

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16119

研究課題名(和文)新規開発低分子化合物による生体内オートファジーの可視化

研究課題名(英文)Development of small fluorescent probes for the analysis of in vivo autophagy kinetics

研究代表者

桜井 一 (Sakurai, Hajime)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：00796732

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)：オートファジーの生体における重要性は、関連分子を欠損したマウスの解析からも明らかであるが、実際に生体の『いつ、どこで活性化されているのか?』、『どのような生命現象に貢献しているのか?』はほとんど未解明のままである。これらの学問的問いの解明には、生体内におけるオートファジー活性の簡便な可視化が課題であった。本研究では、遺伝子導入を必要とせず、オートファジー活性を特異的に感度よく検出できる試薬(蛍光プローブ)の開発に成功した。また、開発したプローブが生体内のオートファジー活性を実際に可視化・検出できることを示した。

研究成果の学問的意義や社会的意義

本研究で開発した3つの蛍光プローブが、各々オートファジー現象のどのステージを標識できるのかを詳細に解明し、それぞれ異なるステージを標識し分けることが可能であることを明らかにした。この成果により、関連遺伝子の解析や薬剤の開発において、開発したプローブを活用することで、オートファジー現象のどのステージに着目すればよいのかを簡便に知ることが可能となった。

また、遺伝子導入を必要とせずに生体内でのオートファジー活性を可視化できるため、原因未知の疾患とオートファジーとの関連性の解明に役立てることが期待できる。

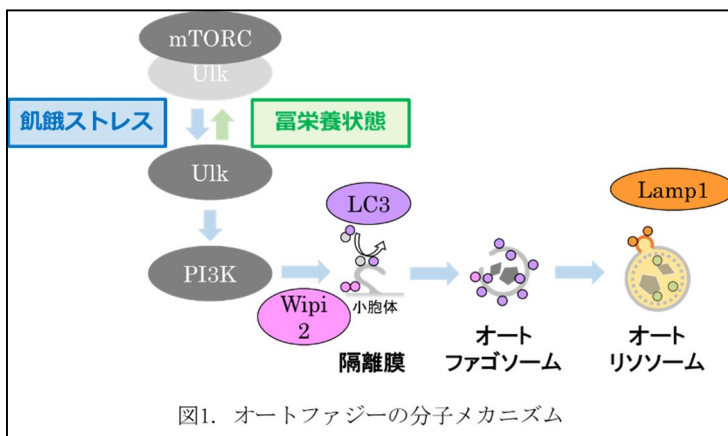
研究成果の概要(英文)：Studies of various autophagy-deficient mice have revealed the essential roles in many aspects. However, "when/where is autophagy activated in vivo?" is still almost uncovered. The fluorescent probes which detect autophagic activities without transgenic processes are needed to approach these issues. Even though several probes are commercially available, the characterization of these probes are hidden so far. Recently, we developed the new green-fluorescent probes for monitoring autophagy. In this study, we further developed a new red-fluorescent probe. Then, we showed combinational labeling with these green and red probes permits monitoring autophagic flux, since we analyzed the labeling nature of these probes in detail. Furthermore, the developed new probe makes it possible to detect autophagic activity in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

マクロオートファジー（以降、オートファジー）は、隔離膜と呼ばれるカップ状の膜構造で細胞質成分を囲み、リソソームへと輸送する細胞内分解機構である。飢餓ストレスで誘導されることから発見されたオートファジー現象の分子メカニズムは、LC3 (Atg8) の発見によって飛躍的に発展した（図1；Klionsky et al., 2021）。オートファジーが誘導されると LC3 は脂質修飾を受け、通常状態では細胞質中に拡散している細胞内局在を劇的に変化させ、隔離膜上へと局在化するようになる。即ち、LC3 の修飾状態をタンパク質の分子サイズの変化として検出できるだけでなく、視覚的な変化としても検出することが可能となった。この LC3 をマーカー分子として応用研究も発展し、近年では、癌を始めとする様々な疾患との関連も明らかにされてきている。オートファジーの生体における重要性は、関連分子を欠損したマウスの解析からも明らかであるが、実際に生体の『いつ、どこで活性化されているのか？』についてはほとんど未解明のままである。この学術的問いの解明には、生体内におけるオートファジー活性の簡便な可視化が必須であるが、LC3 が有用なマーカー分子として広く利用されてきたために、蛍光プローブの開発が進んでおらず、現在のところ *in vivo* でオートファジー活性を評価できる低分子化合物は存在していない。



一方で、オートファジー研究において『オートファジー活性』の評価は非常に重要な課題となっている。オートファジー分解経路としての活性を評価するためには、図1に紹介したようなマーカー分子を複数比較し、時間経過とともに分解が進行するようすを検出する必要がある。現在、2種類の蛍光タンパク質を融合した RFP-GFP-LC3 (tf-LC3) は現在最も広く利用されている指標であり、オートファジーの膜動態と分解活性のダイナミクス（時間変化）を可視化することでオートファジー活性を検出する。しかし、生体内のオートファジー活性を測定するためには、この tf-LC3 を形質転換する必要があるため即時性に乏しいという課題があった。

近年、申請者は（株）同仁化学研究所との共同研究により、オートファジーを可視化できる低分子化合物として、DAPGreen と DALGreen の2つのプローブの開発に成功している（Iwashita et al., 2018）。開発した2つのプローブは共通した疎水性尾部を持ち、この構造によって隔離膜選択的に局在することを明らかにしている。隔離膜に取り込まれてから安定して蛍光を発する DAPGreen とは異なり、pH センサーを持つ DALGreen は酸性環境でのみ蛍光を検出できる。即ち、DALGreen はオートファジーの終着点であるオートリソソームのみを蛍光標識でき、DAPGreen はそれ以前の隔離膜から蛍光標識が可能である。オートファジーが活性化すると、まず、DAPGreen 蛍光が増大し、次いで DALGreen 蛍光が増大する。オートファジー活性は、両化合物によるダイナミクス（時間変化）の定量で測定できるが、現在この2つの化合物の蛍光色は同色であるため、リアルタイムでオートファジー活性を可視化することはできていない。

2. 研究の目的

本研究では、個体レベルで『いつ、どこでオートファジーが活性化しているのか？』という学術的問いの解明を目指す。具体的には、まず、開発した2つのプローブを同時に使用することでオートファジー活性のダイナミクスを可視化するために、(1) DAPGreen を赤色蛍光に変換した DAPRed を開発し、(2) DAPGreen と同等の性質を有することを確認することを目指す。次に、(3) これらプローブを用いて *in vivo* でのオートファジー活性の可視化を試みる。

3. 研究の方法

(1) DAPRed の開発

DAPGreen と DALGreen の二重染色観察を可能にするため、DALGreen を改変し、赤色蛍光を発する DAPRed を開発した。

(2) 新規開発した DAPRed の性質評価

新規に開発した DAPRed について、DAPGreen と同等の性質を有することを確認した。具体的には、開発した各蛍光プローブについて、各種オートファジーマーカー分子との共局在性を評価した。さらに、光-電子相関顕微鏡（CLEM）法を用いて、DAPRed が DAPGreen と同様にオートリソソームよりも早い段階の関連構造を標識できることを明らかにした。また、DAPRed

と DALGreen を組み合わせで使用することでねらい通りにオートファジー活性を可視化できることを明らかにした。

(3) *in vivo*でのオートファジー活性の可視化

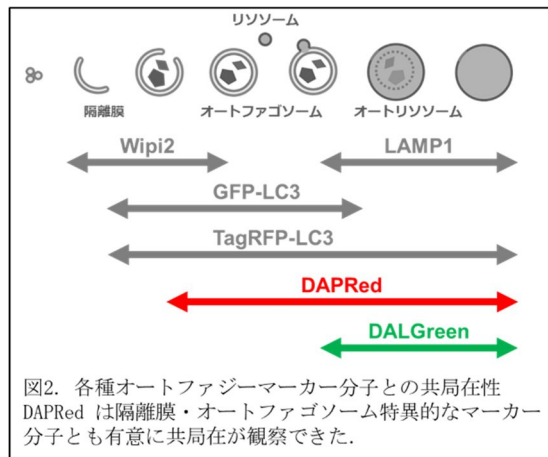
受精2日後のゼブラフィッシュ稚魚に DAPRed を投与し、24 時間後にライブイメージング観察した。ゼブラフィッシュ稚魚を材料として既知の手法を用いてオートファジーを誘導し、DAPRed が生体でのオートファジー活性を可視化できることを明らかにした。また、高速 3D 実体顕光顕微鏡 (THUNDER, Leica) を用いて DAPRed 染色した稚魚の全細胞を蛍光ライブイメージング観察した。

4. 研究成果

(1) 株同仁化学研究所との共同研究により、DALGreen を改変し、赤色蛍光低分子化合物 DAPRed を開発した。pH 感受性を示さないことから、DAPGreen と同様にオートリソソームに成熟するよりも早いステージのオートファジー構造から標識できることが期待された。

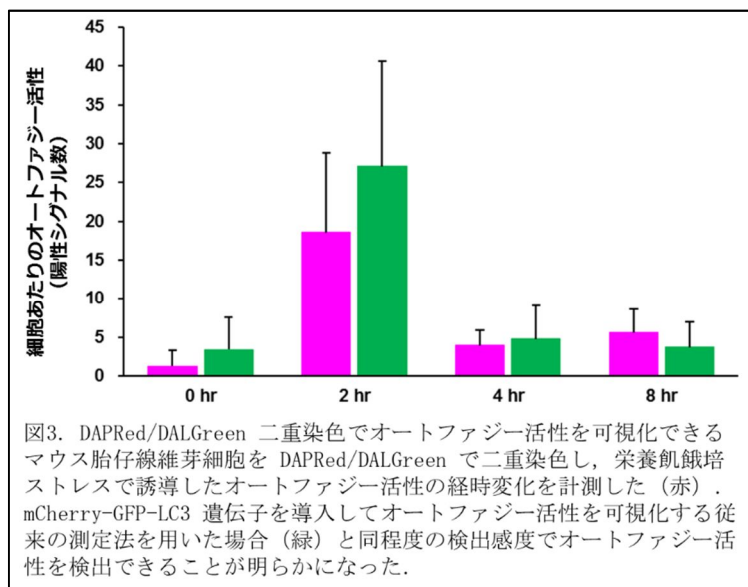
(2) 新規に開発した DAPRed は DAPGreen と同様の物性を示したことから、DAPRed/DALGreen の 2 色を組み合わせることでオートファジー活性を可視化できるのではないかと仮説を立てた。

まず、DAPRed と DALGreen について、各種オートファジーマーカー分子との共局在性を定量評価した。オートリソソームのみを識別する DALGreen は初期オートファジー構造にのみ局在する Wipi2 と全く共局在を示さず、リソソーム/オートリソソームマーカーである LAMP1 と非常によく共局在を示した。一方で、DAPRed は Wipi2 や GFP-LC3 といった初期オートファジー特異的なマーカー分子とも有意な共局在を示した (図 2)。



次に、実際に DAPRed が初期オートファジー構造を標識できるのかを、光-電子相関顕微鏡 (CLEM) 観察によって検討した。酸性環境で消光する GFP-LC3 は初期オートファジー構造の代表的なマーカー分子であり、ラパマイシン処理によるオートファジー誘導時に DAPRed と有意に共局在が認められた。蛍光顕微鏡観察で 2 つのシグナルが共局在していた構造を、電子顕微鏡で膜構造を観察したところ、隔離膜に特徴的なカップ状の構造を標識していることが明らかになった。また、開発したプローブは、ミトコンドリアや小胞体といったオートファジーに密接に関連する細胞内小器官を誤標識することなく、オートファジー関連構造のみを特異的に識別できることを明らかにした。

新規に開発した DAPRed は既存のオートリソソーム標識プローブ DALGreen と組み合わせることで、オートファジー活性を理論上可視化できることを明らかにしてきた。そこで、培養細胞に栄養飢餓ストレスでオートファジーを誘導し、実際にオートファジーが活性化・自己抑制がかかるまでのダイナミクスを測定できるか検証した。その結果、本研究で新規に開発した DAPRed と DALGreen とを同時使用することによって検出できるオートファジー活性の感度が、既存のオートファジー活性測定方法と比較しても遜色ないことを確認できた (図 3)。



以上の結果より、遺伝子導入を必要としない新規の手法により、オートファジー活性を可視化するという目的を達成した。

(3) 最後に、開発したプローブが生体内のオートファジー活性をリアルタイムに可視化することが可能であるかを検証した。

GFP-LC3 を遺伝子導入したゼブラフィッシュを用いた先行研究より、稚魚の尾びれ再生時にオートファジーが活性化することが知られている。本研究で開発した DAPRed による染色によっても同様に尾びれ再生部位での特異的なオートファジーが活性化を可視化することに成功した。

さらに、稚魚の全細胞における DAPRed 蛍光を高速でライブイメージング観察可能な高速 3D 実体顕微鏡による観察を実施した。その結果、ゼブラフィッシュ生体の様々な器官においてオートファジーが活性化していることを明らかにできた。

以上の結果を学術論文としてまとめ、投稿している (Sakurai et al., Revise 中)。本研究により、世界で初めて生体内のオートファジー活性を遺伝子導入することなく可視化する手法が確立された。この新手法により、オートファジーが関与する新たな生理現象が飛躍的に発見されていくことが期待できる。また、DAPRed が標識するオートファジー構造について詳細に解析したことにより、オートファジーの分子メカニズム解析においても大きく寄与できることが期待される。

参考文献

Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)., 2021, *Autophagy*, 17(1), 1-382

Iwashita H, Sakurai HT, Nagahora N, Ishiyama M, Shioji K, Sasamoto K, Okuma K, Shimizu S, Ueno Y, Small fluorescent molecules for monitoring autophagic flux., 2018, *FEBS Lett.*, 592, 559-567

Sakurai HT, Iwashita H, Arakawa S, Yikelamu A, Nishina H, Ishiyama M, Ueno Y, Shimizu S, Development of small fluorescent probes for the analysis of autophagy kinetics, Revise 中, *Autophagy*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Hirofumi, Honda Shinya, Torii Satoru, Shimizu Kimiko, Katoh Kaoru, Miyake Koichi, Miyake Noriko, Fujikake Nobuhiro, Sakurai Hajime Tajima, Arakawa Satoko, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Wipi3 is essential for alternative autophagy and its loss causes neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18892-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Honda, Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Satoru Torii, Hajime Tajima Sakurai, Masatsune Tsujioka, Michiko Murohashi, Shigeomi Shimizu	4. 巻 432
2. 論文標題 Association Between Atg5-independent Alternative Autophagy and Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2622-2632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2020.01.016	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桜井一
2. 発表標題 新規オートファジー可視化手法の開発から迫るゴルジ体形態制御機構
3. 学会等名 第3回新学術領域「オルガネラ・ゾーン」若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桜井一, 清水重臣
2. 発表標題 新規オートファジーを特異的に誘導する低分子化合物の探索
3. 学会等名 第2回新学術領域「オルガネラ・ゾーン」全体班会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------