウスでは、絶食した野生型マウスの肝臓で観察される

脂肪滴の蓄積が見られない。この知見は、前年度に報告した脂肪組織特異的オートファジー不能マウスで観察される白色脂肪組織の小型化およびトリアシルグリセロール (TAG) レベルの低下と密接に関わっていることが予想されるので、誘導性の肝特異的オートファジー不能マウスを用いて詳細な検討を行った。オートファジー不能になった直後および7日後の肝臓を比較したところ、オートファジー不能になった直後の肝臓では、絶食により野生型と同様の脂肪滴の蓄積が観察されたのに対して、7日後の肝臓では有意に減少していた。オートファジー不能化7日後の肝臓は、肥大化や肝障害を発症する時期であり、オートファジーの低下およびそれに続く要因によって、肝における脂肪滴形成、TAG 蓄積のプロセスの抑制または遅延が起こっていると考えられる。その機構の詳細については現在解析中である。

以上のことから、オートファジーは脂肪組織においては、脂肪滴形成というよりは脂肪細胞分化に関わっており、タンパク質分解を通して脂肪細胞分化を転写レベルで調節している可能性が示唆された。また肝臓においては脂質の蓄積機構への関与が示唆された。従って、オートファジーは脂質代謝に関して、脂肪組織と肝臓において異なる役割を果たしている可能性が考えられる。

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 18 件)

学術論文

(1) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration.

Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL Jr, Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 4;104(36):14489-94. 査読有

(2) Crystal structure of Ufc1, the Ufm1-conjugating enzyme. Mizushima T, Tatsumi K, Ozaki Y, Kawakami T, Suzuki A, Ogasahara K, Komatsu M, Kominami E, Tanaka K, Yamane T. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov 3;362(4):1079-84. 査読有

(3) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida

H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Cell. 2007 Dec 14;131(6):1149-63. 査読有

(4) Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. Tanida I, Yamaji T, Ueno T, Ishiura S, Kominami E, Hanada K. Autophagy. 2008 Jan 1;4(1):131-4. 査読有

(5) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y. Am J Pathol. 2008 Feb;172(2):454-69. 査読有

(6) Comprehensive proteomics analysis of autophagy-deficient mouse liver. Matsumoto N, Ezaki J, Komatsu M, Takahashi K, Mineki R, Taka H, Kikkawa M, Fujimura T, Takeda-Ezaki M, Ueno T, Tanaka K, Kominami E. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Apr 11;368(3):643-9. 査読有

(7) Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. Ueno T, Sato W, Horie Y, Komatsu M, Tanida I, Yoshida M, Ohshima S, Mak TW, Watanabe S, Kominami E. Autophagy. 2008 Jul 1;4(5):692-700. 査読有

(8) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. J Biol Chem. 2008 Aug 15;283(33):22847-57. 査読有

(9) Hepatic gap junctions in the hepatocarcinogen-resistant DRH rat. Gotow T, Shiozaki M, Higashi T, Yoshimura K, Shibata M, Kominami E, Uchiyama Y. Histochem Cell Biol. 2008 Sep;130(3):583-94. 査読有

(10) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Cell Metab. 2008 Oct;8(4):325-32. 査読有

(11) Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Autophagy. 2008 Nov 16;4(8):1063-6. 査読有

(12) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice.

Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Mol Biol Cell. 2008 Nov;19(11):4762-75. 査読有

(13) Differentiation-specific expression and localization of an autophagosomal marker protein (LC3) in human epidermal keratinocytes. Haruna K, Suga Y, Muramatsu S, Taneda K, Mizuno Y, Ikeda S, Ueno T, Kominami E, Tanida I, Hanada K. J Dermatol Sci. 2008 Dec;52(3):213-5. 査読有

(14) Characterization of CAA0225, a novel inhibitor specific for cathepsin L, as a probe for autophagic proteolysis. Takahashi K, Ueno T, Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Murata M, Kominami E. Biol Pharm Bull. 2009 Mar;32(3):475-9. 査読有

(15) Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y. Autophagy. 2009 Apr;5(3):351-60. 査読有

(16) The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y. Biochem Biophys Res Commun. 2009 May 1;382(2):419-23. 査読有

総説など

(1) Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Cell Death Differ. 2007 May;14(5):887-94.

(2) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P et al. 計 223 人中 92 番目 Autophagy. 2008 Feb 16;4(2):151-75.

[学会発表] (計 12 件)

(1) Komatsu M. et al. Selective autophagy regulates formation of intracytoplasmic inclusions. Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease April 19, 2007 Monterey, California, USA

(2) Tanida I. et al.

GABARAP-lipidation during differentiation and Visualization of GABARAP in mice. Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease April 19, 2007 Monterey, California, USA

(3) Ezaki J. et al. Autophagosome formation response to nutrient starvation. Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease April 19, 2007 Monterey, California, USA

(4) Komatsu M. et al. Selective autophagy regulates formation of cytoplasmic inclusions. 第30回日本分子生物学年会・第80回日本生化学回大会合同大会 2007年12月13日 横浜

(5) Ezaki J. et al. Autophagosome formation in the starved animal. 第30回日本分子生物学年会・第80回日本生化学回大会合同大会 2007年12月13日 横浜

(6) Sou Y. et al. The Atg8 conjugation system is essential for completion of autophagosomal formation in mice. 第30回日本分子生物学年会・第80回日本生化学回大会合同大会 2007年12月13日 横浜

(7) Komatsu M. et al. Role of p62/SQSTM1 degradation by autophagy in cytoplasmic inclusion formation. Gordon Research Conferemces on Autophagy in stress, Development and disease January 9 Ventura, CA, USA

(8) Ezaki J. et al. Autophagosome formation response to nutrient starvation. Gordon Research Conferemces on Autophagy in stress, Development and disease January 9 Ventura, CA, USA

(9) Ichimura Y. et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. 第60回日本細胞生物学会大会 2008年7月1日 横浜

(10) Tanida I. et al. オートファジーに必須の E1 様酵素、Atg7、の新規機能領域 第81回日本生化学会大会 2008年12月12日 神戸

(11) Sou YS. Et al. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. 第81回日本生化学会大会 2008年12月12日 神戸

(12) Ichimura Y. et al. 選択的オートファジーにおける p62 選別機構の構造基盤 第81回日本生化学会大会 2008年12月12日 神戸

[図書] (計2件)

(1) Method for monitoring pexophagy in mammalian cells. Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Kominami E. Methods Enzymol. 2009;452:215-26.

(2) LC3 and Autophagy. Tanida I, Ueno T, Kominami E. Methods Mol Biol. 2008;445:77-88.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木南 英紀 (KOMINAMI EIKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 10035496

(2) 研究分担者

古屋 徳彦 (NORHIKO FURUYA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 50401188

江崎 淳二 (EZAKI JUNJI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 60232948