心臓におけるオートファジーによる分解の意義

Role of Autophagy in the Heart.

（細胞生物学会推薦）

代表研究者
（財）東京都医学研究機構　東京都臨床医学総合研究所　水島　昇

Autophagy is an intracellular, bulk degradation process, through which a portion of cytoplasm is delivered to lysosomes to be degraded. Although the role of autophagy has been well studied in yeast cells, its physiological role in higher eukaryotes is still obscure. We therefore analyzed organ-specific roles of autophagy, particularly focusing on the heart and the nervous system. Although the activity of autophagy is very high in the heart, the abnormality of the heart muscles themselves was minimal even in the absence of autophagy under physiological conditions. Heart autophagy might be important under some stress conditions. In contrast, loss of autophagy in the brain causes neurodegeneration. Neural cell-specific Atg5 deficient mice develop progressive deficits in motor function that are accompanied by the accumulation of cytoplasmic inclusion bodies in neurons. In Atg5-/- neurons, diffuse intracellular abnormal proteins first accumulate, followed by generation of aggregates and inclusions. These results suggest that continuous clearance of diffuse cytosolic proteins by autophagy is important for preventing the accumulation of abnormal proteins, particularly in neurons but less important in the heart muscles. Therefore the importance of autophagy differs among tissues.

研究目的

細胞の正常な営みを保つためには、その構成要素の合成のみではなく、環境変化に応じてそれらを適切に分解することも重要である。特にタンパク質分解が様々な生命現象に積極的に関与していることは近年急速に認識されてきている。その主要な機構のひとつがオートファジー（自食作用）である（Figure 1）。オートファジーは原則的に非選択的な大規模な細胞内分解系であり、日常的な代謝回転のみならず、飢餓応答、オルガネラの品質管理、細胞内凝集体の除去において重要な役割を果たしていると予想されている。私たちはオートファジーの進行状況をモニターしうるマウスを作製、解析した結果、驚くべきことに絶食後に心臓（心筋細胞）で最も顕著なオートファジーの誘導を観察した。通常心筋細胞は遊離脂肪酸などを重要な栄養源として利用しているが、重篤な飢餓時には栄養素・エネルギー源確保のために自らを分解する可能性が示唆された。

そこで本研究ではこの心臓を中心にして、臓器特異的オートファジーの意義を明らかにすることを目的とした。

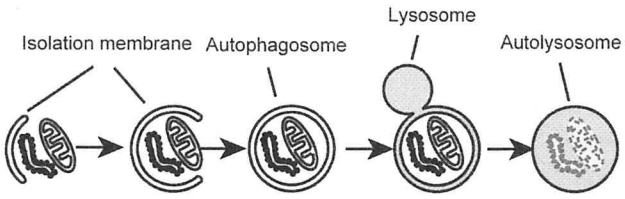

Figure 1. Model for autophagy. A portion of cytoplasm is enclosed by the autophagic isolation membrane, which eventually results in the formation of a double membrane structure, called autophagosome. The outer membrane of the autophagosome then fuses with the lysosome where the cytoplasm-derived materials are degraded.

研究経過

誘導的オートファジーの意義について

私たちはこれまでに、オートファゴソームに局在するタンパク質 LC3 と GFP の融合タンパク質を全身で発現する遺伝子改変マウスを作製し、オートファジーの in vivo 観察を行ってきた。従来は電子顕微鏡観察に頼らざるを得なかったが、このマウスの組織切片を観察すれば、オートファゴソームが GFP 蛍光のリングあるいはドットとして認識される。今回は胎生期から新生児期までのオートファジーの観察を行った結果、胎生期ではオートファジーの活性は低いレベルに抑えられているが、出生直後ただちに亢進し、生後 3~12 時間のあいだ高いレベルを示し 1~2 日後には元のレベルに戻ることが分かった（Figure 2）。この急激で一過性のオートファジーの亢進はほとんどの臓器で観察されたが、なかでも心筋でもっとも盛んであった。私たちは、新生児飢餓期間とオートファジー亢進のタイムコースが似ていることから、オートファジーの亢進が飢餓応答であり、オートファジーによるアミノ酸供給が出生後飢餓を乗り越えるのに重要なのではないかと考えた。そこで、オートファゴソーム形成に必要な *ATG5* 遺伝子を破壊したマウスを作製し、この仮説を検証した。

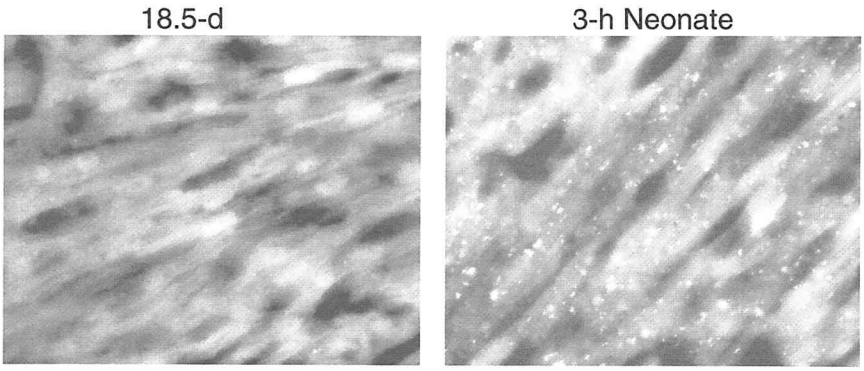

Figure. 2 Autophagy in the heart. Small dots represent autophagosome.

ATG5 ノックアウトマウスは大きな形態的異常を示さずほぼメンデルの比率で出生するが、生後 1 日以内に死亡した。このマウスは全身性のアミノ酸とエネルギー欠乏状態にあ

ることが判明した。さらにエネルギー状態を個体レベルで評価するため心電図を測定したところ、ノックアウトマウスにおいて生後 8~9 時間くらいから ST 上昇という波形異常が観察された（Figure 3）。通常 ST 上昇は虚血により現れる所見であるが、ノックアウトマウスは血管や循環器は正常であり虚血状態にあるとは考えにくい。また、この波形変化は野生型マウスにおいても長期飢餓時に現れるため、虚血による酸素不足と同様の変化が呼吸基質の不足により現れていることが推測された。現在この作用が心臓独自のものであるのか、全身的影響のためであるかを検討するために、心特異的オートファジー欠損マウスおよび心でオートファジー活性が回復するノックアウトマウスを作製して解析している。

Figure 3. ECGs from neonatal mice at the indicated time after the Caesarian delivery. ST elevation was observed in all *Atg5*$^{-/-}$ mice (n=4) at 8-9 h after delivery.

基底レベルのオートファジーの意義について

オートファジーの活性は出生直後に著明に亢進するが、胎生期はほとんどの臓器で非常に低いレベルに維持されていることが明らかとなった。オートファジーの能力を欠損した Atg5 ノックアウトマウスが外見上ほぼ正常に生まれることも、オートファジーが個体発生そのものには必要ないことを示している。しかしながら、Atg5 ノックアウトマウスは出生時にミルクを摂取しないこと、体重が約 1 割小さいことなどから、何らかの異常があることが示唆された。そこで、出生時の全組織を詳細に解析したところ、特定の組織でユビキチン陽性のタンパク質凝集体が形成されていることを観察した。これらは、肝、下垂体前葉、後根神経節、三叉神経節、副腎、中脳、橋などの中枢神経系などで特に顕著であった。これらのことから、アミノ酸を供給するという栄養学的貢献以外に、オートファジーは細胞内品質管理機構として非常に重要であることが強く示唆された。しかし心や骨格筋ではユビキチン陽性タンパク質の蓄積は軽度であった。より後期のステージで異常が明確になる可能性はあるが、これらの結果は組織によってオートファジーによる品質管理の要求性に差があることを示している。

臓器特異的なオートファジーの意義をさらに知るために、神経特異的 Atg5 ノックアウトマウスを作製し、神経細胞における基底レベルのオートファジーの意義を解析した。このマウスは生後飢餓を無事乗り越えるが、4 週頃より歩行障害などの運動機能異常を呈するようになり、Clasping reflex などの異常反射も観察された。さらに 3 ヶ月齢では全身の振戦も出現した。病理組織学的には、小脳プルキンエ細胞の脱落や大脳広範にわたる軸索の腫

大、大脳皮質の錐体細胞の部分的脱落、広範囲の神経細胞内にユビキチン陽性封入体が観察された。以上のことから、恒常的オートファジーによる品質管理はやはり神経細胞で特に重要であることが示された。

また特殊な例としては水晶体の透明化におけるオルガネラ分解にオートファジーが関与していることが考えられてきたが、ノックアウトマウスの解析からオートファジーの貢献は大きくはないことが明らかとなった。従って、水晶体内オルガネラ分解にはさらに未知の分解系が関わっていると考えられる。

細胞サイズ制御におけるオートファジーの意義

オートファジーの機能を細胞レベルで解析するためには、特異的にオートファジーを阻害する技術が必須である。これまで知られている阻害剤（３－メチルアデニンなど）は特異性が低い点が問題であった。また最近試みられている RNAi も完全な抑制が困難であり、ノックアウトマウス由来の細胞の使用も常に野生型との比較を必要とするため、時にクローン間の差異が遺伝子型の違いよりも大きくなることがある。そこで、私たちは同一細胞を用いてオートファジー能を自由に制御できる細胞を構築した。これには、Atg5 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞と Tet-OFF システムを利用した。この細胞では、テトラサイクリン存在下では Atg5 の発現は抑制されているが、薬剤除去後速やかに Atg5 発現が回復することが確認された。この細胞を用いて細胞サイズをさまざまな条件で解析したところ、オートファジー欠損状態では栄養飢餓による細胞サイズの減少が軽度であることが判明した。従って、オートファジーは細胞の肥大や萎縮に関与する可能性が示唆された。

考察

以上の研究から、心臓はオートファジーを非常におこしやすい臓器であるということがまず明らかになった。しかし、栄養を外部から調達するのではなく、なぜ自身のタンパク質を分解するのかについては依然不明である。一般に心筋は分岐鎖アミノ酸などを良い栄養源として利用できるとされているが、オートファジーに由来するアミノ酸を心筋細胞自身が利用しているかどうかも明らかではない。これらについては、心特異的ノックアウトマウスあるいは心でオートファジー活性を回復させたノックアウトマウスを用いてさらに検証していく必要がある。

一方、恒常的オートファジーの重要性は神経系で最も顕著であり、心筋では明らかな異常を見ることが出来なかった。しかし実験はまだ生理的条件下のみであり、さまざまなストレス環境下ではオートファジーによる細胞内品質管理が重要で可能性が十分に考えられる。心不全の病態を考えたときに心肥大は重要な過程であり、そのメカニズムについても必ずしも明らかになっていない。今回線維芽細胞の培養系を用いた実験から、オートファジーによる分解も細胞サイズの規定因子であることが明らかになったため、今後動物モデルを利用して心肥大におけるオートファジー活性などを検証していく必要があると考えら

れる。

研究発表

口頭発表

1. 水島昇　タンパク質代謝におけるオートファジーのふたつの役割. 第28回日本分子生物学会（福岡、2005）
2. 原　太一、中村　健司、中原　陽子、右島　理可、横山　峯介、松井　誠、岡野　栄之、水島　昇　神経系のタンパク質品質管理におけるオートファジーの役割. 第28回日本分子生物学会（福岡、2005）
3. 水島昇　The role of autophagy in nutrient regulation and intracellular clearance. タンパク質の一生国際シンポジウム（淡路、2005）
4. 水島昇　Autophagy: nutrient regulation and intracellular clearance. 第78回日本生化学会大会（神戸、2005）
5. Makoto Matsui, Akiko Kuma, Akitugu Yamamoto, Hiroshi Onimaru, Yoshinori Ohsumi, Noboru Mizushima　The importance of baseline autophagy in intercellular clearance during mouse embryogenesis. 第78回日本生化学会大会（神戸、2005）
6. Nao Hosokawa, Yukichi Hara, Noboru Mizushima　Generation and characterization of conditional autophagy knockout cells. 第78回日本生化学会大会（神戸、2005）
7. 水島昇　哺乳類オートファジーの生理的意義. 第 5 回日本蛋白質科学会年会（福岡、2005）
8. Taichi Hara, Kenji Nakamura, Yohko Nakahara, Rika Migishima, Minesuke Yokoyama, Makoto Matsui, Hideyuki Okano and Noboru Mizushima. Role of autophagy in protein quality control in the central nervous system. 第58回日本細胞生物学会大会（大宮、2005）
9. Mizushima N. Gordon conference "Autophagy in stress, development and disease"（イタリア、2005）
10. Mizushima N. : Role of mammalian autophagy as a starvation response. The American Society of Cell Biology 44th Annual Meeting,　（ワシントンDC、2004）
11. 水島昇：第 42 回日本生物物理学会　オートファジーの分子機構と生理的役割（京都、2004）

紙上発表

1. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R. Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N.　Suppression of basal

autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. ***Nature*** in press (2006)

2. Matsui, M., Yamamoto, A., Kuma, A., Ohsumi, Y., Mizushima, N. Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 339, 485-489 (2006).