

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670139

研究課題名(和文)オートファジー可視化技術の開発とこれを応用したオートファジーの生物学的役割の解明

研究課題名(英文)Development of autophagy visualization tools and analyses of physiological roles of autophagy

研究代表者

清水 重臣(Shimizu, Shigeomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70271020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、自己構成成分を分解するマシナリーであり、Atg5依存性のオートファジーと非依存性のオートファジーが存在している。本研究ではこれらのオートファジーを可視化する技術を開発し、それを利用してオートファジーの生理的役割の解明を行った。

その結果、両方のオートファジーを可視化できるマウスを2系統作製することに成功した。また、Atg5非依存性のオートファジーを免疫組織染色にて同定できる方法の開発、オートファジーの全体量を評価できる蛍光化合物の開発を行った。さらに、これらのツールを用いて、心臓の発生時、赤血球の分化時に新規オートファジーが強く活性化される事を見出した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a process that leads to the bulk degradation of subcellular constituents through the creation of autophagosomes/ autolysosomes. There are two types of autophagy; Atg5-dependent type and independent type. Here we developed autophagy visualizing tools and analyzed physiological roles of autophagy. We first developed two lines of transgenic mice in which autophagy can be visualized. We also developed antibody that can detect Atg5-independent type of autophagy, and fluorescence compound that can measure total autophagy. Furthermore, using these tools, we found that alternative autophagy is involved in the cardiac development and red blood cell differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー Atg5非依存性 細胞分化 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、リソソームを利用し、自己構成成分を大規模に分解するマシナリーである。このマシナリーは、新陳代謝や細胞浄化などに貢献しており、細胞の営みの基盤となっている。一方、その破綻は神経変性疾患や炎症性腸疾患などの温床となることが報告されており、オートファジーは生物学のみならず、医学的にも重要である。

オートファジー研究は、これまで培養細胞を用いた分子機構解析やノックアウトマウスマウスの表現型解析を中心に研究が為され、その重要性は充分確認されている。しかしながら、現時点では、生体においてオートファジーを可視化する技術は充分でなく、個体の中での生物学的な役割を明確に把握するには至っていない。

哺乳動物のオートファジー機構において、Atg5 や Atg7 は必要不可欠な分子であり、LC3 分子のドット様局在化はオートファジーのマーカーとして、信じられてきた。しかしながら、私たちは Atg5/Atg7 に依存せず LC3 の局在化を伴わない新しいメカニズムによるオートファジーの存在を発見した。即ち、オートファジーを理解する為には、2 経路のオートファジーを包括的に解析する必要がある。

2. 研究の目的

このような研究の現状を踏まえて、本研究では、Atg5 依存的オートファジーと非依存的オートファジーの両者を、生体レベルで可視化する技術を開発する。具体的には、これらのオートファジーを可視化できるトランスジェニック・モニターマウスの作製と、これらのオートファジーを可視化できるプローブの開発を目標とした。

さらに、これらの可視化技術を用いて、マウスの生体レベルで、それぞれのオートファジーが①生体のどの場所で、どのような状況で活性化されているか、②如何なる生命現象に関与しているか、③如何なる疾患と関連し

ているか、を明らかにすることを第2の目標とした。

3. 研究の方法

(1)オートファジーを可視化できるマウスの作出

Atg5 非依存的オートファジーをモニターするために、オートリソソームを可視化できるトランスジェニックマウスを作製した。また、LC3 トランスジェニックマウスと交配する事により、両者のオートファジーを観察する事に成功した。さらに、オートファジー全体をモニターできるマウスを開発した。

(2)オートファジー可視化技術の開発

①Atg5 非依存的オートファジーに関わる分子を認識できる抗体を開発し、免疫組織染色法にて、Atg5 非依存的オートファジーを同定する方法の開発を行なった。

②ケミカルバイオロジーを応用して、生体に応用できるオートファジー可視化プローブの開発を行なった。

(3)生体におけるオートファジー実行部位の同定

上述の方法などを用いて、生体のどの場所で、どちらのオートファジーが活性化されているか、如何なる生命現象に関与しているか、を解析した。

4. 研究成果

(1)オートファジーを可視化できるマウスの作出

上述した Atg5 非依存的オートファジーと Atg5 依存的オートファジーを同時に可視化できるマウスを作製し、両方のオートファジーが機能している部位を解析した(後述)。

さらに、オートファジーの総量を測定できる蛍光蛋白質複合体のプラスミドを作製した。このプラスミドを発現させた細胞を用いると、Atg5 非依存的オートファジーと Atg5 依存的オートファジーの全体量を測定することができた。そこで、このプラスミド

を発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

(2)オートファジー可視化技術の開発

①Atg5 非依存的オートファジーの実行分子 Aag2 を特異的に認識できる抗体を開発し Atg5 非依存的オートファジーの有無を細胞レベルで検討したところ、この抗体を用いることによって、Atg5 非依存的オートファジーの局在を評価できることが判明した。

②また、オートファジーの全体量を評価できる蛍光化合物を開発した。即ち、両方のオートファジーの実行に関わる Aag6 分子に結合する低分子化合物をまず同定した。次に、この化合物に蛍光プローブを付与した新規化合物を開発した。細胞に投与したところ、この蛍光化合物は、両方のオートファジーのオートファゴソームを同定することができた (右図)。

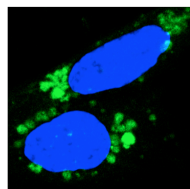


図: オートファジー可視化プローブによって検出したオートファジー

(3)生体におけるオートファジー実行部位の同定

オートファジー可視化マウスから採取した細胞に DNA 切断ストレスを加えたところ、1つの細胞内で両方のオートファジーが活性化されることを見出した。この現象は、線維芽細胞、リンパ球、血球など様々な細胞で観察された。

また、Atg5 依存的オートファジーは、細胞老化の時に活性化されており、細胞老化に伴うサイトカイン産生を制御していることを見いだした。一方、Atg5 非依存的オートファ

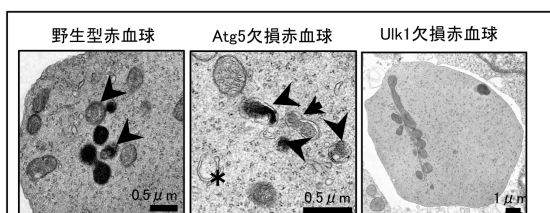


図 赤血球からのミトコンドリア除去は新規オートファジーが行なう
A: 野生型、Atg5欠損、Ulk1欠損胎仔の赤血球を電子顕微鏡にて観察した。野生型やAtg5欠損赤血球では、隔離膜(アスタリスク)、ミトコンドリアの入ったオートリソソーム(矢じり)、オートファゴソーム(矢印)が観察され、ミトコンドリアがオートファジーで分解されている像が取得できた。一方、Ulk1欠損赤血球では、ミトコンドリアの分解は見られなかった。

ジーは、細胞死が誘導される時に、強く誘導されることが明らかとなった。

個体レベルの解析においては、心臓の発生時、赤血球の分化時に新規オートファジーが特に強く活性化される事を見出した。

さらに、新規オートファジー欠損マウスにおける赤血球分化を観察したところ、赤血球の最終分化が正常に行われておらず(上図)、血球分化における新規オートファジーの必要性が確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ①Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. S. Honda, S. Arakawa, Y. Nishida, H. Yamaguchi, E. Ishii, S. Shimizu. **Nature Commun.** 5 Article number:4004, 2014. doi: 10.1038/ncomms5004.
- ②Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL10 KO mice. T. Mizushima, S. Arakawa, Y. Sanada, I. Yoshino, D. Miyazaki, H. Urushima, Y. Tsujimoto, T. Ito, S. Shimizu. **Am J Pathol.** 183:1936-44, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.012.

[学会発表] (計 34 件)

- 1, Shimizu S : Physiological Role of Atg5-independent macroautophagy. The 16th Northeastern Asian Symposium. (2014/12/19-20, Busan, Korea)
- 2, Shimizu S : Molecular Mechanisms of Alternative Macroautophagy. Gordon research Conference (2014/3/17-21; Barga, Italy)
- 3, Shimizu S : Biological Roles of Autophagic Cell Death. CSH Asia conference on Mechanisms and Functions of Non-apoptotic Cell Death (2013/4/18; Suzhou, China)

[図書] (計 2 件)

- 1, Innovative Medicine : Basic Research and Development. (Edit K. Nakao) "Autophagic Cell Death and Cancer Chemotherapeutics." S. Shimizu. **Springer in press**
- 2, AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection. Vol. 2 (Edit MA Hayat) "Mammalian autophagy can

occur through an Atg5/Atg7-independent pathway.” S. Shimizu, S. Arakawa, Y. Nishida, H. Yamaguchi, T. Yoshida. **Academic Press**, 49-59 (2013)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：ベンゾチオフェン化合物、該化合物を有効成分とするオルタナティブオートファジー誘導剤及び抗癌剤、並びに抗癌活性を有する化合物をスクリーニングするための方法

発明者： Shigeomi SHIMIZU, Takamitsu HOSOYA, Michiko MUROHASHI, Suguru YOSHIDA

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：PCT 出願

番号：PCT/JP2013/052947

出願年月日：2013/02/07

取得年月日：2014/12/17(EU), 2015/2/26(US)

国内外の別：国外

〔その他〕

(1) ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/index.html>

http://www.tmd.ac.jp/mri/pcb/eng/index_e.html

(2) 主催学会

1、第23回日本 Cell Death 学会 2014年7月18, 19日

(3) 報道関連

1、Newton 2014年9月号「細胞の不要成分を除去する新たなしくみ」掲載

2、NatureAsia 特集 2014年8月「赤血球からミトコンドリアが除かれるしくみを解明！」

3、日経産業新聞 2014年6月18日「ハンチントン病症状改善に道」

4、日経産業新聞 2014年6月13日「赤血球しくみに光」

(4) オープンキャンパス／サイエンスカフェ、高大連携(2014: 12/15, 8/4, 6/3, 3/24 ; 2013: 11/1, 10/11, 8/1, 6/6)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 重臣 (Shimizu, Shigeomi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70271020