

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14422

研究課題名（和文）オートファジー活性の定量に利用可能な低分子性マーカー分子の探索と新規評価系の構築

研究課題名（英文）Exploration of low-molecular-weight markers for the development of the method to measure the autophagic activity

研究代表者

大西 康太（OHNISHI, Kohta）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：80723816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 生体のオートファジー活性を適切に調節することができれば、幅広い疾病や老化現象に対する予防策となることが期待されているが、現状、ヒトの活性評価法は確立されていない。

本研究では、ヒト由来HeLa細胞から分泌される低分子化合物群を網羅的に質量分析し、得られた分析結果を多変量解析に供することで、オートファジー活性の評価に利用可能なマーカー分子を探索した。その結果、細胞のオートファジー活性に依存して細胞外に分泌されるイオンとして、分子量X、または、Yの二種の分泌化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは細胞内に生じた異常分子に対する分解機構であり、その機能不全が様々な難治性疾患（がん・神経変性疾患・糖尿病など）の発症要因となる可能性が示されている。本機構を適切に活性化できれば、ヒトの健康寿命の延伸に寄与する新しい疾病予防戦略となり得るが、ヒト試験に応用可能な活性評価法は確立されておらず、本機構を作用標的とした薬剤や機能性食品の研究開発は遅れている。本研究成果で見出した二種の分泌分子がヒトの血液や尿から検出できれば、オートファジー研究を社会実装する上で大きな障壁となっている活性評価法の構築に大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： The control of autophagy flux in vivo has been expected as a possible strategy for the prevention of various diseases and aging. However, the methodology for the measurement of autophagic activity in human is still unestablished.

In this study, to identify novel marker molecules available for measuring the autophagic activity, low molecular weight compounds secreted from HeLa cells were comprehensively analyzed by mass-specs, which were further subjected to a multivariate statistical analysis. Then we found two candidate ions (MW: X or Y) which are secreted from a human cell line in an autophagy-dependent manner.

研究分野：食品機能学

キーワード：オートファジー マーカー分子 質量分析装置 多変量解析

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内に生成した変性タンパク質や障害ミトコンドリアを含む異常オルガネラに対する分解機構の一つであり、生体はその恒常性を維持する上で極めて重要な働きを担う。近年、加齢や肥満に伴い、オートファジー活性が減弱することや、神経細胞や肝細胞におけるオートファジー不全が幅広い疾病(神経変性疾患・がん・糖尿病など)の発症・進展と密接に関与することが相次いで報告されており、本機構を適切に活性化させることは、老化や様々な疾病に対する有力な予防戦略と考えられている。また、興味深いことに、オートファジー関連遺伝子を全身で過剰発現したマウスの脂肪重量が顕著に減少する一方で、脂肪細胞の分化過程に対しては、本機構が促進的に作用するという二面性も明らかとされており、適切な時点で、適切な臓器において、本活性を調節する重要性が示唆されている。

しかし、オートファジーは、一過的な細胞内膜構造(オートファゴソーム)の出現を介する動的な分解機構であるため、培養細胞レベルにおいても、その活性を正確に評価することは難しい。現在、オートファゴソーム膜に局在性を示す脂質修飾タンパク質である LC3(light chain 3)-II が、オートファジーをモニターするための唯一のマーカー分子として用いられているが、本タンパク質発現は、オートファゴソームの生成に伴い短期的に増加した後、リソソーム酵素による分解過程において徐々に減少する。一方、本分解過程の阻害条件においては、オートファゴソームの蓄積に伴って LC3-II が増加するため、本タンパク質の発現量のみを指標にオートファジー活性を評価することは困難である。最近、培養細胞に対して短期的にリソソーム活性阻害剤を投与することで、本活性を半定量する実験方法が開発され、当該研究分野において広く利用されているが、オートファジー活性を調節する活性物質の探索など、大規模なスクリーニング実験に対しては、より定量性の高い評価系が必要である。また、阻害剤の局所的な短期投与を必要とする本試験系を用いて、実験動物の特定の臓器におけるオートファジー活性を正確に評価することは極めて困難であり、より定量性が高く、動物サンプルに対しても応用可能な新たな評価系の構築が強く求められている。

2. 研究の目的

オートファジーを作用標的とした、老化や疾病に対する新たな予防戦略を追及するためには、正確、且つ、簡便に本活性を評価できる新しい評価系の構築が必要不可欠である。そこで本研究では、オートファジー活性を評価するための新規低分子性マーカー分子の探索・同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) オートファゴソーム分解物の調製、及び、LC3-II分解物の探索

まず、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん細胞)から、段階的遠心分離法によりオートファゴソーム・リソソームを含む light membrane 画分を回収し、*in vitro* でオートファジー分解反応を再現する。得られた分解サンプルの低分子画分を質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて網羅的に分析する。LC3-II は、前駆体タンパク質 LC3-I の C 末端 glycine に PE が付加した特徴的な化学構造を持つため、その分解物は、本構造由来の部分構造を有することが予想できる。MS/MS 分析によって、本部分構造(glycine-ethanolamine 付加体)に対応するフラグメントイオンを解離する分子を網羅的に探索し、LC3-II 由来である可能性の高い化合物を絞り込む。この際、LC3-II を発現しない Atg7-KO HeLa 細胞を陰性対照として用いることで、効率的に LC3-II 分解物を探索する。分析に十分な量の分解物が得られない場合は、pDNA の導入による LC3 の過剰発現、また、*in vitro* 分

解反応系へのリコンビナント加水分解酵素（プロテアーゼ、ホスホリパーゼなど）の添加により、効率的に LC3-II 分解物を調製する予定である。

(2) 細胞培養上清からのマーカー候補分子の網羅的探索

HeLa 細胞から分泌される低分子化合物群を網羅的に分析し、細胞のオートファジー活性に關して分泌量が増減する分子を探索する。陽性対照として、Torin1 の投与によりオートファジーを活性化させた細胞の培養上清を、また、陰性対照として、オートファゴソーム形成能を欠失させた ATG7-KO 細胞の培養上清を準備する。それぞれの培養上清に含まれる化合物群を極性毎に回収し、高極性画分は CE-TOF/MS を、低極性画分は逆相 LC-TOF/MS を用いて網羅分析する。得られたトータルイオンクロマトグラムを多変量解析に供し、Torin1 の投与により野生型細胞からの分泌量が増加する一方で、ATG7-KO 細胞からは分泌されない化合物を探索する。

4 . 研究成果

(1) ATG5, ATG7-KO HeLa 細胞の作出

オートファゴソームの形成に必須なコア ATG タンパク質の内、KO マウスの作製例も多い ATG7 と ATG5 に着目し、CRISPR/Cas9 system による一塩基欠失細胞の作出を試みた。ヒト ATG7 の exon2 配列、及び、ヒト ATG5 の exon1、もしくは、exon2 配列から gRNA 配列を設計し、これに相当する DNA 配列を挿入した PX459 ベクターをクローニングした。作製した pDNA を HeLa 細胞にトランスフェクションした後、Cas9 を一過的に発現した細胞集団をシングルセルスクリーニングに供し、目的の ATGs 欠損クローンを選抜した。

作出した ATG7-KO 細胞には、ATG7 タンパク質発現が全く検出されず、また、ATG5-ATG12 タンパク質複合体の形成が阻害されていることが確認できた。一方、ATG5-KO 細胞では、ATG5 タンパク質発現が全く検出されなかった。続いて、これらの KO 細胞のオートファゴソーム形成能について評価した。リソソーム酸性化阻害剤である bafilomycin A1 を投与すると、野生型の HeLa 細胞では、オートファゴソームの蓄積に伴い LC3-II タンパク質の増加が認められた。一方で、ATG7-KO 細胞、及び、ATG5-KO 細胞では、bafilomycin A1 処理の有無に関わらず LC3-II の発現が認められなかった。以上の結果から、作出した ATGs-KO 細胞には、オートファゴソーム形成能が欠失していることが確認できた。

(2) *In vitro* オートファジー分解実験

まず、HeLa 細胞からオートファゴソームとリソソームを含む light membrane 画分を回収し、リソソーム加水分解酵素の至適 pH4.5 においてインキュベーションすることで、経時的に LC3-II が減少することを確認した。また、この現象が熱処理により抑制されたことから、LC3-II の減少はリソソーム加水分解酵素による消化反応の結果と考えられた。オートファゴソーム分解試料を調製できたため、続いて、本試料を HPLC-UV 分析に供した。作出した ATG7-KO 細胞を陰性対照として解析したが、WT 細胞由来のオートファゴソーム分解試料に特有のピークは認められなかった。以上の結果から、HPLC-UV を用いて LC3-II 分解物を探索することは困難と判断した。

(3) *In vitro* オートファジー分解産物の LC-MS/MS 分析

HPLC-UV を用いた LC3-II 分解物の探索は困難であることが示唆されたため、LC3-II 分解物の分子構造を推測し、LC-MS/MS を用いて微量検出を行うこととした。オートファゴソーム内膜に

存在する LC3-II は、リソソームに含まれる protease によりタンパク質部分が、phospholipase により PE 部分が消化されると考えられる。従って、C 末端 glycine にエタノールアミンが付加した構造 (G-EA)、または、protease による消化不良により、C 末端アミノ酸が 2 残基残った構造 (FG-EA) が生成されるのではないかと予想した。そこで N 末端を cbz 保護した cbz-phenylalanyl-glycine、cbz-glycine を原料にカルボジイミド法と水素添加の二段階反応により、FG-EA、G-EA をそれぞれ化学合成した。合成した標準品を用いてそれぞれの MRM 分析条件を検討し、これら 2 種のマーカー候補分子を選択的に微量検出するための LC-MS/MS 分析条件を確立した。

本分析条件を用いて、オートファゴソーム分解試料を分析したが、候補化合物である FG-EA、及び、G-EA はいずれも検出されなかった。分解基質である LC3-II、または、リソソームに含まれる内因性分解酵素の活性が不足している可能性を疑い、mCherry-eGFP-LC3 を過剰発現させた試料、また、リン脂質におけるリン酸エステル構造をアルコール側で切断する PLD と、ポリペプチドのペプチド結合を切断する pronase のリコンビナントタンパク質をそれぞれ添加した試料を用いて同様の検討を行ったが、候補化合物である FG-EA、及び、G-EA どちらの構造も検出されなかった。

(4) HeLa 細胞の培養上清に含まれる高極性低分子化合物群の網羅分析

野生型、及び、ATG7-KO HeLa 細胞に対して、オートファジー誘導剤として報告されている Torin1 を投与した。12 時間後に培養上清を回収し、クロロホルム-メタノール混合溶媒を用いた分液により、高極性、及び、低極性画分を得た。この時、陰性対照として、DMEM も同様の手順で分液し、各画分を得た。

まず、高極性画分を CE-TOF/MS 分析 (negative mode) に供し、酸性化合物群を網羅分析した (n=4)。分析により得られたトータルイオンエレクトロフェログラムから MFE アルゴリズムを用いて、検出された全ての化合物を抽出したところ、本画分には 100-250 種の化合物が含まれることが明らかとなった。再現性良く検出された化合物を検索した結果、229 種類の化合物が抽出された。これら 229 種類の化合物に対して主成分分析を行ったところ、群間で化合物の含有パターンが異なることが明らかとなった。

(5) オートファジー活性依存的に分泌量が増加する高極性分子の探索

オートファジー活性依存的に分泌量が増加する化合物を探索するため、再現性よく検出された 229 種類の化合物の中から、野生型 HeLa 細胞に Torin1 を投与すると分泌量が 2 倍以上に増加し、且つ、ATG7-KO 細胞からは分泌されない化合物を探索した。まず、DMEM に含まれず、且つ、野生型細胞を Torin1 で処理した群で、再現性良く検出された化合物を検索したところ、18 種類の化合物が抽出された。このうち 12 種類の化合物は、野生型細胞の無処理群からも分泌が確認でき、中でも、泳動時間 x 分に検出された分子量 X、及び、X' の化合物は、Torin1 の投与によって分泌量が 2 倍以上に増加していた。重要なことに、ATG7-KO 細胞の培養上清には、これら二種類の化合物はほとんど含まれていないことが明らかとなった。また、分子量 X と X' の化合物は同じ泳動時間に検出され、且つ、ピーク形状も類似しているため、分子量 X' の化合物は、分子量 X の化合物のフラグメントイオンであると考えた。以上の結果より、分子量 X の化合物をオートファジーマーカー分子として同定した。尚、positive ion mode で分析した塩基性化合物群からは、目的の分泌挙動を示すマーカー候補分子は見つからなかった。一方、低極性画分を LC-TOF/MS で分析し、同様の解析を行ったところ、分子量 Y のマーカー候補化合物を見出した。

(6) 分子量 X、Y の化合物の分子組成式の予想

マーカ-候補化合物である分子量 X、Y の精密質量情報と同位体ピークパターンから分子組成式を予想したところ、X の候補組成式として $C_A H_B N_C O_D$ 、 $C_E H_F N_G O_H$ 、 $C_I H_J N_K O_L$ が、また、Y の候補組成式として $C_N H_M N_O P$ 、 $C_Q H_R N_S O_T$ 、 $C_U H_V N_W O_X$ が推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maiko Sakai, Kohta Ohnishi, Masashi Masuda, Hirokazu Ohminami, Hisami Yamanaka-Okumura, Taichi Hara, Yutaka Taketani	4. 巻 84
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1221-1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1727309.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 藤元 萌、大西 康太、坂井 麻衣子、福田 哲平、大西 愛花、増田 真志、奥村 仙示、河合 慶親、竹谷 豊
2. 発表標題 オートファジー活性を制御する食品成分の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohta Ohnishi, Moe Fujimoto, Maiko Sakai, Teppei Fukuda, Aika Ohnishi, Hirokazu Ohminami, Masashi Masuda, Hisami Okumura, Yoshichika Kawai, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Exploration of bioactive food factors for the control of autophagy flux
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 康太
2. 発表標題 "食"でオートファジーを制御できるか?
3. 学会等名 レドックス・ライフィノーション第170委員会 20周年記念若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井 麻衣子、大西 康太、大南 博和、増田 真志、奥村 仙示、竹谷 豊
2. 発表標題 mTORC2シグナルはマクロファージ様細胞において遺伝子発現調節を介してリソソーム活性を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maiko Sakai, Kohta Ohnishi, Masashi Masuda, Hirokazu Ohminami, Hisami Okumura, Taichi Hara, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Elucidation of the molecular mechanism underlying lysosomal activation in J774.1 cells by isorhamnetin treatment
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井 麻衣子、大西 康太、増田 真志、大南 博和、奥村 仙示、原 太一、竹谷 豊
2. 発表標題 J774.1マクロファージ様細胞においてmTORC2シグナルはリソソーム活性を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田 哲平、大西 康太、増田 真志、松崎 泰教、今野 歩、藤元 萌、大西 愛花、坂井 麻衣子、大南 博和、奥村 仙示、原 太一、平井 宏和、竹谷 豊
2. 発表標題 近赤外蛍光イメージングを用いたin vivoオートファジー活性評価法の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maiko Sakai, Kohta Ohnishi, Teppei Fukuda, Masashi Masuda, Naomi Kanoh, Hisami Okumura, Yoshichika Kawai, Yutaka Taketani
2. 発表標題 mTORC2 signaling is critical for lysosomal activation by isorhamnetin treatment in J774.1.
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学大学院医歯薬学研究部・臨床食管理学分野ホームページ https://clinicalnutrition.jimdo.com/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考