

平成30年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14595

研究課題名（和文）次世代In vivoオートファジー測定系開発とその応用

研究課題名（英文）Establishment of a novel method monitoring autophagy for in vivo

研究代表者

川端 剛（KAWABATA, Tsuyoshi）

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60734580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーの様々な疾患への強い関与が示唆されており、その効率的な測定系の開発が待ち望まれている。本研究ではHalotag-LC3を用いた効率的なオートファジーの測定を可能にする新しい測定系を樹立し、in vivoへの応用の礎とすることを目標とする。Halotag融合LC3タンパク質を発現する細胞を作成し、ビオチンリガンドを用いたLC3のpulse-chase実験系と、複数の蛍光リガンドを同時に用いたオートファゴソーム標識によるオートファジー活性の測定系を樹立した。本研究より、Halotag-LC3の実験系が目的によってカスタマイズ可能な自由度が高いオートファジー測定系である事が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a novel strategy to monitor autophagic activity which could be effective even at in vivo situation. To this end, we developed Halotag-LC3 based method using different kinds of Halo tag ligands. We established cell line stably expressing Halotag-LC3 and applied the cells for transient pulse labeling of LC3 with biotin, which allow us to monitor degradation kinetics of LC3. In contrast to conventional autophagy flux assay, this method can avoid the side-effect of lysosomal dysfunction which could potentially cause change in autophagy. Moreover, using features of TMR and Oregon green for different sensitivity to lysosomal low pH condition, we developed pulse labeling of autophagosome and autolysosome. In summary, we showed that Halotag-LC3 system is highly flexible and efficient way to monitor autophagic activity.

研究分野：細胞生物学、遺伝学

キーワード：オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

人は歳を重ねるにつれて様々な変化を受ける。それは筋肉や皮膚など表層に明らかな変化はもちろん、肝機能や運動機能のみならず細胞レベルにおいてもその恒常性を維持する機構に異常を生じる。それに伴い、神経変性疾患やガンに代表される様々な疾患に対するリスクが上昇するのは周知の事実であり、対症療法でない原因をターゲットとする戦略を構築する上で疾患と組織、さらに細胞レベルの異常を解明するのが喫緊の、そして究極の課題である。

近年、細胞内バルク分解系であるオートファジーが細胞内の恒常性維持に不可欠な役割を果たす機構として注目されている。オートファジーは栄養飢餓時に生存に必要なエネルギーおよび材料を確保するために非選択的に自己成分を分解する役割のみならず、神経変性疾患や生活習慣病の原因となる変性タンパク質や損傷ミトコンドリアなどを選択的に分解するためにも必要である。すなわち、オートファジー機能の低下はこれら疾患の原因足りうる。事実、加齢とオートファジー能には負の相関があり(Rubinsztein DC et al, *Cell*, 2011)、またオートファジー不全モデルマウスは神経変性疾患の症状を示す事が知られている(Mizushima N and Komatsu M, *Cell*, 2011)。それゆえオートファジーを人為的に賦活出来るならば、これが広範な疾患に対する福音となる。現在オートファジーを人為的に活性化する方法として、その負の制御機構である mTOR を阻害するラパマイシンなどが検討されており、アルツハイマー病などの疾患の対抗処置として期待されている。しかし、mTOR はオートファジーの制御のみならず他の様々なシグナリング経路を制御するため、その阻害剤は血圧の上昇、免疫不全などの副作用を伴う。そのため、オートファジーの特異的賦活剤の開

発が待ち望まれている

## 2. 研究の目的

オートファジーを活性化して疾患の治療戦略とするアプローチは上流の制御因子である mTOR の阻害剤であるラパマイシンとその類縁が使われているが、その多機能さゆえの副作用が問題となっている。オートファジーが様々な疾患への強い関与が示唆されている現状を鑑みて、その測定系がいかに重要か容易に想像できるが、これをヒトに応用するにはまずモデル動物実験系の構築が不可欠である。本研究では *in vivo* における効率的なオートファジーの測定を可能にする新しい測定系を樹立することを目標とする。

これには、所属研究室で樹立した tandem fluorescent LC3( tf-LC3 )を応用する。LC3 は哺乳類細胞オートファゴソームのマーカーとして現在最も頻繁に使われている (Kabeya ら、*EMBO J*, 2000)。tf-LC3 は RFP と GFP の tandem タグであり、リソソームとの融合後に GFP シグナルが pH の低下によって消光するのに対し RFP は耐性である。これよりオートファゴソーム ( GFP-RFP:yellow ) とオートリソソーム ( RFP: Red )を区別できるため、GFP-LC3 による測定系のネックを克服している。これのトランスジェニックマウスは成体で観察するまでに RFP シグナルが過剰に蓄積してしまうという欠点があり実用には向かない。これを解決するには一過性の発現が必要であるが、ウィルスベクターなどを使用しても組織による感染効率の限界が生じる。そこで、本研究では universal tag である HaloTag 付加 LC3 を利用したオートファジー測定系を樹立する。これに結合する膜透過性リガンドを測定時に投与し、継続的にオートファジー活性を測定する方法をとる。人為的に合成したリガンドを外か

ら導入するため、従来のトランスジェニックマウスを用いた方法では不可能であったコンストラクトを導入できる。そのため非常に自由度が高く将来の発展性に富み、今後継続的に高い需要が見込まれるリソースとなりうる。

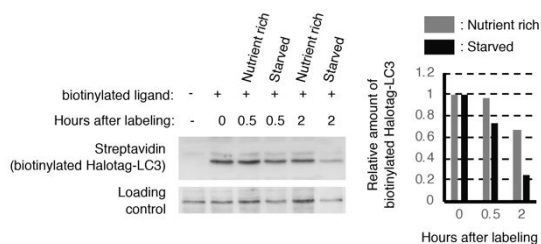
### 3. 研究の方法

Halotag 融合 LC3 タンパク質を発現する細胞を作成し、様々な特徴をもつ複数のリガンドを用いて *in vivo* に応用可能な効率的なオートファジー測定系を立ち上げる。

### 4. 研究成果

#### (1) ビオチンリガンドを用いた pulse-chase 実験系の検討

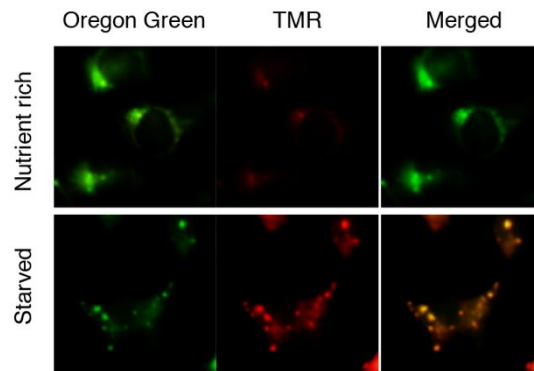
Halotag-LC3 発現細胞にビオチン化 Halotag リガンドを導入し、Halotag-LC3 の 30 分程の短期間ラベリングを可能にした。リガンド処理後に wash した細胞を富栄養および飢餓条件下に戻し、bitin-Halotag-LC3 の分解効率をウェスタンブロットにより検討したところ、これらの継時的な分解が見られた。また飢餓条件下で富栄養条件下よりも顕著な分解が見られた。



従来の LC3 を指標としたウェスタンブロットでは、リソソーム機能の阻害剤の存在下における LC3 の蓄積量と、阻害剤を含まない条件下の LC3 タンパク質量との差分をとる事により間接的にオートファジーフラックスを推定する。そのため、リソソーム活性の阻害による副次的な要因の影響を考慮する必要があったが、本実験系では、より直接的なオートファジーフラックスの計測が可能と思われる。

#### (2) TMR リガンドと Oregon green リガンドの同時ラベリングによるオートファジー活性の測定

TMR の pH 耐性と Oregon green の低 pH 感受性を利用し、tfLC3 のストラテジーを pulse labeling で実現する。Halotag-LC3 を安定発現する HEK293A 細胞を樹立し、Dual labeling のための各リガンド至適濃度を検討、富栄養および飢餓条件におけるオートファゴソームの観察を行ったところ、下図の通り飢餓条件において Red + Green のオートファゴソームおよび Red + weak Green のオートリソソームがクリアに観察され、オートファジー活性の効率的な測定系として Halotag を用いた dual labeling 系が有用である事が示された。



#### 総括

今回行った検討により、当初の想定通り Halotag-LC3 の実験系は様々なリガンドを用いる事で自由度が高く、目的によってカスタマイズ可能なオートファジー活性の測定が可能である事が示された。残念ながら、現状では市販の Halotag リガンドは高価であり、今回の培養細胞を用いた至適条件の検討よりトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 測定に用いる事はコストの面で非常に難しいと想定され、広く用いられるツールに成り難いため実現しなかったが、Halotag 自体の研究開発が進んでリガンドの量を少なくできるならば非常に有効な実験系と成りうる事が分かった。培養細胞の測定系として有効利用すると共に、リガンドのコストの状

況と今後のHalotag 研究開発状況をフォローして時節に合わせて in vivo 測定系の実現に繋げる予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

欧文論文(計 6 件)

- 1) Kurashima K, Sekimoto T, Oda T, Kawabata T, Hanaoka F, Yamashita T. "Pol  $\gamma$ , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress." *J Cell Sci.* 2018 May 18. In press (査読有)
- 2) Lu SL, Kawabata T, Cheng YL, Omori H, Hamasaki M, Kusaba T, Iwamoto R, Arimoto H, Noda T, Lin YS, Yoshimori T. "Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*." *PLoS Pathog.* 2017 Jul;13(7):e1006444. (査読有)
- 3) Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, Yamamoto M. "Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense." *Nat Immunol.* 2017 Aug;18(8):899-910. (査読有)
- 4) Hubber A, Kubori T, Coban C, Matsuzawa T, Ogawa M, Kawabata T, Yoshimori T, Nagai H. "Bacterial secretion system skews the fate of *Legionella*-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis." *Sci Rep.* 2017 Mar 20;7:44795. (査読有)
- 5) Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y,

Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. "Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice." *Hepatology.* 2016 Dec;64(6):1994-2014. (査読有)

- 6) Kawabata T, Yoshimori T. "Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions." *J Mol Cell Cardiol.* 2016 Jun;95:2-10. (査読有)

和文論文(計 2 件)

- 1) 川端剛、吉森保、"オートファジーの分子機構とその破綻" **再生医療(日本再生医療学会雑誌)**, Vol.16 No1, 6-21. (2017) (査読なし)
- 2) 川端剛、吉森保、"発癌とオートファジー" **肝胆臓**, 73(2), 169-174. (2016) (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

1. 川端剛、"がんの抑制機構としてのオートファジー" **第9回横断的腫瘍フォーラム**、大阪(2016)
2. Tsuyoshi Kawabata, Kanako Akamatsu, Tamotsu Yoshimori "Replication stress-induced autophagy promotes chromosomal stability", **2016 International A3 Foresight Symposium on Autophagy** Daejeon, Korea (2016)

[図書](計 1 件)

オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで (監修:大隅良典、編集:吉森保、水島昇、中戸川仁) 分担執筆:第18章、オートファジーと癌、川端剛・吉森保、p188~197、(2018) 南山堂

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川端 剛 (KAWABATA, Tsuyoshi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60734580

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし

##### (4) 研究協力者 なし