

# 運動による脂肪組織の恒常性維持に対する オートファジーの役割

名古屋市立大学大学院 奥津光晴

## Exercise Training Regulates Adipose Tissue Homeostasis by Autophagy

by

Mitsuharu Okutsu  
*Graduate School of Natural Sciences,  
Nagoya City University*

### ABSTRACT

Animal studies have shown that regular exercise prevents high-fat diet-induced obese. Autophagy has been functionally linked to adipogenesis, obesity and type II diabetes. Here, we determined if regular exercise-induced autophagy activation is sufficient to mitigate high-fat diet-induced obese. Male C57BL/6J mice were randomly assigned into 4 groups: Sedentary normal chow (Sed-NC), Sedentary high-fat diet (Sed-HF), Exercise normal chow (Ex-NC) and Exercise high-fat diet (Ex-HF). Mice in exercise group were performed voluntary wheel-running exercise for 8 weeks. Mice in high-fat diet group were fed 45% high-fat diet for 8 weeks. After exercise training periods, epididymal white adipose tissue was harvested and analyzed autophagy proteins by western blot. We showed that 8 weeks regular exercise prevented high-fat diet-induced obese, inhibited adipocyte hypertrophy and improved glucose tolerance. Autophagy flux (i.e., LC3-II protein) in Sed-HF mice was greater than Ex-NC and Ex-HF mice. These results suggest that exercise training may regulate adipose tissue homeostasis by autophagy.

## 要 旨

定期的な運動は肥満を軽減し生活習慣病を予防する。オートファジーは、不要なタンパクや悪化した細胞内器官を素早く分解することで生体の恒常性を維持している。本研究では、運動による肥満の軽減とオートファジーの変動との関連を検討した。実験には C57BL/6J マウスを使用した。マウスは、安静 + 通常食摂取群、運動 + 通常食摂取群、安静 + 高脂肪食摂取群、運動 + 高脂肪食摂取群の4群に分け、運動群は8週間の運動トレーニングを行い、高脂肪食摂取群は45%の脂肪を含有する餌を摂取した。飼育期間終了後、精巣周囲脂肪を採取しオートファジータンパクの変動を評価した。その結果、高脂肪食摂取による体重の増加や脂肪細胞の肥大は運動により改善された。オートファジータンパクである LC3-II の発現は高脂肪食摂取により増加するが、運動は高脂肪食摂取による LC3-II の増加を抑制した。これらの結果は、定期的な運動によるオートファジーの抑制が脂肪組織の恒常性維持に関与する可能性を示唆している。

## 緒 言

運動不足や高脂肪食摂取による肥満は、糖尿病、高血圧や脂質異常症などの生活習慣病を発症することから、肥満の予防や軽減は健康寿命の延伸や医療費削減の観点から重要な課題である。肥満による生活習慣病の発症は、肥大した脂肪細胞の炎症性サイトカインや遊離脂肪酸の産生の増大によるインスリン抵抗性の惹起が要因であることから、肥満の軽減には肥大した脂肪細胞の効率的な排除と前駆脂肪細胞からの速やかな小型脂肪細胞への分化による脂肪組織の恒常性維持が必要不可欠である。定期的な運動は肥満を改善し生活習慣病を予防することが近年の運動介入研究や大規模疫学調査より立証されている。しかしながら、運

動が肥満の改善と脂肪組織の恒常性を維持する分子メカニズムを解明し、効果的な運動プログラムの開発やスポーツ科学への応用を試みた研究は少ない。

生体の恒常性維持には、生体の構成に必須なタンパクの合成と不要なタンパクの分解が必要である。不要なタンパクを分解するメカニズムはいくつか報告されており、オートファジーはその主要な経路の一つである<sup>1)</sup>。オートファジーは異なる役割を持つ複数のオートファジータンパクが協調的に働くことで機能する。一般的なオートファジーの機序は、LC3 と呼ばれるタンパクの増加から開始する。増加した LC3 はオートファジータンパクである Atg4 により切断され LC3-I に変換される。変換された LC3-I は Atg7 や Atg3 により隔離膜と呼ばれる器官に運搬され結合し、LC3-II に変換される。LC3-II が結合する隔離膜は Atg5 や Atg12 などにより伸長し、オートファゴソームと呼ばれる不要なタンパクを包み込んだ袋状の器官を形成する。さらに、オートファゴソームはリソソームと呼ばれるタンパク分解酵素を含んだ器官と結合し、オートファゴソーム内のタンパクを分解する。オートファジータンパクを全身で欠損したマウスは出生後の生存期間が極端に短いことや、オートファジータンパクを骨格筋特異的に欠損したマウスは野生型マウスに比べ骨格筋の量や機能が低下することから、オートファジーは生体の恒常性維持に重要である<sup>2-5)</sup>。近年、運動は骨格筋や脳などのオートファジーを変動することが報告されており、この変動が運動による身体適応と健康の獲得に重要な役割を果たすと考えられている<sup>6-10)</sup>。しかしながら、高脂肪食摂取に対する運動の肥満改善効果と脂肪細胞のオートファジーとの関連を検討した報告はない。

本研究では、高脂肪摂取による肥満の悪化、定期的な運動による肥満の改善と脂肪組織のオートファジーの変動との関連を検討し、運動による正

常な脂肪組織の構築に対するオートファジーの役割を解明することを目的とした。

## 1. 実験方法

### 1. 1 実験動物

実験には8週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本クレア社）を用いた。マウスは名古屋市立大学医学研究科実験動物研究教育センター（室温 23℃、湿度 50%，午前 8 時から午後 8 時までを明期）にて飼育した。購入後、飼育環境に順応させるため、実験は 1 週間の予備飼育後に開始した。全ての動物実験は、名古屋市立大学医学研究科動物実験委員会の承認を得た後に開始した。

### 1. 2 飼育条件

マウスは、体重が均等になるよう安静 + 通常食摂取群、運動 + 通常食摂取群、安静 + 高脂肪食摂取群および運動 + 高脂肪食摂取群の 4 群に分け 8 週間飼育した。運動はワイヤレス運動量測定装置（Med associate 社）を用いた自発走行運動を使用し、マウスの走行距離と走行動態を 24 時間計測した。高脂肪食は 45% の脂肪を含んだ脂肪食（D12451, Research Diets 社）を自由摂取させた。全てのマウスの体重と摂餌量は毎週計測し、正常な走行距離、摂餌量と体重増加したマウスを実験に使用した。

### 1. 3 検体採取

解剖は運動期間最終日の一過性の運動の効果を取り除くため、8 週間の飼育期間終了 24 時間後に行った。マウスを麻酔下で頸椎脱臼し安楽死させた後、精巣周囲脂肪、腓腹筋および足底筋を採取した。採取した脂肪組織と腓腹筋は採取直後に重量を微量重量計で素早く計測した。重量測定後、脂肪組織は組織染色とウェスタンブロットに使用した。組織染色用の検体は 4% パラフォルムアルデヒド溶液に浸水後、パラフィンに包埋し脂肪細

胞の大きさの評価に使用した。ウェスタンブロット用の検体は液体窒素にて急速冷凍後、ウェスタンブロット用の溶液に懸濁しオートファジータンパクの変動の評価に使用した。足底筋は解剖直後に液体窒素にて急速冷凍後、ウェスタンブロット用の溶液に懸濁し運動により変動するタンパクの検証に使用した。

### 1. 4 グルコース負荷試験

高脂肪食摂取による耐糖能異常と運動による改善を観察するためにグルコース負荷試験を行った。6 時間の絶食後に尻尾から微量の血液を採取し血糖値測定機器（Roche 社）にてグルコース投与前の血糖値を測定した。グルコース投与前の血糖値を測定後、体重 1kg あたり 1.5mg のグルコースを腹腔注射し、投与後 15 分、30 分、60 分および 120 分に測定した。

### 1. 5 運動トレーニング効果の評価

本研究で使用した運動プログラムの適正を生化学的に立証するため、運動により変動する骨格筋のタンパクの発現を評価した。評価には足底筋を用い、タンパクの測定にはウェスタンブロットを使用した。方法は、ウェスタンブロット用の溶液に懸濁した検体のタンパク濃度を測定後、ポリアクリルアミドゲルを作成し泳動することでタンパクを分離した。タンパク濃度は Lowry 法にて測定した。ポリアクリルアミドゲルは標的とするタンパクの分子量に合わせ、8% と 15% のゲルを作成した。作成したゲルに 40 μg のタンパクをロードしタンパクが十分に分離されるまで泳動した。泳動後 PVDF メンブレンに転写し、ponceau 染色にて転写が正常に行われたことを確認した。確認後、メンブレンを 5% スキムミルクを含む PBST にてブロッキングした後、評価するタンパクを認識する一次抗体を反応させた。一次抗体は、Myosin heavy chain (MHC) IIa (SC-

71), MHCIIb (BF-F3), Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) (Millipore 社) および manganese super oxide dismutase (MnSOD) (abcam 社) を使用した。また, 内因性コントロールとして  $\beta$  actin (Cell Signaling Technology 社) を使用した。一次抗体と反応後, それぞれの一次抗体に対応した horseradish peroxidase 標識の二次抗体とメンブレンを反応させ化学発光検出試薬にて発色しイメージアナライザ (ImageQuant LAS 500, GE) で観察した。

### 1. 6 組織学的評価

4% パラフォルムアルデヒド溶液に浸水した脂肪組織をパラフィンに包埋し薄切した。薄切した検体はキシレンにてパラフィンを取り除いた後, ヘマトキシリンとエオジンにて細胞核と細胞質を染色した (H&E 染色)。染色した組織は顕微鏡下で観察後に撮影し保存した。

### 1. 7 オートファジーの評価

脂肪組織のオートファジーの変動の評価にはウェスタンブロットを使用した。方法は, 運動効果の評価に記載したウェスタンブロットと同様の方法を用いた。一次抗体は, LC3 (Cell Signaling

Technology 社), Atg7 (Cell Signaling Technology 社) および p62 (Sigma 社) を使用し, 内因性コントロールとして  $\beta$  actin を使用した。

## 1. 8 統計解析

各項目の測定結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表した。通常食群と高脂肪食摂取群の走行距離の比較は対応のない T 検定を使用し, その他の測定結果の比較は二次元配置分散分析を使用した。有意水準は  $p < 0.05$  を有意とした。

## 2. 実験結果

### 2. 1 体重, 摂餌量および自発運動走行距離

体重は, 全ての群で週齢に依存し増加したが, この増加は高脂肪食摂取群の方が通常食摂取群に比べ有意に高く, 高脂肪食摂取による体重の増加は運動により有意に抑制された (図 1A)。摂餌量は運動群の方が安静群に比べ有意に多かった (図 1B)。脂肪組織の重量は高脂肪食摂取により増加したが, この増加は運動により抑制された (図 1C)。腓腹筋の重量に違いは観察されなかった (図 1D)。自発運動は高脂肪食摂取群と通常食摂取群ともに暗期に走行し明期に休息する正常な活動状態を示しており, 走行距離は両群間に有意差はなかった (図 2A)。

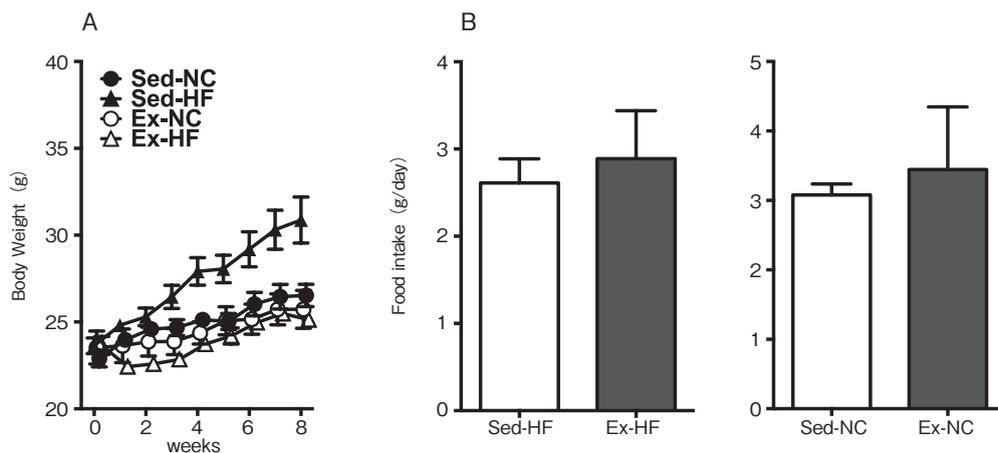


図 1A, B マウスの体重, 摂餌量, 脂肪組織重量および腓腹筋重量の比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群, Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

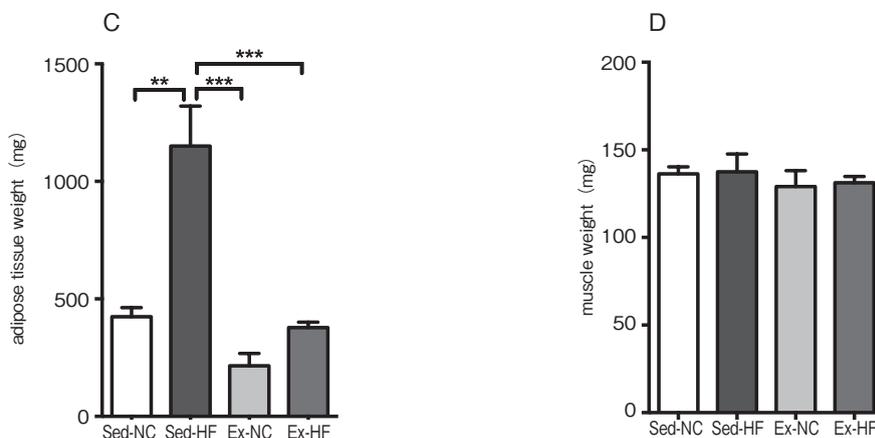


図1C, D マウスの体重, 摂餌量, 脂肪組織重量および腓腹筋重量の比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群, Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群. \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001

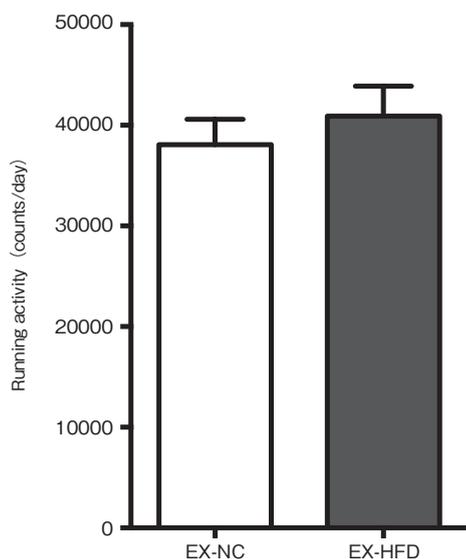


図2 マウスの走行活動の比較  
Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HFD: 運動高脂肪食群

## 2. 2 グルコース負荷試験

高脂肪食摂取による耐糖能異常と運動による改善を観察するためにグルコース負荷試験を行った。その結果、グルコース投与はすべての群の血糖値を上昇させるが、その増加は高脂肪食摂取群が通常食摂取群よりも有意に高く、投与120分後も血糖値が高値を示した(図3A)。また運動は高脂肪食摂取による血糖値の上昇を抑制し、通常食摂取群とほぼ同様の変動を示した(図3B)。

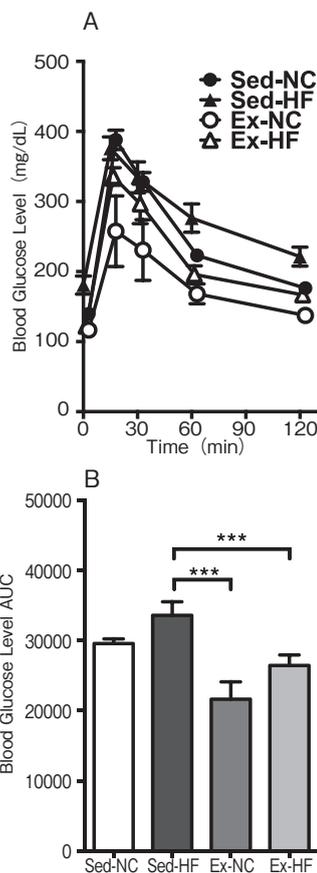


図3 グルコース負荷試験の比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群,  
Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群. \*\*\*: p<0.001

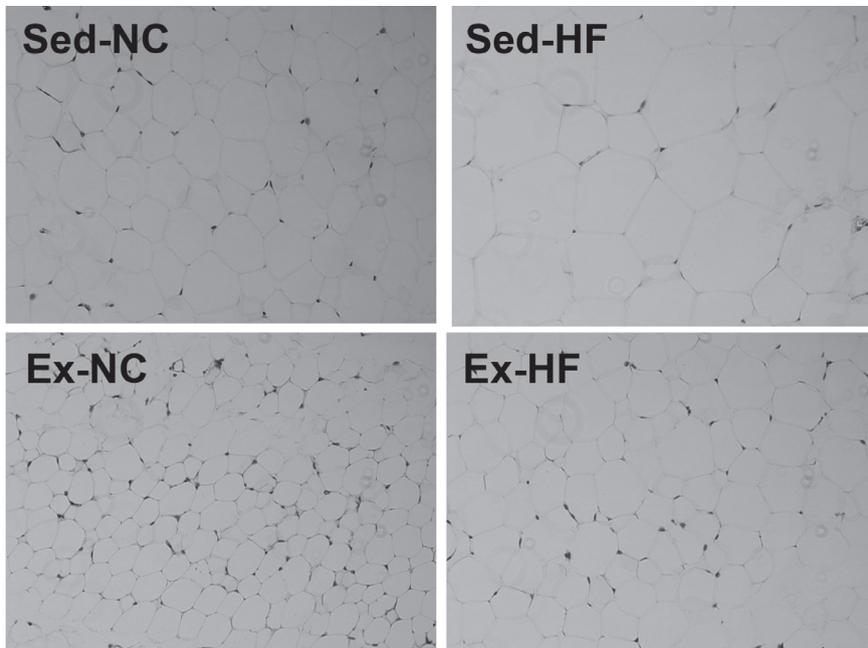


図4 脂肪細胞の大きさの比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群, Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群

### 2. 3 運動トレーニングの評価

本研究で使用した自発走行運動モデルが適切な運動モデルであることを確認するため、運動により変動することが知られている骨格筋のタンパクの発現を評価した。その結果、先行研究と同様、運動群の MHCIIa, PGC-1 $\alpha$  および MnSOD の発現は安静群に比べて高く、MHCIIb の発現は安静群と比べて低かった (図 4)。

### 2. 4 組織学的変化

高脂肪食摂取や運動による脂肪細胞の形態学的な変化を観察するため、脂肪細胞の大きさを評価した。その結果、高脂肪食摂取群の脂肪細胞は通常食摂取群の脂肪細胞に比べ大きく、高脂肪食摂取による脂肪細胞の肥大化は運動により改善された (図 5)。

### 2. 5 オートファジーの評価

脂肪組織のオートファジーの変動を検討するた

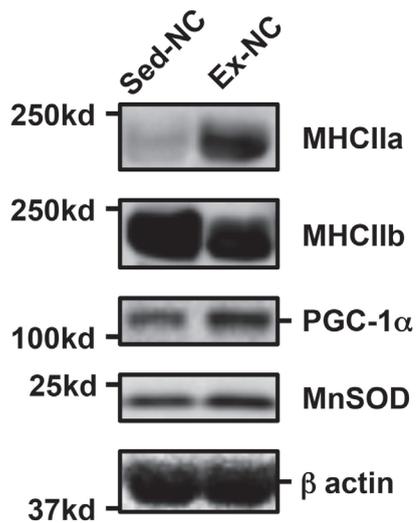


図5 自発運動による骨格筋のタンパクの発現の比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群,  
Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群

め、オートファジータンパクである LC3, Atg7 とオートファジーによる分解の指標となる p62 の発現をウェスタンブロットにて測定し各群で比較した。その結果、高脂肪食摂取群の LC3-II は通

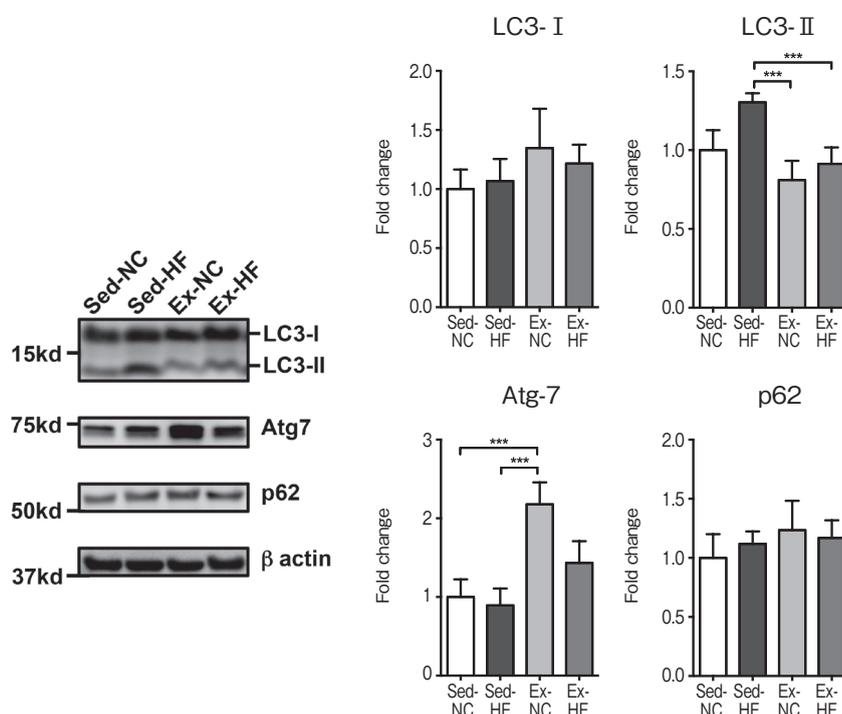


図6 自発運動による脂肪細胞のオートファジータンパクの発現の比較  
Sed-NC: 安静通常食群, Sed-HF: 安静高脂肪食群, Ex-NC: 運動通常食群, Ex-HF: 運動高脂肪食群. \*\*\*:  $p < 0.001$

常食摂取群に比べ有意に高く、この増加は運動により抑制された。Atg7は運動群が安静群に比べ有意に高かった。p62の発現は高脂肪食摂取や運動による違いが観察されなかった(図6)。

### 3. 考察

本研究では、高脂肪食摂取による肥満の悪化、定期的な運動による肥満の改善と脂肪組織のオートファジーの変動との関連を検討し、運動による正常な脂肪組織の構築に対するオートファジーの役割を解明することを目的とした。その結果、マウスの8週間の自発運動は、高脂肪食摂取によるオートファジーの促進を抑制する傾向があることを明らかにした。本研究ではオートファジータンパクの発現を遺伝的に調節したマウスは使用していないため、本研究で得られた結果の因果関係を明らかにすることはできなかった。今後、脂肪組織のオートファジーの変動が正常な脂肪組織の構

築に必要な現象か、あるいは単なる脂肪組織の改善による結果かを科学的に立証する必要がある。

運動によるオートファジーの変動に関する報告は近年増加傾向にあり、骨格筋、心臓、脳などの様々な組織のオートファジーの変動が報告されている<sup>6-10)</sup>。運動によるオートファジーの変動とその生理学的意義について分子生物学的手法を用い科学的に検証した最初の報告は、Levineらのグループが2012年発表した論文であり、運動による骨格筋のグルコース代謝の調節はBCL2を介したオートファジーが必須であることを遺伝子改変動物を用い報告している<sup>6)</sup>。また筆者らは、運動による骨格筋のオートファジーは骨格筋線維タイプにより異なることや、Atg6ヘテロマウスは定期的な運動による毛細血管密度の増加が野生型マウスよりも低く持久的運動能力も向上しないことを報告している<sup>7)</sup>。これらのことは、運動による身体適応にオートファジーの活性化が重要な役割

を果たすことを示唆している。しかしながら、運動による脂肪組織のオートファジーの変動と高脂肪食摂取による肥満の改善との関係に関する報告はされていない。今後、運動による脂肪組織のオートファジーの変動の生理学的意義について詳細に検証する必要がある。

骨格筋に着目した先行研究では、運動は骨格筋のオートファジーを促進し機能や形態を改善することが報告されている<sup>7,8)</sup>。正常な脂肪組織の構築には悪化した脂肪細胞の排除が必要なことから、骨格筋同様、運動は脂肪組織のオートファジーを促進すると推測されるが、推測とは反対に運動はオートファジーを抑制する傾向を示した。申請者らは、オートファジーを抑制する薬剤を投与すると高脂肪食摂取による肥満が軽減されることを報告している<sup>11)</sup>。また、Atg7を脂肪組織特異的に欠損したマウスは、野生型マウスと摂餌量に違いがないにもかかわらず脂肪重量が低く脂肪細胞のサイズも小さい<sup>12)</sup>。これらの結果は、正常な脂肪組織の構築にはオートファジーの促進が必須ではない可能性を示唆している。

近年、定期的な運動が脂肪組織のLC3-IIを増加しオートファジーを促進することが報告された<sup>13)</sup>。本研究では運動はLC3-IIを増加しておらず、この先行研究とは結果が異なる。この先行研究では、実験動物にラットを使用しており運動にはトレッドミルを使用した強制走行運動を用いている。本研究では実験動物にはマウスを使用し、運動にはランニングホイールを用いた自発走行運動を使用した。自発走行運動は一般的にトレッドミル運動に比べ走行距離が長く、C57BL/6Jマウスでは一晩に10km以上走行する場合がある<sup>14)</sup>。これらの結果は、動物種や運動プログラムの違いにより脂肪組織のオートファジーの変動は異なる可能性があることを示唆している。

本研究では、ホモジネイトした脂肪組織を用いオートファジーを評価した。脂肪組織は脂肪細胞

以外にも血管内皮細胞などの異なる複数の細胞により構成されており、高脂肪食摂取した脂肪組織にはマクロファージなどの免疫細胞の浸潤が多く観察される<sup>15)</sup>。したがって、本研究で観察されたオートファジーの変化は脂肪組織内の血管内皮細胞や免疫細胞の変動を反映した結果である可能性も否定できない。今後、脂肪組織から単離した脂肪細胞によるウェスタンブロットや免疫組織化学染色を用い、運動によるオートファジーの変動が脂肪組織のどこで起きたかを詳細に検討する必要がある。

オートファジーは、オートファジータンパクが協調的に機能しタンパクを分解するプロセスのことである。本研究ではLC3、Atg7やp62のタンパクの発現からオートファジーの変動を評価した。LC3-IIはオートファゴソームの数と相関があることからオートファジーの活性化を評価する指標の一つであるが、オートファジーによるタンパク分解のプロセスの活性化の評価はこれだけでは不十分である。また、p62はオートファゴソームで選択的に分解されることからオートファジーの活性化の指標として用いられるが、p62の発現は様々な刺激により変動することや、長期間の環境変化に対する検討を行う場合は適切な指標ではない可能性も報告されている<sup>16)</sup>。近年、オートファジーを正確に評価する様々な方法が確立されつつある。これらの手法を*in vivo*と*in vitro*の実験に応用し運動によるオートファジーの変動を正確に評価することが今後の課題である。

#### 4. 結 論

8週間の自発運動トレーニングによる肥満の軽減には、運動による脂肪組織のオートファジーの調節が関与する可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究の遂行に対し多大な助成を賜りました

公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。MHCIIa および MHCIIb 抗体を供与いただきました東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センターの秋本崇之先生に深くお礼申し上げます。また研究の実施にご協力いただきました名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科の宇土泰希氏と外蘭千紘氏に心よりお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) 水島 昇, 吉森 保.: オートファジー 生命をささえる細胞の自己分解システム, 化学同人(2012)
- 2) Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N., The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432:1032-6 (2004)
- 3) Komatsu M., Waguri S., Ueno T., Iwata J., Murata S., Tanida I., Ezaki J., Mizushima N., Ohsumi Y., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K., Chiba T., Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell. Biol.*, 169:425-34(2005)
- 4) Sou Y.S., Waguri S., Iwata J., Ueno T., Fujimura T., Hara T., Sawada N., Yamada A., Mizushima N., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K., Komatsu M., The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell.*, 19:4762-75 (2008)
- 5) Masiero E., Agatea L., Mammucari C., Blaauw B., Loro E., Komatsu M., Metzger D., Reggiani C., Schiaffino S., Sandri M., Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell. Metab.*, 10:507-15 (2009)
- 6) He C., Bassik M.C., Moresi V., Sun K., Wei Y., Zou Z., An Z., Loh J., Fisher J., Sun Q., Korsmeyer S., Packer M., May H.I., Hill J.A., Virgin H.W., Gilpin C., Xiao G., Bassel-Duby R., Scherer P.E., Levine B., Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*, 481:511-515(2012)
- 7) Lira V.A., Okutsu M., Zhang M., Greene N.P., Laker R.C., Breen D.S., Hoehn K.L., Yan Z., Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.*, 27:4184-93(2013)
- 8) Narendra D., Tanaka A., Suen D.F., Youle R.J., Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell. Biol.*, 183: 795-803(2008)
- 9) He C., Sumpter R. Jr., Levine B., Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*, 8:1548-5(2012)
- 10) Ogura Y., Iemitsu M., Naito H., Kakigi R., Kakehashi C., Maeda S., Akema T., Single bout of running exercise changes LC3-II expression in rat cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 414:756-60(2011)
- 11) Zhang C., He Y., Okutsu M., Ong L.C., Jin Y., Zheng L., Chow P., Yu S., Zhang M., Yan Z., Autophagy is involved in adipogenic differentiation by repressing proteasome-dependent PPAR  $\gamma$  2 degradation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 305:E530-9(2013)
- 12) Zhang Y., Goldman S., Baerga R., Zhao Y., Komatsu M., Jin S., Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106:19860-5(2009)
- 13) Tanaka G., Kato H.1, Izawa T.2., Endurance exercise training induces fat depot-specific differences in basal autophagic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 466:512-7(2015)
- 14) Geng T., Li P., Okutsu M., Yin X., Kwek J., Zhang M., Yan Z., PGC-1 $\alpha$  plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 298:C572-9(2010)
- 15) Kamei N., Tobe K., Suzuki R., Ohsugi M., Watanabe T., Kubota N., Ohtsuka-Kawatari N., Kumagai K., Sakamoto K., Kobayashi M., Yamauchi T., Ueki K., Oishi Y., Nishimura S., Manabe I., Hashimoto H., Ohnishi Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Murakami K., Nagai R., Kadowaki T., Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 281:26602-14(2006)
- 16) Sahani M.H., Itakura E., Mizushima N., Expression

of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on

transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, 10:431-41 (2014)