

氏名	河合 昭典
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第928号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	動物細胞におけるマクロオートファジーによるミトコンドリア分解に関する検討
論文審査委員(主査)	中村 暢宏(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副主査)	松永 司(自然科学研究科・教授), 山下 克美(自然科学研究科・助教授), 中西 義信(医学系研究科・教授), 平山 明子(医学系研究科・講師)

We developed a quantitative method for analyzing the induction of autophagy using a CHO-K1 cell line stably expressing a green fluorescent protein (GFP) in mitochondrial matrix (mtGFP-CHO). When mtGFP-CHO cells were incubated with a medium depleted of amino acids and serum, the GFP fluorescence was decreased concomitant with degradation of the protein. Biochemical and morphological analyses strongly suggested the degradation of mtGFP was mediated by bulk and non-selective degradation of mitochondria by autophagy. Quantitative measurement of the mtGFP degradation was performed by measuring the GFP fluorescence and DNA content by a fluorometric method and calculating the relative GFP intensity of DNA content, which approximated mean GFP fluorescence per cell. Using this method, we showed for the first time that different inducers, such as amino acids and serum starvation or rapamycin treatment, promote autophagy with different kinetics. This method is easy, relatively quick and may be easily adapted to high throughput screening for novel drugs that enhance or inhibit autophagy and also for genes that regulate or modulate autophagy.

オートファジーとは、細胞が飢餓などの刺激を受けると、ある膜が細胞構成物質や老廃物などを主に非特異的に囲い込み、更にリソソームと融合することによって加水分解酵素のはたらきで内容物を分解する機構のことである。動物細胞においては、膜が囲い込んだ状態をオートファゴソーム、その後リソソームと融合した状態をオートリソソームとよんでいる (Fig. 1)。飢餓で誘導されるオートファジーは、主に“生きるためのアミノ酸プールの確保”にとって重要であるといわれている。一方、オートファジーは細胞に侵入した病原性微生物

物の除去に関わっていること、ウイルスタンパク質によって誘導されること等が近年明らかになり、宿主防御との関わりが強く示唆されてきている。

オートファジーによって、細胞がオルガネラをも分解する現象は、従来から電子顕微鏡を用いた形態学的な観察で報告されてきた。しかし、その分解速度や、如何に分解されるか、また制御されているかは不明である。これらを検討することにより、オートファジーによるオルガネラ分解の理解を深めたいと考えた。

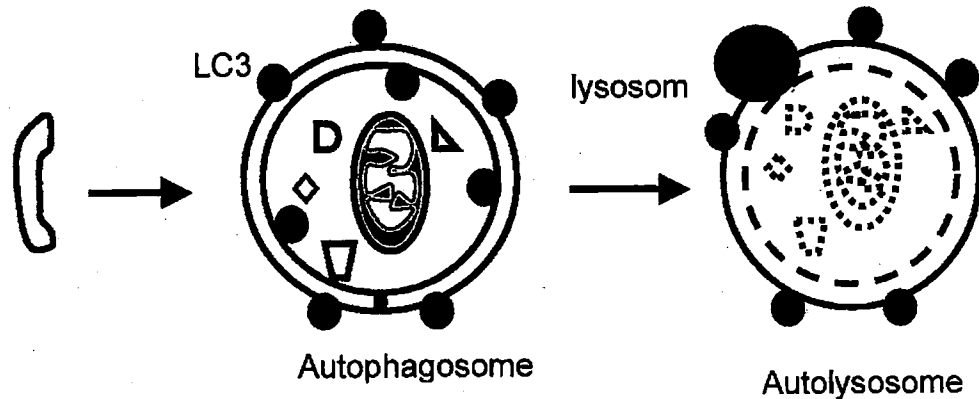


Fig. 1 オートファジー模式図

蛍光を用いたオートファジーによるミトコンドリア分解の検討

オートファジーはオルガネラをも分解することが知られており、特にミトコンドリアがオートファゴソームに囲まれている様子は以前から電子顕微鏡でも鮮明に観察されていたが、その詳細については不明な点が多い。そこで私は、オートファジーによる“ミトコンドリア”分解の検討を行った。ミトコンドリア移行シグナルをもつ GFP (mtGFP) を CHO-K1 細胞で発現させた“mtGFP CHO 細胞”を作製し、この蛍光を飢餓時間依存的に追跡した。

まず、オートファジーによるミトコンドリア分解が起こっているか否かを判断する系を構築した。オートファジーを誘導する飢餓状態では、mtGFP (ミトコンドリア標識) とテキサスレッドデキストラン (リソソーム標識) の共局在が観察できる。この共局在はオートファジー誘導時ではみられるが、阻害すると観察されない。つまりこれはオートファゴソーム内のミトコンドリアとリソソームとの共局在 (オートリソソームの状態) であることが推測でき、オートファジー分解の有無をモニターしていることになる (Fig. 2)。飢餓条件下の mtGFP CHO 細胞においては、この共局在がみられオートファジーによるミトコンドリア分解が起こっていることが確認できた。

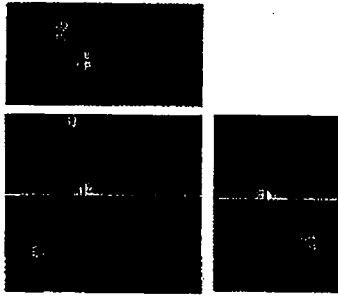


Fig. 2 ミトコンドリアとリソソームの共局在 (3D image)

次に、mtGFP CHO 細胞を用いてオートファジーによるミトコンドリアの分解速度を追跡した。蛍光顕微鏡観察では、飢餓時間依存的 (0-24h) に蛍光の減少が観察できた。この mtGFP の減少を容易に、そして細胞全体の GFP を網羅して正確に定量化するために、飢餓時間依存的に回収した細胞溶解液の蛍光強度測定を行った。単一 DNA 量 (Hoechst33258 染色) あたりの mtGFP の蛍光強度を算出すると、蛍光強度は最初飢餓 3 時間で急激に減少し、その後は飢餓時間依存的に緩やかに減少し、36 時間で約 40% 減少した (Fig. 3)。

さらに、これまでに示した mtGFP の減少がオートファジーによるものか否かを確認した。オートファジー阻害剤を処理した細胞において、同様に蛍光強度測定を行い、mtGFP 蛍光強度の減少を阻害する結果を得た。また、プロテアソーム系を阻害しても mtGFP 分解速度に変化はなかった。このことから、蛍光強度の減少は飢餓条件下で誘導されるオートファジーによるミトコンドリア分解をモニターしていることが示された。

マクロオートファジーによってミトコンドリアが選択的に分解されることを示すいくつかの報告がある。これは、最近一般的にミトファジーと呼ばれるようになった。しかし、それらは主に損傷ミトコンドリアが選択的に分解されることを報告している。そこで、mtGFP CHO 細胞で示されたアミノ酸血清欠如培地で誘導されるマクロオートファジーの分解速度が、ミトコンドリアの選択性を反映したミトコンドリア特異的な分解速度なのか、それとも古典的な非選択的なバルク分解系による分解を反映しているのか否かを調べた。そのため、GFP をトランスフェクトした CHO K1 細胞 (GFP CHO 細胞) を作製した。この細胞は細胞質で GFP を発現する。GFP CHO 細胞を、アミノ酸血清欠如培地で培養し、栄養飢餓時間依存的に回収し、蛍光強度を測定した。その結果、GFP は mtGFP 同様の分解プロファイルだった。つまり、アミノ酸血清飢餓条件下で誘導される mtGFP 分解速度は、ミトコンドリア分解の選択性とは無関係であり、バルク分解を反映していることが示唆された。また、栄養飢餓で誘導されるマクロオートファジーには分解速度に大きく影響を与えるようなミトコンドリア分解の選択性はない可能性が示唆された。

この mtGFP を用いたオートファジーによるミトコンドリア分解測定法は、比

較的簡便でありキネティクス分析に適しているといえる。そこで、マクロオートファジーの誘導方法が分解速度に如何に関わるかを調べた。これまでに用いてきたアミノ酸と血清を欠如した培地に加え、アミノ酸のみ欠如した培地と血清のみ欠如した培地を作製し、mtGFP CHO 細胞に処理した。また、一方で飢餓培地処理以外のオートファジー誘導方法として mTOR 阻害剤であるラパマイシンを処理した。これらの条件はそれぞれ異なるシグナル経路を刺激してオートファジーを誘導する可能性が示唆されている。各々の条件で処理した細胞を時間依存的に回収し、mtGFP 蛍光強度測定を行い比較した。その結果、アミノ酸血清飢餓条件下においては 3 時間で急激にミトコンドリア分解が促進したのに対し、アミノ酸のみ欠如、血清のみ欠如した飢餓条件下においては、飢餓初期に急激な分解の促進は起こらなかった。ラパマイシン処理についてはさらに分解速度が遅く、12 時間後に蛍光強度の減少が確認できた。つまり、培地のアミノ酸と血清の欠如後 3 時間で起こる、マクロオートファジーによるミトコンドリア分解速度の促進には、オートファジー誘導経路の違いが関わっていたことがわかった。

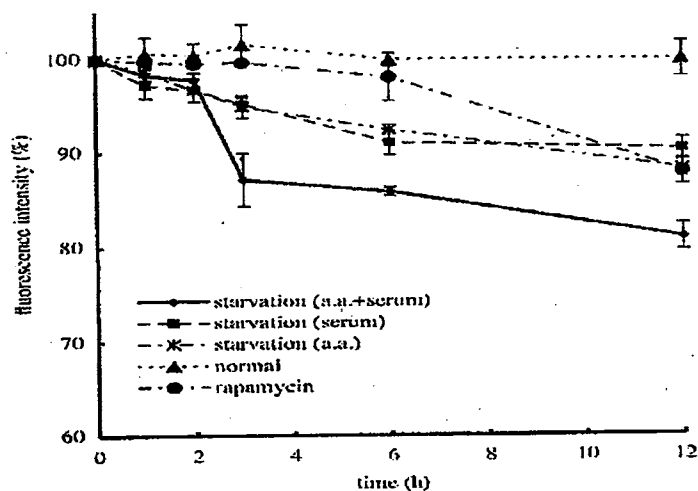


Fig. 3 オートファジーの誘導条件による分解速度の違い

さらに、オートファゴソームマーカーとして一般的に用いられている“LC3”を各誘導条件下で時間依存的に検出することで、分解量とオートファゴソーム形成量との関係を検討した (Fig. 1)。その結果、この誘導条件の違いは autophagic オートファゴソーム量にも影響を与えた。これは、細胞外の栄養状況がオートファゴソーム量に影響を与え、分解速度にも反映されることを意味している。

本研究において、栄養飢餓下でのミトコンドリア分解を追跡する事で、マクロオートファジー分解速度を特異的に調べる系を確立した。さらにこのアッセ

イによって、培地の主要成分であるアミノ酸と血清を共に欠如すると、飢餓3時間以内に急激なマクロオートファジー分解が起こる事を示した。

細胞が培地の主要成分であるアミノ酸と血清を除去されて、外部からの栄養供給が困難になると、より早急にエネルギーを獲得しなければならない。我々はこのような条件下においては、早期に多くのオートファゴソームが誘導され、マクロオートファジーの分解速度が促進する事を示した。

学位論文審査結果の要旨

提出された学位論文について、審査委員による査読の後、平成19年2月7日に口頭発表会が行われた。同日開催の審査委員会の結果、以下のとおり判定された。

本論文に記載された研究は、マクロオートファジーによるミトコンドリア分解の速度に関する検討を行ったものである。マクロオートファジーについては近年多数の関連遺伝子が単離、解析され、オートファゴソーム形成に関わる遺伝子があきらかになることで、その誘導に関する研究は急速に進展してきた。一方で、オートファジー後半のリソソームによる分解段階については、その分解速度、調節機構等いまだ不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアを蛍光標識した mtGFP-CHO 細胞を用いて栄養飢餓で誘導されるミトコンドリア分解を定量的に解析することにより、マクロオートファジーの分解速度を測定する系を確立した。さらに、培地の主要成分であるアミノ酸及び血清を共に欠如し、外部からの栄養供給が困難になり、細胞がより早急にエネルギーを獲得する必要にせまられると、早期に多くのオートファゴソームが誘導され、マクロオートファジーの分解速度が促進する事が明らかとなった。

以上のように、本研究はマクロオートファジー分解に関する新たな知見を示したものであり、博士(薬学)の学位に値すると判定された。