

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790276

研究課題名（和文） オートファジーの栄養代謝学的意義の解析

研究課題名（英文） The role of autophagy in nutrient metabolism

研究代表者

久万 亜紀子 (KUMA AKIKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30392377

研究成果の概要（和文）：

オートファジーは細胞内の主要な分解システムである。本研究では、オートファジー必須遺伝子 *Atg5* を欠損させたマウスを用い、オートファジーの栄養学的役割を解析した。その結果、*Atg5* ノックアウト肝では絶食時の解糖系およびβ酸化の亢進が見られないことが分かった。また、絶食時の肝臓内アミノ酸濃度およびタンパク質合成が低下していたことから、オートファジーが絶食時のタンパク質合成に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy is a major intracellular degradation system. In this study, we analyzed the role of autophagy in nutrient metabolism by using autophagy-deficient mice. In *Atg5*-deleted liver, gluconeogenesis and beta-oxidation were not induced by starvation. Amino acid concentration and protein synthesis rate were reduced in the knockout liver. These results suggest that autophagy is important for amino acid supply and protein synthesis during starvation in the liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：オートファジー、ノックアウトマウス、栄養代謝

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは真核生物に普遍的に備わる細胞内分解系である。近年の研究により、オートファジーは飢餓応答・細胞内浄化・胚発生・免疫応答など様々な生理現象に深く関

与することが明らかにされてきた。これまで申請者は、オートファジーの生理機能を明らかにするため、オートファジー不全マウス (*Atg5* ノックアウトマウス) を世界に先駆けて作製し解析してきた。しかし、申請者らの

作製した *Atg5* ノックアウトマウスは生後 1 日で死亡するため、アダルトマウスの全身解析ができなかった。その後、申請者の所属研究室を始め、世界中で組織特異的ノックアウトマウスが解析されているが、それらはあくまで解析ツールが入手可能な組織に限定され、全身網羅的な解析は行われていない。このため申請者は、既存の組織特異的 Cre マウスを用いた決め打ち的なノックアウトマウス解析ではなく、オートファジーがどのような組織や局面で重要であるかを、バイアスをかけずに全身網羅的に調べることが必要であると考えた。そこで、新しいモデルマウスとして全身性オートファジー不全アダルトマウスを作成した。全身性オートファジー不全アダルトマウスは世界でまだ報告がなく、このモデルマウスを解析することで組織特異的ノックアウトマウスや従来の *Atg5* ノックアウトマウスでは分からなかったオートファジーの新しい生理的役割が明らかになることが期待される。

## 2. 研究の目的

オートファジーは細胞内分解システムである。栄養飢餓で著しく活性化することから飢餓時の栄養供給に重要であると考えられているが、その意義は哺乳動物ではほとんど解析されていない。オートファジーは様々な細胞質成分を分解し、その分解産物としてグルコース、脂肪酸、アミノ酸、核酸などの栄養素を細胞に供給できることから、飢餓時の栄養代謝に広く関与している可能性がある。そこで本研究では、オートファジー不全マウス（神経特異的 *Atg5* レスキューマウス、肝臓特異的 *Atg5* ノックアウトマウス、Tet-off *Atg5* マウス）を用い、メタボローム解析などの手法を取り入れ、オートファジーの栄養学的意義を明らかにすることを目的とする。また、神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの全身解析により、栄養学的役割のみならず、まだ報告されていないオートファジーの新しい生理機能が明らかになることが十分期待される。

## 3. 研究の方法

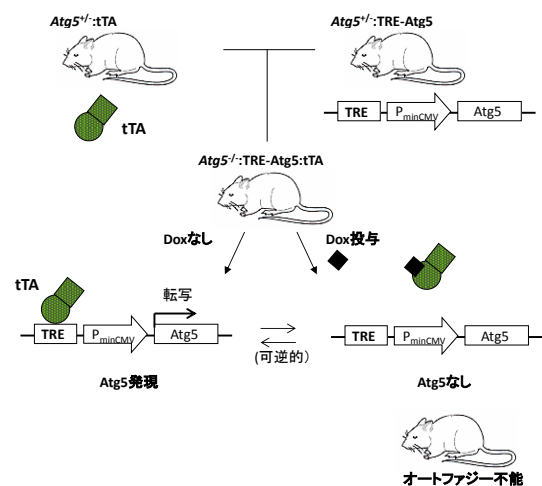
### (1) 神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの解析

オートファジー必須遺伝子 *Atg5* を全身で欠損したマウスは外見は正常に生まれてくるが、生後 1 日で死亡するため、アダルトマ

ウスにおけるオートファジーの役割を全身で解析することができなかった。*Atg5* ノックアウトマウスはミルクを飲まないため、神経変性による吸綴障害が死因の 1 つであると考えられた。そこで、全身性 *Atg5* ノックアウトマウスの神経でのみ *Atg5* を発現させた神経特異的 *Atg5* レスキューマウスを作製した。このマウスは、神経症状の回復により新生仔致死を回避し、少なくとも 16 週齢まで生存することができた。よって、アダルトマウスの全身生理機能解析が可能となった。このマウスを用いて、組織観察・血液検査・生化学的解析などの表現型解析を行い、アダルトマウスにおけるオートファジーの生理機能を全身網羅的に解析する。

### (2) Tet-Off *Atg5* マウスの作成

アダルトマウスの全身性 *Atg5* ノックアウトマウスを解析する目的で、Tet-Off システムを利用した時期特異的 *Atg5* ノックアウトマウスの作製を試みる。Tet-Off システムは、テトラサイクリンによって制御されるトランス活性化因子 (tTA) とテトラサイクリン応答因子 (TRE) を利用した方法である。tTA はドキシサイクリン (Dox) 非存在下で TRE と結合し、下流の遺伝子発現を誘導することができる。よって、*Atg5* ノックアウトマウスに tTA と TRE を導入することにより、*Atg5* の発現を Dox の投与で調節することができる。すなわち *Atg5*<sup>-/-</sup>:TRE-*Atg5*:tTA マウスは、Dox 投与により *Atg5* の発現がシャットダウンされオートファジー不能となり、薬剤の投与をやめることでオートファジーを再誘導することができる。



この系がうまく動けば、短期間にオートファジー不能を誘導できるため、ノックアウトの影響をよりダイレクトに観察できると考えられる。また、*Atg5* の発現が可逆的であり、ノックアウト後にオートファジーを再誘導することでオートファジーの機能を確認することができる。このマウスを用いて、アダルトマウスにおけるオートファジーの生理機能および栄養学的役割を解析する。

### (3) 肝臓特異的 *Atg5* ノックアウトマウスにおけるメタボローム解析

肝臓特異的 *Atg5* ノックアウトマウス (*Atg5*<sup>flox</sup>; Mx1-Cre) マウスを2日間絶食させ、この間の肝臓および血漿の栄養代謝産物をメタボローム解析により測定する。メタボローム解析結果から、どの代謝経路にオートファジーの関与がありそうかを見極め、その経路について代謝関連遺伝子の発現や代謝産物の定量などを行う。さらに、なぜオートファジーの欠損がそれらの変化を引き起こすかを、初代培養系なども導入して詳細に解析する。

## 4. 研究成果

神経特異的 *Atg5* レスキューマウスは、成長不全・重篤な貧血・生殖器の萎縮・肝脾の肥大など様々な異常を示した。特に貧血が重篤であったため、まず貧血に注目した解析を行った。ノックアウトマウスの赤血球の形態異常から、鉄欠乏性貧血が疑われた。ノックアウトマウスでは血清鉄濃度が著しく低かった。また、鉄を腹腔内投与したところ貧血が改善したことから、ノックアウトマウスが鉄欠乏状態にあり、貧血の一部は鉄欠乏が原因であることが分かった。肝・脾・骨髄などの主な鉄貯蔵臓器の鉄定量および染色を行ったところ、いずれの臓器においても鉄濃度が著しく低かった。また、出血による鉄の消失は観察されなかった。これらの解析から、*Atg5* ノックアウトマウスでは腸管における鉄吸収が低下していることが疑われた。次に、異常が認められた精巣および卵巣の解析を行った。精巣の組織観察を行ったところ、ノックアウトマウスでは精細管内腔の成熟精子の数が著しく少なかった。TUNEL 染色を行ったところノックアウトマウスの精巣基底膜付近の細胞で高頻度に細胞死が認められた。さらに電子顕微鏡によって詳細な観察

を行ったところ、精母細胞・精原細胞・精子細胞ではほとんど異常は認められず、それらの分化・成熟を支えるセルトリ細胞およびライディッヒ細胞に、凝集体蓄積や ER の形態異常などが認められた。これらの結果から、セルトリ細胞やライディッヒ細胞の異常により、精子形成が阻害されている可能性が考えられた。

神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの全身解析により、オートファジーの鉄吸収への関与という新しい知見が得られたが、このマウスは様々な異常を示すため、このモデルのみでは栄養代謝学的解析が難しいことが予想された。また、本研究で作製を試みた Tet-Off *Atg5* マウスは、TRE-*Atg5* トランスジェニックマウスを作製したものの、*Atg5* の十分なタンパク質発現が得られず、Tet-Off *Atg5* マウス樹立までには至らなかった。現在、改良を進めている。そのため本研究では、栄養学的解析を進めるために栄養代謝に重要な肝臓特異的 *Atg5* ノックアウトマウスを導入した。オートファジーは様々な細胞質成分を分解し、その分解産物としてグルコース、脂肪酸、アミノ酸、核酸などの栄養素を細胞に供給できることから、飢餓時の栄養代謝に広く関与している可能性がある。そこで、2日間の絶食における代謝産物の変動をメタボローム解析により網羅的に調べた。その結果、ノックアウト肝では多数の代謝産物に差が見られ、特にアセチル CoA の濃度が低かった。絶食時のアセチル CoA はトリグリセリドのβ酸化により供給されるため、β酸化関連遺伝子の発現を qPCR で調べたところ、ノックアウトマウスにおいてこれらの mRNA の発現が抑制されていた。長期的なオートファジー欠損ではミトコンドリア損傷が報告されているが、ミトコンドリアの形態異常は認められなかったため、ミトコンドリア損傷以外の理由でβ酸化が低下していると考えられた。次に、アミノ酸関連代謝産物の変化が大きかったため、アミノ酸について調べた。肝臓内アミノ酸濃度を調べたところ、絶食6時間でノックアウトマウスの肝臓内アミノ酸濃度が著しく低下しており、オートファジー由来のアミノ酸が絶食時のアミノ酸プールの維持に重要であることが示唆された。このときの *Atg5* ノックアウト肝ではタンパク質合成が低下していたことから、肝臓のオートファ

ジーンによるアミノ酸供給は、絶食時のタンパク質合成に重要であることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 久万 亜紀子

神経特異的 Atg5 レスキューマウスにおけるオートファジーの生理機能解析  
第 35 回日本分子生物学会年会  
2012. 12. 11 福岡

2. 久万 亜紀子

オートファジーの生理機能  
第 23 回日本生体防御学会学術総会  
2012. 7. 10 東京

3. 久万 亜紀子

Analysis of Atg5-deficient mice rescued with Atg expression in the brain.  
第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010)  
2010. 12. 10 神戸

〔図書〕 (計 1 件)

水島昇・吉森保 編  
化学同人  
オートファジー  
2013 pp. 100-117

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久万 亜紀子 (KUMA AKIKO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30392377

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

研究者番号：