

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293060

研究課題名(和文) 飢餓時のタンパク質合成に及ぼす細胞内分解系オートファジーの役割

研究課題名(英文) The role for the intracellular degradation system autophagy in protein synthesis during starvation

研究代表者

水島 昇 (Mizushima, Noboru)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10353434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：飢餓時に誘導されるオートファジーによりタンパク質の異化が亢進するが、その意義は不明である。本研究ではオートファジーで生じるアミノ酸がタンパク合成に使われる可能性を検討した。まずオートファジー不全肝で飢餓時の翻訳が低下することが判明した。しかし、飢餓及びオートファジー不全時の肝プロテオーム解析からは、飢餓よりも、オートファジー不全そのものの方がプロテオームを大きく変動させていた。さらに、飢餓時の組織内アミノ酸濃度に有意な差が見られなかった為、翻訳抑制はアミノ酸不足よりも組織恒常性の破綻による可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a major intracellular degradation system that is strongly induced upon nutrient starvation, but its physiological importance is not well understood. In this study, we tested the possibility that autophagy provides amino acids to produce proteins required for starvation adaptation in vivo. We found that protein synthesis is indeed impaired in autophagy-deficient livers during starvation. Proteomic analysis of livers from wild-type and autophagy-defective liver under normal and starvation conditions revealed that autophagy deficiency caused more drastic changes in proteome profiles than starvation. Furthermore, the intracellular amino acids levels were not significantly changed in autophagy-deficient livers even under starvation condition. These data suggest that translation attenuation in autophagy-deficient livers is caused not due to a lack of amino acids provided by autophagy but to a defect in liver homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 細胞内分解 タンパク質合成

1. 研究開始当初の背景

標準的ヒトの1日あたりのタンパク質のターンオーバー（合成と分解）量は180~200g程度と見積もられており、これは食事由来タンパク質（約70g）よりはるかに多い。飢餓時にはタンパク質分解（異化）はさらに亢進することが知られている。これは、①飢餓時においてもなお必要なタンパク質を合成するための材料、②肝での糖新生の材料、③エネルギー産生の材料としてこれまで考えられてきている。しかし、生体内でのタンパク質代謝の実像は理解されていない。古典的には、アイソトープ標識アミノ酸を用いたタンパク質合成率の測定や、臓器を取り出して行う器官灌流実験などがなされているが、これらの方法はそれぞれ組織細胞内のアミノ酸濃度によって標識効率（比活性）が異なる、あるいは生体内での生理的状況を反映していないなどの問題がある。また、飢餓時に活性化されるのは主としてオートファジーであるが、遺伝子欠損マウスを用いての代謝学的解析はほとんどなされていない。

研究代表者らのマウスを用いたこれまで検討から、飢餓時にオートファジーによって盛んに分解される肝臓に由来するアミノ酸は、糖新生やエネルギー産生にはあまり貢献していないことが判明している。一方で、予備的データからは、飢餓時に肝臓のオートファジーによって産生されるアミノ酸は、主として肝臓におけるタンパク質合成のために利用されていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、まずオートファジーがタンパク質合成に与える影響を解析し、それがアミノ酸産生（タンパク質リサイクル）によるものかどうか、あるいは他の機序によるものかどうかを判定する。さらに、正常マウスと野生型マウスのプロテオームおよびトランスクリプトームを比較することによって、オートファジーの生理学的意義をプロテオームのレベルから理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 組織特異的 *Atg5* 欠損マウス

オートファジー関連遺伝子 *Atg5* の3番目のエクソンを loxP 配列によって挟み (*Atg5^{lox/lox}*)、Cre リコンビナーゼによる組み換え反応を利用して遺伝子を欠損させた。Cre リコンビナーゼは、poly(I:C)を投与した際に肝臓特異的に誘導される遺伝子 *Mx1* のプロモーターの下流で発現するようにデザインされている (*Mx1-Cre*)。8週齢の *Atg5^{lox/lox};Mx1-Cre* マウスに poly(I:C)を1日おきに3回投与し、1週間経過した個体を実験に用いた。 *Mx1-Cre* を持たない

Atg5^{lox/lox} マウスを対照として用いた。

脳特異的 *Atg5* 欠損マウスの作成には、神経前駆細胞特異的に発現する遺伝子 *nestin* のプロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウス *Atg5^{lox/lox};nestin-Cre* を用いた。

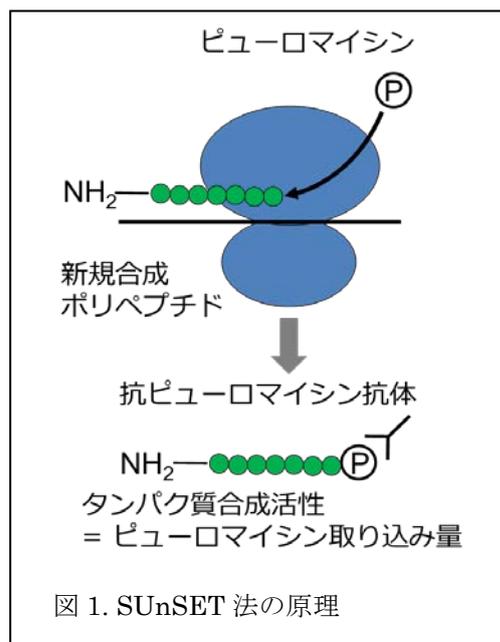
(2) 栄養条件

飢餓は24時間絶食とし、自由摂食時との比較を行った。

(3) タンパク質合成活性の評価法

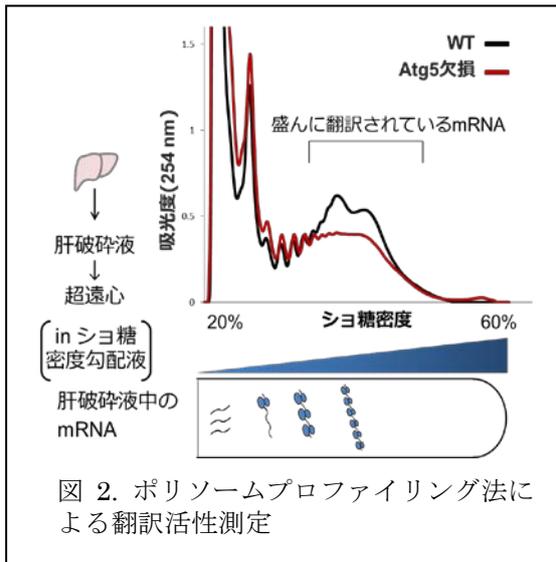
① SUnSET (Surface sensing of translation) 法

新規合成されたタンパク質量を測定する手法である。アミノアシル tRNA と構造が類似しているピューロマイシンは新規合成ポリペプチド鎖に取り込まれる。するとリボソームから新規合成ポリペプチド鎖が解離するのでそれを抗ピューロマイシン抗体で検出する (Schmidt ら *Nat. Methods* 2009, 6:275, 図1)。マウスにピューロマイシンを投与し、15分後に肝臓をサンプリングしてウェスタンブロッティング法にてピューロマイシン取り込み量を評価する。



② ポリソームプロファイリング法

mRNA あたりのリボソームの結合量を検出する方法である。肝臓破砕液をショ糖密度勾配液中で超遠心すると結合しているリボソームの数に応じて mRNA が分離される。多くのリボソームが結合しているほどショ糖密度の濃い画分へと mRNA が分離される。分離された mRNA の吸光度を測定し、ポリリボソーム (ポリソーム) のピークのパターンを検出する (図2)。

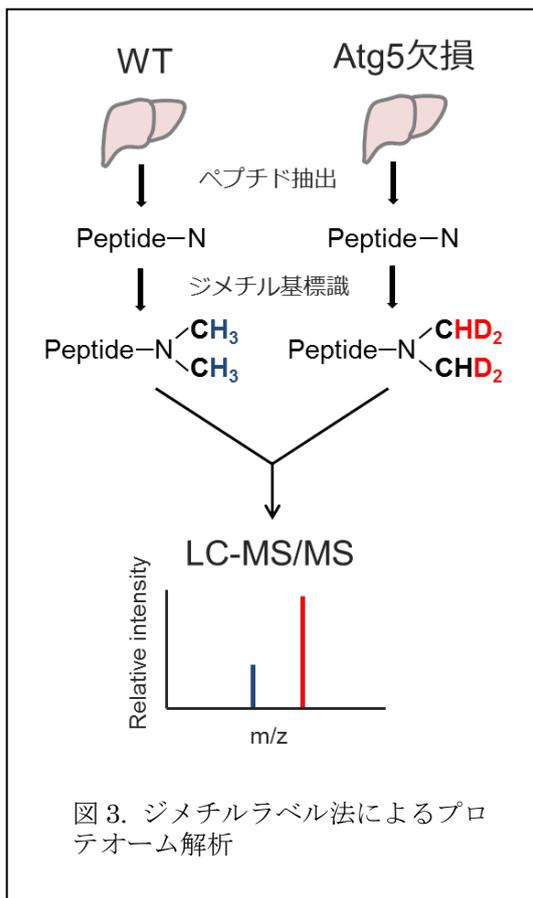


(4) 肝臓アミノ酸濃度測定

キャピラリー電気泳動装置に接続した質量分析計を用いて、採取した肝臓サンプル中のアミノ酸濃度を測定した

(5) ジメチルラベル法を用いたプロテオーム解析

組織中のタンパク質の網羅的な相対定量を行う手法である。肝臓および脳のタンパク質抽出液をトリプシン等のタンパク質分解酵素で処理しペプチド断片を得る。得られたペプチドの N 末端およびリジン残基に対して、安定同位体ラベルされたジメチル基を付



与する。これにより、各サンプル由来のペプチド混合物は、有機化学的には同じ性質を有するが質量の異なるラベルにより区別される。安定同位体によって区別されたサンプルを混合し、液体クロマトグラフィー-接続型の質量分析計を用いてサンプル中に含まれるペプチドの網羅的な同定と定量を行う (図 3)。

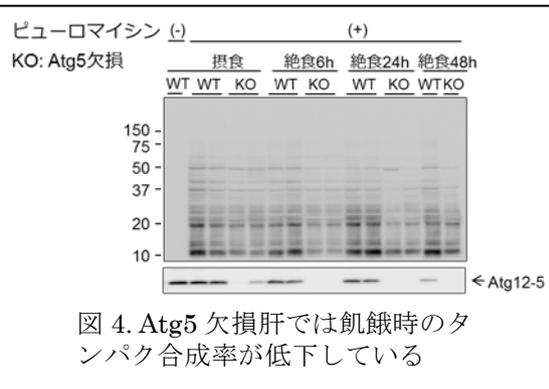
(6) マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

肝臓中の遺伝子発現を網羅的に解析した。肝臓由来の総 RNA を抽出し Agilent 社製 SurePrint G3 Mouse 遺伝子発現マイクロアレイ 8x60K を用いた。

4. 研究成果

マウス個体を用いてオートファジーによって生じたアミノ酸が翻訳へ及ぼす影響を解析するため、栄養飢餓時のタンパク質合成を測定した。

肝特異的 *Atg5* 欠損マウスを用いて、まず SUnSET 法にてタンパク質合成率を評価した。その結果、自由摂食時は *Atg5* 欠損肝と野生型とでピュロマイシンの取り込み量に差はみられなかったが、24 時間飢餓時の *Atg5* 欠損肝では野生型に比べて著しくピュロマイシン取り込みが低下していた (図 4)。さらにポリソームプロファイリング法によっても、飢餓時の *Atg5* 欠損肝での翻訳活性を検討したところ、飢餓時の *Atg5* 欠損肝においては野生型と比べてリボソームが多く結合している mRNA (リボソーム数 > 6) の存在量が再現よく顕著に低下していた (図 2)。これらの結果から、肝臓において、オートファジーは飢餓時の翻訳に非常に重要であることが示唆された。



そこで肝と脳において、オートファジー不全条件下で増減するタンパク質を、ジメチルラベル法を用いた質量分析法を用いて網羅的な相対定量解析を行った。肝臓においてはマイクロアレイ解析と組み合わせて mRNA 量との関係も調べた。

自由摂食条件と栄養飢餓条件でそれぞれ 5 匹のマウスについてプロテオーム解析をしたところ、サンプル間クラスタリングできわめてよい再現性が得られた (図 5)。

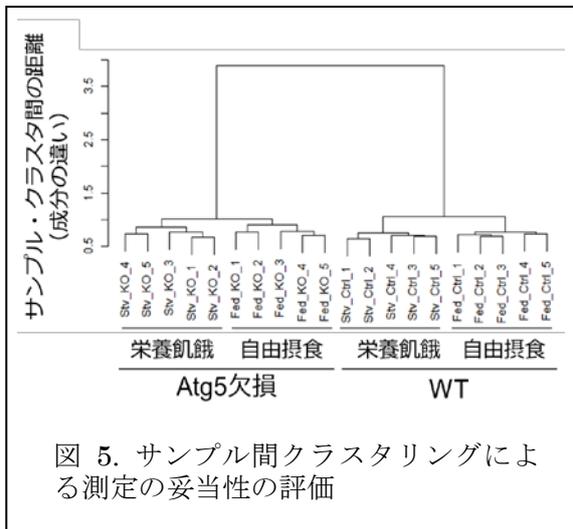


図 5. サンプル間クラスタリングによる測定の妥当性の評価

驚くべきことに、栄養飢餓によって有意に発現変動するタンパク質はごく僅かであった。このことから、タンパク質プロファイルをほとんど変化させることなく栄養飢餓条件に肝臓が適応していることが示唆された。さらに栄養条件による差よりも *Atg5* 遺伝子の有無の方がプロテオームに与える影響が大きいということがクラスタの分離の程度から判明した。*Atg5* 欠損によって減少するタンパク質には脂質代謝系などが、増加するタンパク質には、既知の選択的基質や Nrf2 ターゲット因子に加えて、インターフェロン誘導性遺伝子が多く含まれていた。これらは全体的に mRNA レベルとよく相関していた (図 6)。

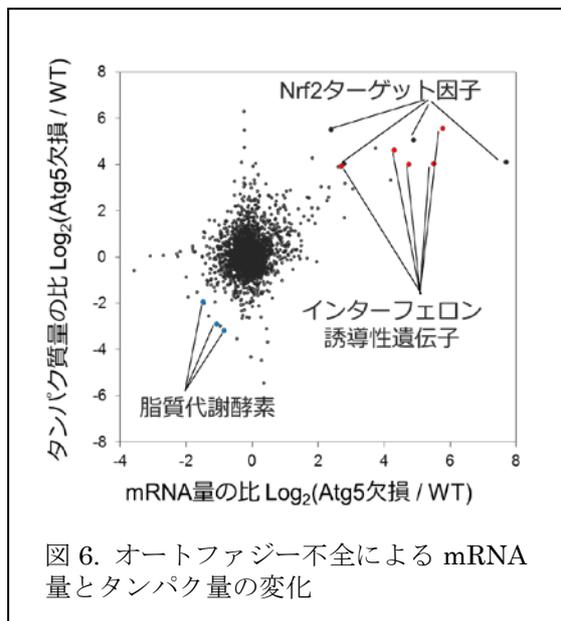


図 6. オートファジー不全による mRNA 量とタンパク量の変化

一方で飢餓時の組織内アミノ酸濃度には有意な差が見られなかった。従って、オートファジー不全によるタンパク質合成抑制は、材料としてのアミノ酸不足というより、オートファジー不全による代謝プログラムの変動による可能性が示唆された。

同様の解析を大脳と小脳で行ったところ、異なるセットのタンパク質の蓄積が *Atg5* 欠損脳で観察された。大脳と小脳で共通して蓄積する因子は 33 同定されており、その多く

は転写レベルとは相関が無かった。これらには新規基質の候補が含まれていると考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. 久万亜紀子、水島昇 オートファジーと栄養遺伝子制御 **実験医学**、査読無、(特集「栄養シグナル」) 34, 2538-2544 (2016).
2. Lin, H.H., Lin, S.M., Chung, Y., Vonderfecht, S., Camden, J.M., Flodby, P., Borok, Z., Limesand, K.H., Mizushima, N., Ann, D.K. Dynamic involvement of ATG5 in cellular stress responses. *Cell Death Dis.* 5:e1478 (2014). DOI: 10.1038/cddis.2014.428
3. Yamamoto, A., Mizushima, N., Tsukamoto, S. Fertilization-induced autophagy in mouse embryos is independent of mTORC1. *Biol. Reprod.* 査読有、91:7, 1-7 (2014). DOI: 10.1095/biolreprod.113.115816
4. Jiang, P., Mizushima, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells *Methods* 査読有、S1046-2023(14)00384-3 (2014). DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.11.021
5. Shen, H.M., Mizushima, N. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 査読有、39:61-71 (2014). DOI: 10.1016/j.tibs.2013.12.001
6. 栗川義峻、水島昇 mTOR 複合体・AMPK とオートファジー **The Lipid** 査読無、26, 40-47 (2015).
7. 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**、査読無、65(4) Jul-Aug:339-343 (2014).

[学会発表] (計 23 件)

1. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」臨床アミノ酸研究会第 3 回公開シンポジウム、2016. 12. 17、味の素グループ高輪研修センター (東京都、港区)
2. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 35 回日本糖質学会年会、2016. 9. 1、高知市文化プラザかるぼーと (高知県、高知市)
3. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解の意義」第 48 回日本動脈硬化学会、2016. 7. 14、京王プラザホテル (東京都、新宿区)
4. 守田啓悟、西村多喜、水島昇「可逆的オ

- オートファジー制御システムを利用した細胞内凝集体形成・消失の可視化」第 68 回日本細胞生物学会大会、2016. 6. 15-17、京都メルサ（京都府、京都市）
5. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 57 回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、2016. 5. 29、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）
 6. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」Tohoku Diabetes Research Conference for Young Investigators 2015、2016. 2. 27、仙台サンプラザ（宮城県、仙台市）
 7. 水島昇「オートファジーによる細胞内品質管理制御」第 51 回インスリン研究会、2016. 2. 6、経団連会館（東京都、千代田区）
 8. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 3 回東京肥満内分泌研究会、2015. 7. 31、ザ・キャピトルホテル東急（東京都、千代田区）
 9. 水島昇「オートファジーの分子機構と生理学的意義」第 29 回千葉基礎・臨床免疫セミナー、2015. 3. 10、千葉大学（千葉県、千葉市）
 10. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 39 回日本皮膚科免疫セミナー、2015. 3. 7、京王プラザホテル（東京都、新宿区）
 11. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 28 回日本軟骨代謝学会、2015. 3. 6、東京医科歯科大学（東京都、文京区）
 12. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2015. 2. 21、京王プラザホテル（東京都、新宿区）
 13. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解の生理意義と分子機構」Scientific Exchange Meeting in Tsukuba、2015. 1. 20、筑波大学（茨城県、つくば市）
 14. 水島昇「オートファジーの生理的意義と分子機構」六甲カンファレンス、2014. 11. 7、六甲ホテル（兵庫県、神戸市）
 15. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解の生理意義とその分子機構」日本女性医学学会第 29 回学術集会、2014. 11. 1、都市センターホテル（東京都、千代田区）
 16. 水島昇「オートファジーの生理意義とその分子機構」第 3 回 Osaka Lung Cancer Cutting Edge、2014. 10. 30、リーガロイヤルホテル（大阪府、大阪市）
 17. 久万亜紀子、吉井紗織、栗川義峻、内藤貴子、曾我朋義、水島昇「哺乳動物におけるオートファジーの生理機能」第 87 回日本生化学会大会、2014. 10. 15-18、国立京都国際会館（京都府、京都市）
 18. 水島昇「オートファジーによる細胞内分解」FAT DM (Future of Atherosclerosis, Hypertension and Diabete Mellitus)、2014. 10. 2、ホテル椿山荘（東京都、文京区）
 19. 水島昇「オートファジーの生理的意義と分子機構」第 21 回肝細胞研究会、2014. 6. 28、東京医科歯科大学（東京都、文京区）
 20. 小山-本田郁子、平野貴規、水島昇「哺乳類細胞オートファゴソーム形成過程における ATG タンパク質群の分布および小胞体との時空間関係」第 14 回日本蛋白質科学会、2014. 6. 25、ワークピア横浜（神奈川県、横浜市）
 21. 水島昇「オートファジーの生理的意義と分子機構」第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会、2014. 6. 6、愛媛大学（愛媛県、松山市）
 22. 水島昇「オートファジーの生理的意義と分子機構」第 50 回日本肝臓学会、2014. 5. 30、ホテルニューオータニ（東京都、千代田区）
 23. Noboru Mizushima「Novel Insights into Autophagy Function」Kyestone Symposium "Autophagy: Fundamentals to Disease"、2014. 5. 23-28、Austin (USA)
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://square.umin.ac.jp/molbiol/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
水島 昇 (MIZUSHIMA, Noboru)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10353434