

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 AILEEN BAHALLA ANGCAJAS
 学位 博士 (学 術)
 学位記番号 新大院博 (学) 第 202 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 The Involvement of Reactive Oxygen Species in Autophagy Regulation by Amino Acids
 (アミノ酸によるオートファジー調節における活性酸素種の関与)

論文審査委員 主査 教授・門脇 基二
 副査 教授・大坪 研一
 副査 准教授・西海 理之
 副査 准教授・藤村 忍
 副査 准教授・原 崇

博士論文の要旨

オートファジーは細胞成分の分解を通じての自己再構成システムであり、その制御は大変速やかでダイナミックである。アミノ酸を始めとする栄養素がその生理的調節因子として重要であり、そのシグナリング機構の解明が望まれている。近年、それらシグナリング分子の候補として、絶食によるオートファジー促進の際に活性酸素種 (ROS) の産生の関与が発見され、従って、その絶食応答を抑制するアミノ酸の作用機構もその ROS との関係で説明できるか否かについて、研究を行った。

まず、採用したラットヘパトーマ H-4-II-E 細胞において、細胞内 ROS の検出を検討した。蛍光色素 DCFDA の負荷により、細胞内での ROS (主に H₂O₂) を検出する実験系を確立した。細胞を富栄養培地 DMEM と栄養飢餓培地 EBSS で培養し、絶食(栄養飢餓)の条件でのオートファジー速度 (LC3-IIs/LC3-I 比法) を測定し、完全アミノ酸混合、調節アミノ酸混合、非調節アミノ酸混合の 3 種類でオートファジーの応答と、細胞内 ROS の応答を比較した。その結果、ほぼ両者の応答は大まかに一致し、アミノ酸によるオートファジー抑制は ROS の抑制によるものと推定された。

ただ、そのときの結果に不十分な点があったために、改めて個別のアミノ酸での応答を正確に比較検討することとし、全アミノ酸についてそれらの作用様式を調べた。その結果、意外にも、ロイシンなどはオートファジーの抑制と ROS の抑制が一致したが、メチオニンやプロリン、アルギニンなどはオートファジーの抑制に対し ROS 産生が促進され、正反対の動きとなり、明らかにアミノ酸によるオートファジー抑制作用が ROS 産生の抑制に起因するのみではないことが証明された。

また、アミノ酸のシグナリング経路として、現在最も主流的な考え方は mTORC1 経路である事が定説となっているので、その点についての可能性を特異的阻害剤である Rapamycin を用いて検討したところ、全アミノ酸混合やロイシンの場合は、Rapamycin

感受性であるが、アルギニンなどの場合に Rapamycin 抵抗性であることが判明した。従ってアミノ酸のシグナリング経路は一通りではなく、アミノ酸の種類によって複数の経路が存在する事が証明された。また、このアルギニンのシグナリング経路として、阻害剤 aminoguanidine や L-NMMA, また NO ドナーである SMAP などによる実験から、いわゆる NO 経路であることが推定された。

このように、アミノ酸のシグナリング経路は ROS を介するものも示されたが、単一なものではなく、アミノ酸の種類によって複数の経路が存在する事が証明された。

審査結果の要旨

高齢社会に突入した我が国においては、「健やかに老いる」ということが最も期待され、そのためには食事による QOL のコントロールが最も効果的と考えられている。老化、特に細胞の老化には数多くの因子が関与しているが、中でも細胞内の自己再構成システム、ターンオーバーを担うオートファジーが重要な機能として注目を集め始めている。そこで、本論文は食事成分や栄養素によるオートファジーの調節の詳細について、注意深く検討を行った。特に、歴史的にも最もオートファジーの栄養性調節因子としてアミノ酸が有名であるが、その調節機構の詳細は未だ十分な解明がなされていない。そこで、今回の学位申請者 Aileen B. Angcajas は、新たなアプローチとして、栄養飢餓によるオートファジー調節で発見されてきた活性酸素種 (ROS) が、アミノ酸によるオートファジー抑制の際にも主要なシグナリング分子として介在するか否かを詳細に検討した。その結果、アミノ酸は多様であり、その種類によって、複数の経路を辿る事を明快に証明した。

本論文の知見は、オートファジー分野における栄養性調節論において新しい知見をもたらしたものであり、その内容は国際雑誌 (BBRC) への掲載が決定し、価値のある論文と評価される。以上の結論より、本論文は博士 (学術) の学位論文として十分であると認定するものである。