

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14694

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いたオートファジー関連因子群の生理機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel physiological functions of autophagy-related factors using zebrafish

研究代表者

森下 英晃(Morishita, Hideaki)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：90783499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの実行には多数のオートファジー関連因子群が関与するが、これらの多種多様なオートファジー関連因子群が生体内でどの程度オートファジーに関与しているのか、どのような固有の生理機能を有しているのかはほとんど不明であった。本研究ではゼブラフィッシュやマウスを用いた解析を実施し、各因子の腸管、肝臓、肺等における新規生理機能を解明した。さらに水晶体におけるオルガネラ分解は各種オートファジー関連因子群を必要としないこと、サイトゾルのリパーゼが必要であることも解明した。これらの成果は、脊椎動物における細胞内分解機構の包括的な理解につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の3つの成果は以下の理由でヒト疾患の病態解明、治療につながることを期待される。第一にVMP1のリポタンパク質分泌における新たな機能は、これまでに十分に明らかにされていなかったリポタンパク質の分泌機構の一端を解明したものであり、脂質異常症等の血中リポタンパク質の量の異常を伴うヒト疾患の新たな治療標的となりうる。第二に今回解明した肺のサーファクタント形成におけるオートファジーの役割は、新生児呼吸逼迫症候群等の肺拡張不全を伴うヒト疾患の病態の理解につながる。第三に今回解明した水晶体の透明性・屈折率の獲得に関する知見は、ヒト白内障等の病態の理解や新たな治療戦略につながる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is governed by various autophagy-related (ATG) proteins, but their physiological functions in vertebrates have not been fully understood. Here, using zebrafish and mice as model organisms, we revealed novel autophagy-dependent and/or -independent functions of ATG factors in several tissues including the intestine, liver, and lung. We further identified a cytosolic lipase-mediated mechanism of organelle degradation in the lens that do not require any ATG factors. These findings demonstrate critical roles of ATG factors in vivo as well as a novel autophagy-independent mechanism of organelle degradation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー関連因子 ゼブラフィッシュ 水晶体 大規模オルガネラ分解 ラメラ体 リソソーム
関連オルガネラ 小胞体 リポタンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー(以後オートファジー)はタンパク質やオルガネラなどの細胞内構成成分をオートファゴソームによって隔離し、リソソームと融合することでそれらを分解するシステムである。これまでに酵母を用いた遺伝学的解析などからオートファジーの実行には 20 種類以上のオートファジー関連(ATG)因子が関与することが明らかにされている。しかし、脊椎動物においてこれらの多種多様な ATG 因子群がどのような生理機能を有しているかは十分に解明されていない。また近年、培養細胞等を用いた解析から ATG 因子の多くはオートファジー以外の機能を有することが示唆されつつあるが、生体内における各 ATG 因子のオートファジー非依存的機能についてはほとんど不明である。

また脊椎動物の発生や分化の過程で生理的に起こる細胞内分解現象にどの程度オートファジーおよび各 ATG 因子が貢献しているかも十分に解明されていない。脊椎動物の目の水晶体では、水晶体細胞の最終分化過程において、核、小胞体、ミトコンドリアなどの全てのオルガネラが分解される。これまでに核 DNA の分解にはリソソームの DNA 分解酵素が必須であることが報告されており、オートファジー等のリソソーム系の関与が想定されていた。しかし、実際にどのような分解機構によってオルガネラが分解されるのかはまったく不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脊椎動物の生体内における各 ATG 因子の生理機能を解明することである。これまでにマウスを用いた遺伝学的解析から、脊椎動物におけるオートファジーの多種多様な生理機能が見出されている。しかし、それらの知見の多くは一部の限られた ATG 因子(ATG5 や ATG7 等)の遺伝子破壊マウスを用いた研究に基づいており、他の ATG 因子が生体内でどのような共通あるいは異なる生理機能を有しているかは不明である。したがって、様々な ATG 因子の遺伝子欠損動物を用いた包括的な解析が必須である。水晶体のオルガネラ分解機構についても ATG5 および VPS34 は必要ないことが解明されているが、他の ATG 因子の関与は不明である。そこで本研究では、様々な ATG 因子の欠損動物を作製し、それらの表現型を詳細に解析することで、各 ATG 因子の新たなオートファジー依存的または非依存的機能を同定することとした。さらに水晶体のオルガネラ分解における各 ATG 因子の必要性およびその分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では各 ATG 因子の *in vivo* スクリーニングに用いる脊椎動物モデルとしてゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュはマウスと比較して、遺伝子改変やライビメーキング解析が容易、低コストかつ小スペースで飼育できるといった特徴があるため、多数の遺伝子改変体を作製し表現型を解析する本研究には最適と考えられた。そこでまず、CRISPR/Cas9 システムを用いて様々な Atg 因子の欠損体を作製した。次にそれらの表現型(寿命、外観、行動の異常、オルガネラ分解など)の有無を解析した。オートファジーやリソソームの関与は、各オルガネラ特異的レポーター mRNA をゼブラフィッシュにインジェクションし、蛍光顕微鏡を用いて解析した。電子顕微鏡を用いて細胞内の微細構造も観察した。水晶体オルガネラ分解の分子機構を解明するため、水晶体に特異的に発現する遺伝子群の欠損ゼブラフィッシュを作製し、オルガネラ分解の異常を来す変異体の表現型を詳細に解析した。以上のゼブラフィッシュを用いた解析から得られた新規機能の進化的保存性を解析するため、CRISPR/Cas9 システムや gene トラップ法を用いてそれらの新規機能に関与する遺伝子のノックアウトマウスを作製し表現型を解析した。

4. 研究成果

各 Atg 因子欠損ゼブラフィッシュを用いた表現型スクリーニングおよびマウスを用いた相補的解析の結果、以下の 3 つの新たな知見を得た。

(1) オートファジー因子 VMP1 の新規オートファジー非依存的機能の解明

各 Atg 因子欠損ゼブラフィッシュの外観を比較解析した結果、オートファジーに必須な Atg 因子の一つである小胞体膜タンパク質 Vmp1 を欠損させたゼブラフィッシュにおいてのみ、腹部に透過性の低い領域の出現を認めた(図 1、矢印)。オイルレッド O 染色の結果、肝細胞と腸管上皮細胞に中性脂肪の蓄積を認めた。一方、他の Atg 因子(Fip200 や Atg5)欠損ゼブラフィッシュでは中性脂肪の蓄積を認めなかったため、Vmp1 は肝細胞と腸管上皮細胞の脂肪代謝経路においてオートファジー非依存的な機能を有すると考えられた。全身で VMP1 を欠損させたマウスにおいても、臓側内胚葉の細胞内に同様に中性脂肪の蓄積を認め、胎生 10 日以前に致死となった。消化管上皮細胞特異的 VMP1 欠損マウスにおいても、小腸上皮細胞内に中性脂肪の蓄積を認め、体重減少、血中の HDL 等のリポタンパク質の減少を認めた。肝臓、腸管、臓側内胚葉のいずれも中性脂肪等から構成されるリポタンパク質の合成と分泌を担う組織であることから、VMP1 はリポタンパク質の合成

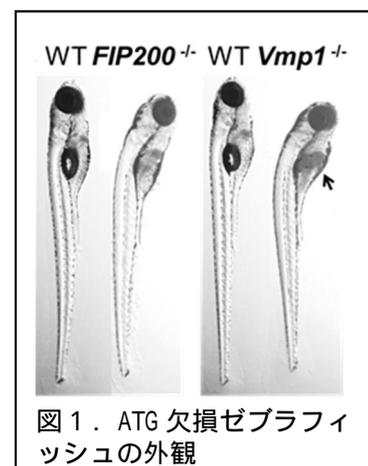


図 1. ATG 欠損ゼブラフィッシュの外観

や分泌に関与することが示唆された。実際、上記の Vmp1 欠損細胞に蓄積していた中性脂肪は小

胞体の膜内に存在しており、その周囲にはリポタンパク質の構成成分であるアポリポタンパク質 B が存在していた。さらに VMP1 をノックダウンした HepG2 細胞を用いた解析から、VMP1 はアポリポタンパク質 B や E の分泌に重要であること、脂肪滴のサイトゾルへの離脱過程にも異常を認めることがわかった。したがって、VMP1 はリポタンパク質の分泌の初期段階である小胞体膜からの離脱過程に関与することが強く示唆された。以上の研究成果は、VMP1 の小胞体膜上における新規オートファジー非依存的機能を初めて解明したものであり、ヒト脂質代謝異常症の病態理解につながる可能性がある。本成果は eLife 誌に掲載された (Morishita et al., eLife, 2019)。

(2) 浮袋・肺におけるオートファジーの新規生理機能の解明

前述の各 Atg 因子欠損ゼブラフィッシュの外観を比較解析した結果、Fip200、Atg13、Atg101、Atg14、Atg2a/b、Atg9a/b、Vmp1 の各欠損ゼブラフィッシュに共通な表現型として、受精後 2 週間以内に致死となること、浮袋の拡張不全を認めることが明らかになった (図 1)。Fip200 欠損ゼブラフィッシュの浮袋では、浮袋上皮は形成されているものの、内腔の拡張を認めなかった。Fip200 欠損ゼブラフィッシュは浮いた状態を維持できず、この理由として浮袋の拡張不全が考えられた。浮袋の拡張には、サーファクタントと呼ばれるリン脂質・タンパク質複合体が必要と考えられており、サーファクタントは浮袋上皮細胞内のリソソーム関連オルガネラであるラメラ体で形成され分泌される。Fip200 欠損ゼブラフィッシュではこのラメラ体のサイズや数が低下していたことから、オートファジーはラメラ体形成または成熟に重要な役割を担うことが示唆された。浮袋は肺の解剖学的相同器官であることから、サーファクタント分泌を担うマウス肺細胞型上皮細胞を観察したところ、オートファゴソームとラメラ体が高頻度に融合していることが明らかになった。さらに ATG101 欠損マウスおよび肺細胞型細胞特異的 FIP200 欠損マウスのいずれにおいても、ラメラ体のサイズ・数の減少を認め、後者は出生直後に呼吸困難、新生児致死を認めた。ATG101 欠損肺ではサーファクタントの構成成分である DPPC 等のリン脂質の合成は正常に見られたことから、オートファジーはリン脂質の合成ではなく、ラメラ体への輸送に関与すると考えられた。以上の成果は、オートファジーは単に細胞質成分を分解するだけでなく、他のオルガネラに輸送するという役割も担うという可能性を示唆しており、新生児呼吸逼迫症候群等のサーファクタント分泌障害を伴う疾患の病態の理解につながることを期待される (Morishita et al., 投稿中)。

(3) 水晶体におけるオルガネラ分解の分子機構の解明

前述の各 Atg 因子欠損ゼブラフィッシュの水晶体のオルガネラを解析した結果、Fip200 や Atg5 等のオートファジーに必須な Atg 因子は小胞体やミトコンドリアの分解に必要ないことが明らかになった。したがって、マウスと同様に、ゼブラフィッシュにおいても水晶体のオルガネラ分解はオートファジーに依存しないことが明らかになった。トランスクリプトーム解析から水晶体に特異的に発現する因子を同定できたため、それらの因子を CRISPR/Cas9 システムでノックアウトし表現型を解析した。その結果、ホスホリパーゼの一つがオルガネラ分解に必須であることが明らかになった。マウスでも同じファミリーの分子がオルガネラ分解に必須であった。これらの因子のノックアウトゼブラフィッシュおよびマウスの水晶体は、白内障および屈折率異常を認めた。これらの結果から、水晶体のオルガネラ分解は従来のオートファジーに依存しないリパーゼを用いた新規オルガネラ分解機構によること、オルガネラ分解は水晶体の透明化と屈折率の獲得に必須であることが明らかになった (Morishita et al., 投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morishita Hideaki, Zhao Yan G, Tamura Norito, Nishimura Taki, Kanda Yuki, Sakamaki Yuriko, Okazaki Mitsuyo, Li Dongfang, Mizushima Noboru	4. 巻 8:e48834
2. 論文標題 A critical role of VMP1 in lipoprotein secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 0~0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.48834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morishita Hideaki, Mizushima Noboru	4. 巻 35
2. 論文標題 Diverse Cellular Roles of Autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annual Review of Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 453~475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-cellbio-100818-125300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森下 英晃	4. 巻 272
2. 論文標題 オートファジー関連因子の非オートファジー機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 737~744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morishita Hideaki, Mizushima Noboru	4. 巻 35
2. 論文標題 Diverse Cellular Roles of Autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annual Review of Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 453~475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-cellbio-100818-125300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishita Hideaki, Zhao Yan G, Tamura Norito, Nishimura Taki, Kanda Yuki, Sakamaki Yuriko, Okazaki Mitsuyo, Li Dongfang, Mizushima Noboru	4. 巻 8
2. 論文標題 A critical role of VMP1 in lipoprotein secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e48834 - 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.48834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森下 英晃	4. 巻 272
2. 論文標題 オートファジー関連因子の非オートファジー機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 737 - 744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Keigo, Hama Yutaro, Izume Tamaki, Tamura Norito, Ueno Toshihide, Yamashita Yoshihiro, Sakamaki Yuriko, Mimura Kaito, Morishita Hideaki, Shihoya Wataru, Nureki Osamu, Mano Hiroyuki, Mizushima Noboru	4. 巻 217
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screen identifies TMEM41B as a gene required for autophagosome formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3817 ~ 3828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201804132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 森下英晃
2. 発表標題 オートファジーの分子メカニズムと疾患モデル動物開発
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃
2. 発表標題 オートファジーの生理機能とヒト遺伝性疾患との関連
3. 学会等名 第12回生態影響試験実習セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃, 神田侑季, 田村律人, 清水宏, 村松一洋, 柿田明美, 水島昇
2. 発表標題 オートファジー関連因子WDR45に変異を伴う脳神経変性疾患SENDAの病態解明
3. 学会等名 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第8回班員会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃、江口智也、水島昇
2. 発表標題 水晶体細胞の最終分化過程におけるオルガネラ分解機構の解明
3. 学会等名 第57 回日本白内障学会総会/第44 回水晶体研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃、田村律人、神田侑季、千野遥、江口智也、西村多喜、酒巻有里子、貝塚剛志、岡崎三代、山本林、水島昇
2. 発表標題 脊椎動物におけるオートファジー関連因子群の新たな生理機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃、田村律人、Yan GZhao、西村多喜、神田侑季、酒巻有里子、岡崎三代、Dongfang Li、Hong Zhang、水島昇
2. 発表標題 小胞体膜タンパク質VMP1はリポタンパク質の小胞体からの脱離に必要である
3. 学会等名 第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下英晃、神田侑季、田村律人、水島昇
2. 発表標題 オートファジー関連因子WDR45/WDR45Bの脳神経系細胞における機能解析
3. 学会等名 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第9回班員会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Morishita, Yuki Kanda, Haruka Chino, Takeshi Kaizuka, Yuriko Sakamaki, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Autophagy is required for formation of surfactant-containing lamellar bodies in alveolar and swimbladder epithelial cells
3. 学会等名 Keystone Symposia Autophagy: From Model Systems to Therapeutic Opportunities (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Morishita, Tomoya Eguchi, Noboru Mizushima
2. 発表標題 A cytosolic phospholipase-mediated organellar degradation in the lens
3. 学会等名 International Conference on the Lens 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Morishita, Tomoya Eguchi, Satoshi Tsukamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 A novel macroautophagy-independent mechanism of organelle degradation in the lens
3. 学会等名 The 9th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下英晃、江口智也、塚本智史、水島昇
2. 発表標題 水晶体における新規オルガネラ膜分解機構の同定と生理的意義の解明
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会・第1回新学術領域研究「マルチモードオートファジー」班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下英晃、江口智也、塚本智史、水島昇
2. 発表標題 水晶体における新規膜系オルガネラ分解機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Morishita, Tomoya Eguchi, Satoshi Tsukamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Live imaging and molecular dissection of organelle degradation in the lens
3. 学会等名 EMBO Workshop (Autophagy: From molecular principles to human diseases) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下英晃、江口智也、塚本智史、水島昇
2. 発表標題 水晶体オルガネラ分解の分子機構と生理的意義の解明
3. 学会等名 第58回日本白内障学会総会 / 第45回水晶体研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下英晃、神田侑季、千野 遥、酒巻有里子、貝塚剛志、水島昇
2. 発表標題 脊椎動物におけるオートファジー関連遺伝子群の新たな生理機能
3. 学会等名 第66回 日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下英晃、田村律人、神田侑季、酒巻有里子、水島昇
2. 発表標題 脊椎動物におけるオートファジー関連因子群の新たな生理機能
3. 学会等名 第19回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 濱 祐太郎, 森下英晃, 水島 昇	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 647
3. 書名 決定版 阻害剤・活性化剤ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----