



Title	Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy
Author(s)	西田, 友哉
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54120
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	にし た ゆう や 西 田 友 哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 23610号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予環境医学専攻
学位論文名	Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy (Atg5/7非依存的なalternative macroautophagyの発見)
論文審査委員	(主査) 教 授 辻本 賀英 (副査) 教 授 岩井 一宏 教 授 原田 彰宏

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕 マクロオートファジーとは、脂質二重膜の隔離膜が細胞内基質を取り囲んでオートファゴソームを形成し、リソソームと融合してオートリソソームとなり内容物を分解するバルクタンパク分解系である。その分子機構に関しては、出芽酵母を用いた系で多数のオートファジー関連遺伝子(Atg)が同定されている。

Atg5, beclin1, Atg7などはオートファジーに必須と考えられており、哺乳類でもノックアウトマウスを用いて解析が進められている。これらのマウスでは、恒常的もしくは飢餓誘導のオートファジーの欠損と新生児死亡が報告されているが、発生過程は正常であり、代替的なバルク分解系の存在が示唆される。そこで、主としてAtg5欠損マウス由来の細胞を用い、形態学および生化学的に解析し、新たなバルクタンパク分解系の存在について検討した。

〔 方法ならびに成績 〕 まず、Atg5欠損マウスまたはAtg7欠損マウスおよびその同胞の野生型マウスから作製した胎児由来線維芽細胞(MEF)をDNA傷害誘導薬剤であるエトポシドで刺激し、その形態変化を電子顕微鏡で観察した。その結果、野生型細胞において、オートファジーの誘導がみられただけでなく、これまではオートファジーが誘導されないことが信じられてきたAtg5欠損(あるいはAtg7欠損)細胞においても、同程度のオートファジー誘導を認めた。また、オートファジーの結果もたらされるタンパク質分解も、Atg5欠損(あるいはAtg7欠損)細胞は野生型細胞と同程度に認められた。これらの結果から、哺乳類マクロオートファジーではAtg5/7依存性のconventional macroautophagyに加え、非依存性のalternative macroautophagyが存在すると考えられた。

これまで、オートファジーの指標として、LC3タンパク質の修飾や局在変化が適切であると認識されてきたが、Atg5/Atg7に依存しないalternative macroautophagyの際には、これらの変化は生じなかった。Alternative macroautophagyの誘導に関わる分子を、マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化から検討したところ、酵母のオートファジー関連分子であるUlk1の発現上昇を認めた。さらに、Ulk1やその複合体構成分子であるFip200の発現量をsiRNAを用いて抑制したところ、エトポシドによるalternative macroautophagyの誘導は緩和された。さらに、既知のオートファジー関連分子の関与を調べたところ、Beclin1やVps34を構成因子に持つPI3K複合体の関与を見出した。

さらに電子顕微鏡像を詳細に観察したところ、① alternative macroautophagy小胞がゴル

ジ近傍に存在し、そこから伸長する隔離膜が見られること、②隔離膜の融合にトランスゴルジまたはエンドソームが寄与していること、見出した。実際に、トランスゴルジもしくは後期エンドソームのマーカー蛋白質や後期エンドソームの輸送を担当するRab9は、alternative autophagy誘導下でオートリソソームに局在していた。さらに、後期エンドソームの輸送を担当するRab9のsiRNAによりalternative macroautophagyは抑制され、隔離膜の蓄積が観察された。以上より、alternative macroautophagyは、Rab9依存性に隔離膜がトランスゴルジまたは後期エンドソーム由来の小胞と融合して形成されることが明らかとなった。

最後に、Atg5 欠損マウス胎仔におけるalternative macroautophagyの存在を検討したところ、心臓、脳、肝臓など各臓器においてalternative macroautophagyが観察された。また、胎児造血における赤血球の最終分化の過程において、ミトコンドリアの消化に貢献していることが明らかとなった。

[総括] 哺乳類のマクロオートファジーにはAtg5/7依存性のconventional macroautophagyと非依存性のalternative macroautophagyの少なくとも2種類が存在することを発見した。

論文審査の結果の要旨

マクロオートファジーとは、脂質二重膜のオートファゴソームが細胞内基質を取り囲んだ後リソソームと融合してオートリソソームを形成し、内容物を分解するバルク分解系である。これまで、オートファジー関連遺伝子のAtg5やAtg7は哺乳類マクロオートファジーに必須と考えられていた。しかし我々は、Atg5やAtg7を欠損したマウスの細胞においてもマクロオートファジーが起こることを発見し、これをalternative macroautophagyと命名した。Alternative macroautophagyは、LC3の修飾は伴わず、一方でUlk1やBeclin 1などのオートファジー関連タンパク質や、Rab9によって制御されていた。生体内においてもalternative macroautophagyが観察され、特に赤血球成熟に関与することを明らかにした。

これらの知見は哺乳類オートファジーにおける新機構の存在を初めて証明したものであり、学位に値するものと認める。