

氏 名 松井 誠

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 962 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Studies on autophagy during the embryonic and early
neonatal periods.

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 大隅 良典
助教授 渡辺 英治
室長 水島 昇（東京都臨床医学総
合研究所）

論文内容の要旨

Studies on autophagy during the embryonic and early neonatal periods.

Autophagy is a non-selective degradation process in which long-lived proteins and organelles are sequestered within double-membrane vesicles, termed autophagosomes that deliver the contents to the lysosome/vacuole for degradation. The lysosome/vacuole is an acidic compartment that contains various hydrolytic enzymes. Autophagy is fundamental and evolutionarily conserved function in eukaryotes. More than 20 genes, which are essential for autophagy (*ATG* genes; AuTophaGy), have been identified by genetic screens in yeast, and most of the *ATG* genes are conserved in higher eukaryotes.

The major function of autophagy is response to starvation. For example, autophagy is suppressed to undetectable levels under nutrient rich conditions in yeast, but it is rapidly induced under nutrient starvation conditions. In autophagy deficient mutants of yeast, the survival rate decreases under starvation conditions. Similarly, autophagy also plays a response to starvation in mammals. Autophagy is induced in many tissues in response to food withdrawal in adult mice. Autophagy-defective mutant mice, *Atg5*^{-/-} mice, appear almost normal at birth, but most of the *Atg5*^{-/-} neonates died within 1 day of delivery. He thought that phenotype of *Atg5*^{-/-} mice is related to nutrient starvation. However, the kinetics of autophagy is unclear in wild-type embryos and neonates. In this study, to study the significance of mammalian autophagy *in vivo*, He observed occurrence of autophagy in embryos and neonates using transgenic mouse model in which autophagosomes are labelled with GFP-LC3.

He observed that autophagy remained at low levels throughout the embryonic period. Formation of autophagosomes was extensively induced in various tissues after a natural birth and is maintained at high levels for 3-12 h after birth. The number of autophagosomes gradually decreased to basal levels by day one or two. Soon after birth, mammals face with the first, and probably the most severe, starvation during their lifespan, because trans-placental nutrients supply is suddenly terminated. These results suggest that induction of autophagy is important for survival during neonatal starvation.

In mammalian embryos are under the nutrient rich conditions. However, he observed that low levels of autophagy occur constantly at embryonic period. It is unclear that basal autophagy plays important role during mouse embryogenesis. In this study, he examined the role of basal autophagy using autophagy indicator mice

and autophagy deficient mice. In histological examination of *Atg5*^{-/-} neonates, he detected ubiquitin-positive aggregates (inclusion bodies; IBs) only in a few tissues, including neural cells, hepatocytes, and anterior pituitary gland cells. These results suggest that function of autophagy is not only as maintenance of viability during starvation, but also as an intracellular quality control system. Recently, a similar observation was reported in the hepatocytes of liver-specific conditional *Atg7*^{-/-} mice. He demonstrated that time from the liver genesis to the birth is sufficient to generate large IBs in hepatocytes. In addition, he revealed that protein quality control is highly dependent on basal levels of autophagy in hepatocytes, neural cells and anterior pituitary cells.

Autophagy can degrade not only proteins but also intracellular organelles such as mitochondria, peroxisomes and endoplasmic reticulum. Dramatic degradation of organelles is observed in the processes of lens organelle free zone (OFZ) formation. The mechanism by which these organelles are destroyed during this process is not fully understood. It is suggested that autophagy is involved in lens organelle degradation. However, organelle degradation during the differentiation of lens occurred normally in *Atg5*^{-/-} mice. Therefore, autophagy is dispensable for OFZ formation in lens epithelial cells.

In this study, he showed significance of basal- and induced-autophagy during embryogenesis and neonatal starvation. These findings of *in vivo* analyses will help to understand physiological significance of autophagy in mammals.

論文の審査結果の要旨

申請者は胎児期及び新生児期におけるオートファジーの解析を行った。

オートファジーはすべての真核生物が有している細胞内分解系であり、この系によって自身の細胞質タンパク質やオルガネラがリソソームで分解される。本研究論文では、マウス胎生期および新生児期におけるオートファジーの活性評価と、オートファジー不能変異マウス (Atg5 ノックアウトマウス) を用いた胎生期における恒常的オートファジーの意義の解析がなされている。胎生期の各組織でのオートファジー活性は非常に低いものの、出生後 30 分以内にオートファジーが誘導されはじめ、生後 3-6 時間には心筋をはじめとする多くの組織でオートファジー活性は著明に亢進することが明らかとなった。生後 1-2 日の間にオートファジー活性は再び基底レベルにまで低下する。これまでに、新生児は胎盤を介する栄養の突然の遮断による生理的な飢餓状態にあることが知られているが、この研究成果によって、哺乳類は糖や脂質の蓄積の利用とともに、オートファジーによる自己タンパク質分解をも動員してこの特殊な飢餓に適応していることが示唆された。実際、この成果はオートファジー不能マウスが生後 1 日以内に死亡し、その際、体内の遊離アミノ酸やエネルギーレベルが低下しているという事実と合致する。

一方、胎生期のオートファジーは著しく誘導されてはいないものの、ある一定のレベルで恒常的に起こっていることが確認された。さらに Atg5 ノックアウトマウス新生児の解析の過程で、肝や神経系の細胞内に、変性タンパク質の指標であるユビキチン陽性の封入体が多数蓄積していることが発見された。このことは基底レベルの恒常的オートファジーが細胞内品質管理機構として重要であることを示している。なぜ、肝や神経系などの特定の組織のみで封入体蓄積をきたすかは非常に興味深い問題ではあるが、解明には至っていない。また、オートファジーは細胞内の可溶性タンパク質のみでなく、オルガネラをも分解する系である。これまで発生過程におけるオートファジーの役割として示唆されてきたもののひとつに、水晶体の透明化がある。水晶体中心部の繊維細胞では発生後期にオルガネラが急速に消失することが知られている。実際、本論文でもその箇所においてオートファジーがおこなわれていることが示された。しかし、Atg5 ノックアウトマウスにおいても水晶体のオルガネラ除去が正常に進行することから、この過程においてオートファジーは必須ではないと結論された。

本研究は新生児期というユニークな局面でのオートファジーの新しい機能を示すとともに、従来は飢餓適応システムとして主に理解されてきたオートファジーがもつ恒常的役割の一端を明らかにした点において高く評価される。以上の成果は博士論文に値するものと審査委員全員一致で判断された。