

機関番号：12602

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076005

研究課題名（和文） オートファジーのダイナミクスと生理的意義の解析

研究課題名（英文） Dynamics of autophagy and its physiological roles

研究代表者

水島 昇 (MIZUSHIMA NOBORU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10353434

研究成果の概要（和文）：

マウスを用いた研究によって、オートファジーは初期胚発生に必須であること、肝細胞の腫瘍化を抑制していることなどを明らかにした。また、オートファジーの上流因子と mTOR との関連から、オートファジーの誘導メカニズムのモデルを提唱した。さらに、オートファジーの特異的基質である p62 の選択的分解が、転写を介した肝障害誘導を負に制御することを示した。オートファジーの役割と制御機構に新しい知見を加えた。

研究成果の概要（英文）：

Our mouse genetic studies revealed that autophagy is required for early embryogenesis and suppression of spontaneous tumorigenesis in the liver. We also proposed a mechanism of autophagy induction, based on our analyses on the relationship between autophagy factors and mTOR. Finally, we showed that selective degradation of p62 is important for protection of liver damage caused by an aberrant transcriptional regulation. These findings provided new insights into the physiological roles and regulation mechanism of autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	28,200,000	0	28,200,000
2007年度	36,600,000	0	36,600,000
2008年度	50,700,000	0	50,700,000
2009年度	74,500,000	0	74,500,000
2010年度	47,900,000	0	47,900,000
総計	237,900,000	0	237,900,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファジー、ユビキチン、タンパク質分解、タンパク質品質管理、タンパク質凝集、発生、

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。私たちはこれまでに、オートファジーは絶食時の成体マウスや新生児マウスでダイナミック誘導されることを示し、これが実際に生体内のアミノ酸プールの維持やエネルギー恒常性に重要であることを示した。一方で日常

的な細胞内代謝回転を目的とした基底レベルのオートファジーも重要である。すなわち、オートファジーはその活性を動的に制御することによって、栄養制御（誘導的オートファジー）と細胞内浄化（定常的オートファジー）を担う生体システムと位置づけることができる。

2. 研究の目的

本計画研究では誘導的オートファジーと定常的オートファジーという異なる二つの視点からオートファジーを捉え、その代謝生理学的意義および病態生理学的重要性を明らかにする。また、そのような生物学的役割を担うための基盤となるオートファジーの活性制御機構を解明する。さらに従来主に非選択的であると考えられてきたオートファジーにも一部基質特異性があることがわかってきており、そのような選択的オートファジーの生理的意義についても明らかにする。

3. 研究の方法

オートファジーの生物学的意義の研究については、主にマウスを用いた遺伝学的研究によって推進する。オートファジーの制御機構の解析は、これまで本グループが解析してきたオートファジー因子を機軸として、それらの分子生物学的、生化学的、細胞生物学解析を主に展開する。

4. 研究成果

(1)

受精後にオートファジーが誘導されることを発見した。そこで、卵特異的ノックアウトマウスを作製したところ、このマウスは4-8細胞期に致死となった。この時、胚内のタンパク質合成率が低下していた。これらの解析から、受精直後のオートファジーは母性タンパク質を分解することによって初期胚発生に必須なアミノ酸を調達している可能性が示唆された。

(2)

オートファジー不能細胞を生体内で長期間観察することを目的とし、Atg5 全身モザイク欠損マウスを作製した。このマウスは、19ヶ月以上生存し、肝のみで多発性腫瘍が発生した。このマウスの肝細胞では、腫脹した不良ミトコンドリアが集積し、過剰な酸化ストレス応答やゲノム傷害応答が観察された。従って、オートファジーによるミトコンドリアの品質管理が、腫瘍の自然発生を抑制する上で重要であることが示唆された。この研究は、オートファジーが抗腫瘍効果をもっていることを初めて個体レベルで示したものである。

(3)

オートファジー機能を欠損した肝細胞や神経細胞ではユビキチンやp62分子を含んだ凝集体が蓄積する。p62はLC3と結合することによってオートファジーによって選択的に分解されること、過剰なp62は封入体に蓄積することが明らかになった。p62の蓄積は転写因子Nrf2の過剰な活性化を引き起こすことが見いだされた。さらにAtg7とp62のダブルノックアウトマウスでは封入体形成がほぼ完全に抑制された。それに伴い、肝障害

は改善したが神経障害には改善がなかった。従って、オートファジーによるp62の発現レベル調節は特に肝では非常に重要であると結論された。

(4)

LC3の脂質化に必須なE2酵素であるAtg3のノックアウトマウスの解析を行い、オートファゴソーム様膜形成が起こるが完全に閉じられた小胞には至らないことを見出した。

(5)

オートファジーの制御機構を明らかにするため、酵母Atg1のホモログであるULK1の新規結合因子としてFIP200とAtg13を同定した。ULK1-Atg13-FIP200複合体は隔離膜に局在し、各因子がオートファゴソーム形成に必須であることを示した。さらに栄養依存的にmTORC1複合体がULK1-Atg13-FIP200複合体と会合することによって、これらの活性を制御していることが示唆された。

(6)

ULK1複合体の下流で機能するクラスIII PI3キナーゼ複合体に含まれるオートファジー特異的因子として哺乳類Atg14を世界に先駆けて同定し、それが実際にオートファジーに必須であることを示した。さらにオートファジーに必要なAtg因子の網羅的階層構造を明らかにした。

(7)

パーキンソン病の原因遺伝子として知られているユビキチンリガーゼであるParkinは、従来知られているミトコンドリアのオートファジーとともに、プロテアソーム依存的なミトコンドリア外膜の部分的分解を行うことによってもミトコンドリアの品質を管理していることを示唆した。

(8)

肝特異的Atg7ノックアウトマウスを用いることによって、オートファジーで生成するアミノ酸が血糖維持に使われることをみいだした。

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 111 件)

1. Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N., Mizushima, N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* in press
2. Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., Mizushima, N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25: 795-800

- (2011).
3. Itakura, E., Mizushima, N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* 192: 17-27 (2011).
 4. Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T., Mizushima, N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.* 285: 20109-20116 (2010).
 5. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140: 313-326 (2010)
 6. Mizushima, N., Levine, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12:823-830 (2010)
 7. Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 12: 213-23 (2010).
 8. Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N., Mizushima, N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20: 1981-1991 (2009)
 9. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., Mizushima, N. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* 19: 5360-5372 (2008)
 10. Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., Mizushima, N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321: 117-120 (2008)
 11. Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., Mizushima, N. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181: 497-510 (2008)
 12. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion *Nature* 451:1069-1075 (2008)
 13. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N.,

Iwata, J.I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S.I., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* 131:1149-1163 (2007).

[学会発表] (計 68 件)

1. Noboru Mizushima. Lessons from Autophagy Deficient Mouse Models. Keystone symposium "Autophagy". Whistler, Canada. 2010.3.12-17
2. Noboru Mizushima. Physiological roles of autophagy: Hierarchical Relationships among Mammalian Atg Proteins. The American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting. Philadelphia, USA. 2010.12.11-15
3. Noboru Mizushima. Physiological role of autophagy and its regulation mechanism. OzBio2010/12th IUBMB2010. Melbourne, Australia. 2010.9.26-10.1
4. Noboru Mizushima. Lessons from Autophagy Deficient Mouse Models. Keystone symposium "Cell Death Pathways/Metabolism and Cancer Progression". Vancouver, Canada. 2010.3.12-17
5. Noboru Mizushima. Physiological roles of autophagy in mammals. EMBO Workshop Proteolysis and Neurodegeneration / 5th INPROTEOLYS meeting. Madrid. 2010.5.4-7
6. Noboru Mizushima. Molecular mechanism of autophagy induction and autophagosome formation in mammalian cells. The EMBO Conference on Autophagy: Cell Biology, Physiology and Pathology. Monte Verita, Switzerland. 2009.10.19
7. Noboru Mizushima. Molecular mechanism of autophagy regulation in mammalian cells. Gordon conference "Stress Proteins In Growth, Development & Disease". Andover, USA. 2009.6.28-7.3
8. Noboru Mizushima. The Role of Autophagy in Early Embryogenesis. 18th Annual Workshop, Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease "Autophagy in Immunity". Boston. 2008.11.14-15
9. Noboru Mizushima. Role of autophagy in protein metabolism and generation of an autophagy-regulatable cell line. 32nd FEBS

Congress, Molecular Machines. Vienna. 2007.7.7-12

10. Noboru Mizushima. Physiological Role of Autophagy in Protein Turnover. Keystone symposium "Autophagy in Health and Disease". Monterey. 2007.4.15-20

〔図書〕(計2件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: トランスジェニック非ヒト動物
発明者: 谷田 以誠、多田 昇弘、木南 英紀
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許権
番号: 【出願番号】 2006-284568
(出願年月日: 平成18年10月19日)
【公開番号】 2008-99600 (公開日: 平成20年5月1日)
国内外の別: 国内

名称: トランスジェニック非ヒト動物
発明者: 谷田 以誠、多田 昇弘、木南 英紀
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許権
番号: 【出願番号】 2006-284583
(出願年月日: 平成18年10月19日)
【公開番号】 2008-99601 (公開日: 平成20年5月1日)
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

領域HP

<http://proteolysis.jp/>

研究代表者HP

<http://www.tmd.ac.jp/med/phy2/phy2-J.html>

新聞等報道

科学新聞(2011年4月29日)「オートファジーによる腫瘍抑制効果 マウスで解明」(水島)

化学工業日報(2011年4月18日)「オートファジーが腫瘍抑制—哺乳類で初めて証明」(水島)

毎日新聞(2008年7月4日)「受精卵、自分を栄養に」(水島)

読売新聞(2008年7月4日)「受精卵 栄養を自給自足」(水島)

日本経済新聞(2008年7月4日)「受精卵の着床 必要条件確認」(水島)

朝日新聞(2008年7月5日)「受精卵、自ら栄養作り着床」(水島)

日経産業新聞(2008年7月4日)「受精卵着床 たんぱく質分解し利用」(水島)

科学新聞(2008年7月18日)「哺乳類の胚発生時 オートファジーの役割」(水島)

日刊工業新聞(2007年12月14日)「封入体形成を解明」(小松)

日経産業新聞(2007年12月14日)「神経疾患起こすたんぱく質特定」(小松)

化学工業新聞(2007年12月14日)「神経変性疾患主因の細胞内異常構造体形成機構を解明」(小松)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島 昇 (MIZUSHIMA NOBORU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10353434

(2) 研究分担者

谷田 以誠 (TANIDA ISEI)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号: 30296868

小松 雅明 (KOMATSU MASAOKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90356254

上野 隆 (UENO TAKASHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10053373

(3) 連携研究者