

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2013～2017

課題番号：25111005

研究課題名（和文）オートファジーの生理・病態生理学的意義とその分子基盤

研究課題名（英文）Physiological and pathophysiological roles for autophagy and its molecular basis

研究代表者

水島 昇（Mizushima, Noboru）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：10353434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 239,500,000 円

研究成果の概要（和文）：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分解系であり、広範な生命現象に関与していることが明らかにされてきた。本課題では、オートファゴソーム形成、オートファゴソームとリソソームの融合、それに引き続くオートファゴソーム膜の分解の分子基盤を明らかにし、さらにマウスにおけるオートファジーの生理機能の解析、新規オートファジー活性評価レポーターの開発、新規オートファジー制御化合物の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a lysosome-mediated degradation system for cytoplasmic materials and it has become clear that autophagy is related to various biological phenomena. Under this Project, we elucidated the molecular mechanisms underlying autophagosome formation, autophagosome-lysosome fusion, and autophagosomal membrane degradation, as well as novel physiological roles for autophagy in mice. Furthermore, a novel reporter to monitor autophagic activity was established, and autophagy-modulating drugs were also identified.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：オートファジー 細胞内分解 リソソーム

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分解系である。これまでに、オートファジーの基本分子基盤の解明とともに、オートファジーが飢餓適応、細胞内浄化、初期胚発生、免疫応答、神経変性疾患・がん抑制などの広範な生命現象に関与していることが明らかにされてきた。しかし、これらの基本フレームが理解された現在でも、残された課題や新たに見つかった課題が多く存在する。例えば、オートファゴソーム形成部位やオートファゴソームとリソソームの融合機構については未解明の課題が多い。また、個体レベルでのオートファジーの生理機能の理解もまだ進展途中である。ヒト疾患との関わりについては、神経変性疾患 (SENDA) などオートファジー遺伝子との関連が示され始めたに過ぎず、分子機構との関連は明確になっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、特にオートファゴソーム形成およびオートファゴソームとリソソームとの融合過程の細胞生物学的解析、これらの分子基盤に基づいたオートファジーおよびリソソーム関連新規分解系のマウス個体での機能解析、新規オートファジー制御化合物の同定を行い、ヒト疾患の病態形成におけるオートファジーの役割の理解と制御へとつなげることを目指した。

3. 研究の方法

オートファジーの分子機構の解析では、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中心として、分子生物学、生化学、形態学、細胞生物学を主体とした解析を行った。オートファジーの生理的意義の研究については、脊椎動物モデルとしてマウスとゼブラフィッシュを用いた遺伝学的解析を主体とした。オートファジー活性制御化合物探索には、新規オートファジー活性評価系を構築し、既存薬ライブラリーをスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) オートファゴソームとリソソームの融合における繫留因子の発見：

本研究グループでは、これまでにオートファゴソームとリソソームの融合過程に必要な SNARE 因子としてシンタキシン 17 を同定した。今回、シンタキシン 17 に結合する因子を探索した結果、リソソームとエンドソームの融合が必要であることが知られている繫留因子 HOPS 複合体がシンタキシン 17 と結合することを見だし、それがオートファゴソームとリソソームとの融合に必要なことを明らかにした。

(2) オートファゴソーム形成過程の超微形態学的解析：

オートファゴソーム形成に関わる ATG 因子群については、これまで遺伝学的相互関係が主に調べられてきたが、これらの因子が具体的にどのような膜動態を制御しているかは明らかではなかった。そこで、今回、代表的な ATG 因子のノックアウトおよびノックダウン細胞の電子顕微鏡を用いた超微細構造解析を行い、各 ATG 因子または複合体が機能するオートファゴソーム形成ステップを特定した。また、同時にオートファジー選択的基質としてフェリチンを特定した。

(3) *Atg13* 欠損マウスの解析：

マウスを用いたオートファジーの生理・病態生理学的解析のために、*Atg13* ノックアウトマウスを作製・解析した。ATG13 は ULK、FIP200、ATG101 とともに複合体を形成して、オートファゴソーム形成の始動を制御する因子である。*Atg13* ノックアウトマウスは胎生致死となり、心筋の発達異常がその原因と考えられた。ATG13 と共同して機能する FIP200 を欠損するマウスも胎児期に死亡するが、他の多くの ATG 遺伝子ノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、ATG13-FIP200 がもつ非オートファジー機能が心臓発生に寄与していると考えられた。

(4) SENDA モデルの作製と解析：

中国 Hong Zhang 博士と共同でヒト SENDA 病のモデルとして WIPI4/WDR45 ノックアウトマウスを作製・解析した。このマウスではオートファジー基質の蓄積とともに学習障害、運動障害が観察され、ヒト SENDA 病の解析に有用であることが示唆された。

(5) オートファジー始動複合体の構造と機能解析：

計画研究の野田展生グループと共同で、オートファジー始動複合体サブユニットの ATG101-ATG13 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。その結果、ATG101 は ATG13 の N 末端領域と同様に HORMA ドメイン構造を持ち ATG13 と HORMA-HORMA 複合体を形成すること、その反対面に特徴的な WF フィンガーをもち下流の ATG 因子の集積に重要であることを明らかにした。

(6) オートファゴソーム膜閉鎖と内膜分解に関する研究：

哺乳類細胞におけるオートファゴソームの成熟過程を解析し、オートファゴソームとリソソームの融合とそれに引き続くオートファゴソームの内膜の分解を生細胞でとらえることに初めて成功した。さらに、オートファゴソームの SNARE タンパク質である Syntaxin17 をマーカーとして用いることで、ATG 結合系はオートファゴソームの閉鎖に必要であり、それによる外膜と内膜の切り離しがオートファゴソーム内膜の効率的分解に必要なことを示唆した。

(7) オートファジー活性評価レポーターの開発とそれを用いた制御化合物の同定:

オートファジー活性(フラックス)を簡便かつ定量的に測定できる新規レポーター GFP-LC3-RFP-LC3 Δ Gを開発した。本レポーターを用いることで、培養細胞だけでなく動物個体内でもオートファジー活性を測定しえた。その結果、マウスやゼブラフィッシュの受精卵、水晶体などで高いオートファジー活性を認めた。さらに既承認薬ライブラリーから新規オートファジー誘導薬・阻害薬を同定した。今後、本プローブの利用によってオートファジーの基礎研究や疾患研究が進展することが期待される。本法は特許を出願した。

(8) 神経特異的オートファジーレスキューマウスの解析:

オートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスは生後1日で死亡するが、神経細胞にのみ *Atg5* 遺伝子を再導入したマウスを作製したところ成獣まで生存できるようになった。よって、*Atg5* 欠損マウスの新生仔期における死因は神経異常にあったことがわかった。さらにこのマウスは鉄吸収不全による貧血や性ホルモン低下を伴う性腺委縮を呈することから、オートファジーがもつ新しい生理機能の存在が示唆された。

(9) オートファゴソーム形成場への初期因子集積に関する研究:

オートファゴソーム膜関連構造体の生化学的解析を行い、ATG因子群の最上のULK複合体がまず小胞体膜に局在し、次にPI3K依存的にATG9A陽性の隔離膜構造体に局在することを見いだした。ULK複合体が局在する小胞体膜上には、ホスファチジルイノシトール合成酵素などの脂質合成酵素が豊富に存在していることから、このような特殊なドメインがオートファゴソーム形成に重要であることを示唆した。

(10) ATG2タンパク質の機能解析:

オートファゴソーム形成中期の膜伸長過程に必要なATG2についてATG2A/Bダブルノックアウト細胞を樹立し、ATG2Aが隔離膜および脂肪滴に局在するのに必須な領域を解析した。新規に見いだした両親媒性ヘリックスは両者への移行に、ATG2AのN末端領域は隔離膜局在に、C末端領域は脂肪滴局在に関与することが判明した。C末端領域は進化的に保存されているにもかかわらずオートファジーには必要なく、ATG2の他の機能に必要であると考えられた。

(11) オートファゴソームとリソソームの融合に関する研究:

オートファゴソームとリソソームの融合を仲介するSNAREタンパク質であるsyntaxin 17のN末端領域欠損体が優勢阻害効果を示す

ことを発見し、それを用いて簡便にオートファゴソームを蓄積させる系を構築した。また、syntaxin 17を欠損した細胞でもオートファゴソームとリソソームの融合が部分的に残存することを見だし、それを相補する新規オートファゴソームSNAREとしてYKT6を同定した。

(12) 人為的脂肪滴分解法の開発:

オートファジーの分解基質を脂肪滴表面に局在させるとオートファジーによる脂肪滴の選択的分解が起こることを示し、マウス受精卵にリポファジーを誘導することで胚発生における脂肪滴の必要性を明らかにした。

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67件)

以下は全て査読有り

1. Matsui, T., Jiang, P., Nakano, S., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., *Mizushima, N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol* (2018)掲載確定
2. *Mizushima, N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol* 20:521-527 (2018).
3. Tamura, N., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Koyama-Honda, I., Yamamoto, H., *Mizushima, N. Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets. *FEBS Lett* 591:3819-3830 (2017)
4. Nishimura, T., Tamura, N., Kono, N., Shimanaka, Y., Arai, H., Yamamoto, H., *Mizushima, N. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J* 36:1719-1735 (2017).
5. Uematsu, M., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Yamamoto, H., *Mizushima, N. Accumulation of undegraded autophagosomes by expression of dominant-negative syntaxin 17 mutants. *Autophagy* 9:1-13 (2017).
6. Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., *Mizushima, N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354:1036-1041 (2016).
7. Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y.,

- Tsukamoto, S., Matsui, T., Toyota, Y., Kodama, A., Ishihara, T., Mizushima, T., *Mizushima, N. An autophagic flux probe that releases an internal control. *Mol Cell* 64: 835-849 (2016).
8. Yoshii, S.R., Kuma, A., Akashi, T., Hara, T., Yamamoto, A., Kurikawa, Y., Itakura, E., Tsukamoto, S., Shitara, H., Eishi, Y., *Mizushima, N. Systemic analysis of Atg5-null mice rescued from neonatal lethality by transgenic ATG5 expression in neurons. *Dev Cell* 39: 116-130 (2016).
 9. Kaizuka, T., *Mizushima, N. Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice. *Mol Cell Biol* 36: 585-595 (2015).
 10. Suzuki, H., Kaizuka, T., *Mizushima, N., *Noda, N. N. Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. *Nat Struct Mol Biol* 22: 572-580 (2015).
 11. Zhao, Y.G., Sun, L., Miao, G., Ji, C., Zhao, H., Sun, H., Miao, L., Yoshii, S.R., Mizushima, N., Wang, X., Zhang, H. The autophagy gene Wdr45/Wipi4 regulates learning and memory function and axonal homeostasis. *Autophagy* 11:881-90 (2015).
 12. Kishi-Itakura, C, Koyama-Honda, I., Itakura, E., *Mizushima, N. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci* 127:4089-4102 (2014).
 13. Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., *Mizushima, N. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell* 25:1327-1337 (2014).

[学会発表] (計 181 件)

1. Noboru Mizushima. "Novel Roles of Autophagy in Vertebrate Development" Gordon Research Conference: Autophagy in Stress, Development & Disease. 2018.
2. Noboru Mizushima. "Autophagy: From Yeast to Nobel Prize" Gordon Research Seminar: Autophagy in Stress, Development & Disease. 2018.
3. Noboru Mizushima. "Maturation of the autophagosome" EMBO Conference "Autophagy - from molecular principles to human diseases". 2017.
4. Noboru Mizushima. "Autophagy in intracellular quality control" Keystone Symposium on Aging and Mechanisms of Disease. 2017.
5. Noboru Mizushima. "Novel Methods for Monitoring Autophagosome Maturation and Autophagic Flux" Keystone Symposium: Autophagy Network Integration in Health and Disease. 2017.
6. Noboru Mizushima. "The Life of the Autophagosome" Keystone Symposium Autophagy: Molecular and Physiological Mechanisms. 2016.
7. Noboru Mizushima. "Initiation of Autophagosome Formation" Gordon Research Conference, Autophagy in Stress, Development & Disease. 2016.
8. Noboru Mizushima, Hideaki Morishita "Live imaging and molecular dissection of organelle degradation in the lens" International Conference on the Lens 2015. 2015.
9. Noboru Mizushima. "Formation and maturation of the autophagosome" EMBO Conference, Autophagy signalling and progression in health and disease. 2015.
10. Noboru Mizushima. "Novel insights into physiological roles of autophagy in mice" Keystone Symposium Autophagy. 2015.
11. Noboru Mizushima, Hideaki Morishita "Quality control and organelle degradation in the lens" The 7th International Symposium on Autophagy. 2015.
12. Noboru Mizushima. "Molecular mechanisms of autophagy" The 3rd International Symposium: Protein trafficking in health and disease. 2014.
13. Noboru Mizushima. "Novel Insights into Autophagy Function" Keystone Symposium "Autophagy: Fundamentals to Disease". 2014.
14. Noboru Mizushima. "Autophagosome Biogenesis: Players and Substrates" Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development & Disease. 2014.
15. Noboru Mizushima. "Autophagosome formation and maturation" Buenos Aires Conference 2013 Autophagy: Molecular Mechanisms in Biology and Diseases. 2013.

[図書] (計 2 件)

1. 大隅良典監修、吉森保、水島昇、中戸川仁編集 「オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで」 (The Frontiers in Life Sciences) 南山堂

- 2017年 241 ページ
2. 水島昇、吉森保 編集 「The オートファジー 研究者たちの集大成が見える最新ビジュアルテキスト」(実験医学増刊 35 巻 15 号) 羊土社 2017年 224 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: オートファジーの測定に好適な融合タンパク質、前記融合タンパク質をコードする核酸、及びそれらの利用

発明者: 水島昇

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/064568

出願年月日: 2015年5月21日

国内外の別: 海外

名称: オートファジー誘導剤

発明者: 水島昇、貝塚剛志、濱祐太郎、豊田雄一郎、水島徹

権利者: 国立大学法人東京大学、株式会社 LTT バイオフィーマ

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/019848

出願年月日: 2017年5月29日

国内外の別: 海外

名称: オートファジー阻害剤

発明者: 水島昇、貝塚剛志、濱祐太郎、豊田雄一郎、水島徹

権利者: 国立大学法人東京大学、株式会社 LTT バイオフィーマ

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/023683

出願年月日: 2017年6月28日

国内外の別: 海外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

領域 HP

<http://www.proteolysis.jp/autophagy/>

研究代表者 HP

<http://square.umin.ac.jp/molbiol/index.html>

html

新聞等報道

1. 東京読売新聞 2017.1.21 [ふしぎ科学館]生物に大切な自食作用(水島・小松・吉森)
2. 読売新聞 2016.12.8 オートファジー働きの強さ調べる新手法(水島)
3. 日本経済新聞 2016.11.5 オートファジーを促す作用 既存の薬 16 種で発見(水島)
4. 朝日新聞 2016.11.5 オートファジーの活

発さ 簡単測定(水島)

5. 朝日新聞 2016.10.27 オートファジー過程解明へ新発見(水島)
6. 科学新聞 2016.10.7 オートファジー起こせないマウス新生仔の死因解明(水島)
7. 日経産業新聞 2016.2.22 細胞「自食作用」解明リード(水島・斉木)
8. 東京読売新聞 2015.8.6[知の探検]オートファジー 細胞リサイクル、栄養補給(水島・小松・吉森)
9. 日経産業新聞 2015.6.2 自食作用の引き金解明(野田展生・水島)
10. 日経産業新聞 2014.11.25 細胞の「掃除役」可視化 がんなどとの関連探る(水島)
11. 毎日新聞 2014.4.3 命名から半世紀、ブームの「オートファジー」多様な機能(水島・小松・吉森)
12. 日経産業新聞 2014.1.20 自食作用 病気治療に活用 がんや神経疾患 研究者が結集(水島・吉森)
13. 朝日新聞 2013.12.16 迫れ細胞リサイクル 病気の解明に期待 研究進む(水島・吉森)

アウトリーチ活動

1. 水島昇 第 126 回東京大学公開講座「細胞内のリサイクルによる秩序: オートファジー」 東京大学 2017年11月25日
2. 塚本智史 千葉市科学フェスタ「生命誕生の瞬間とオートファジー」 千葉市科学館 2017年10月8日
3. 水島昇 東京大学オープンキャンパス 講義「オートファジー: 体の中のリサイクル」 東京大学 2017年8月3日
4. 水島昇 東京大学五月祭模擬講義「研究者の半生」 東京大学 2017年5月20日
5. 水島昇 東京医科歯科大学お茶の水際市民講座「体のなかのリサイクル: 特にオートファジーについて」 東京医科歯科大学 2015年10月17日
6. 水島昇 音羽公開講座講演「どんどん入れ替わっている私たちの体: 生命科学の紹介」 音羽中学校 2015年1月17日
7. 水島昇 第 7 回 形態科学シンポジウム 講演「どんどん入れ替わっている私たちの体: 分解の科学」 高校生約 100 名 東京大学 2014年10月25日
8. 水島昇 読売テクノフォーラム「科学の力で世界を元気に」講演「細胞内リサイクルからみた生命の不思議」 一般約 100 名 読売大阪ビル 2014年6月25日
9. 水島昇 読売テクノフォーラム「科学の力で世界を元気に」講演「細胞内リサイクルからみた生命の不思議」 一般約 100 名 日本プレスセンター 2014年5月10日
10. 水島昇 武蔵高等学校中学校記念祭講

演「基礎医学研究の楽しさ ～細胞内リ
サイクルの研究を通じて～」 中学生高
校生約 200 名 武蔵中学校高等学校
2014 年 4 月 27 日

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

(2) 研究分担者

塚本 智史 (TSUKAMOTO, Satoshi)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・放射線医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：80510693

(3) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80325638