

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689032

研究課題名(和文) 臨床検査への応用を目的としたオートファジー活性測定法の開発

研究課題名(英文) Develop the method to measure the autophagic activity

研究代表者

神吉 智丈 (Kanki, Tomotake)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50398088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞内に蓄積した不要物質を分解することで細胞内の恒常性を維持する機構であり、その機能低下は様々な疾患に関連すると考えられている。しかしながら、オートファジー活性を測定できる臨床検査は存在しない。本研究では、オートファジー活性を測定する為に、pH依存的に励起波長が変化する蛍光タンパク質Keimaを発現させた培養細胞(Keima細胞)を作成し、それらの細胞を利用して細胞内で起こったオートファジーを蛍光顕微鏡により観察する実験を行った。Keima細胞を用いることで、高感度かつ半定量的にオートファジーを観察できた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a catabolic process that degrades cytoplasmic components and organelles, and is maintain cellular homeostasis by eliminating unnecessary cellular components. Thus, the reduction of autophagic activity relates several disorders. However, it is difficult to measure the autophagic activity of patients. The goal of this study is to establish the method to measure the autophagic activity of patients for clinical use. As an initial step, we tried to observe autophagy in cultured mammalian cells. To observe autophagy, we established pH-sensitive fluorescent protein Keima expressing cell lines (Keima cells). Using Keima cells, we succeeded to observe autophagy sensitively and semi-quantitatively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)オートファジーは、栄養飢餓などのストレスにより誘導され、細胞内のタンパク質やオルガネラをリソソームに運びこむことで分解する現象である。オートファジーが細胞内で機能しなくなった変性タンパク質や異常オルガネラを選択的に分解することにより、細胞の機能を維持していることが最近の研究で明らかになっている。

(2)例えばアルツハイマー病やハンチントン病では、蓄積しつつあるアミロイドやポリグルタミンの凝集体をオートファジーが分解することで、発症を軽減していることが明らかになっている。また、オートファジー関連遺伝子(ATG 遺伝子)ノックアウトマウスでは、神経細胞や膵細胞にタンパク質凝集体が蓄積し、それぞれ神経変性疾患様症状、インスリン分泌不全を引き起こすことが知られている。

(3)オートファジーは、機能低下したミトコンドリアを特異的に分解し、細胞内に異常なミトコンドリアが蓄積するのを抑制している。このオートファジーによるミトコンドリア分解はマイトファジーと呼ばれており、遺伝性パーキンソン病の病因が、神経細胞でのマイトファジー不全による異常ミトコンドリアの蓄積であることも最近明らかになっている。

(4)オートファジーの機能が低下すると、上述している以外にも、発癌、肝機能障害、心不全、脂質代謝異常など多くの疾患を呈してくる。このように、オートファジーは細胞内の不要物質を除去することで細胞機能を保っており、細胞が持つオートファジーの活性は、細胞の健全性の指標ともなりうる。

(5)一方、細胞が持つオートファジー活性は、加齢により低下するだけでなく、肥満や糖尿病などのメタボリックな状態でも低下することが知られており、患者個々人のオートファジー活性は病気の重症度や予後に影響を与えるが、臨床症状や従来の検査法からオートファジー活性を推測することは困難である。今後益々オートファジーと疾患との関連が明らかになってくると考えられるため、患者個々人の細胞が持つオートファジー活性を知ることが、疾病予防ならびに治療方針の決定や予後の推測に非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、低浸襲で採取可能な末梢血を用いて、患者個人が持つオートファジー活性を測定する臨床検査法を確立することである。しかしながら現状では、オートファジーの活性能力を測定する方法は、培養細胞レベルでもほとんど確立されていないため、本研究では、最終的な臨床検査への応用を目指すべく、培養細胞や動物由来の細胞

レベルでオートファジーの活性を測定する手法を確立することをめざす。

## 3. 研究の方法

(1)Keimaは620nmの赤色蛍光を示す蛍光タンパク質であるが、周囲が細胞質のような中性環境では440nmで励起され、リソソーム内(pH4以下)では590nmで励起される。Keimaを細胞質に発現させた場合、細胞質のKeimaは440nmで励起され観察されるが、オートファジーが誘導された場合は、一部の細胞質Keimaが酸性領域リソソームに運び込まれ590nmで励起され、点状の蛍光シグナルとして観察される。

(2)様々な培養細胞にKeimaを発現し、実際にオートファジーが観察できるかどうか、観察されるオートファジーが実際に起こっているオートファジーを定量的に反映しているかを観察する。

## 4. 研究成果

(1)HeLa細胞、A549細胞、SH-SY5Y細胞など種々の培養細胞に、ドキシサイクリン依存的に発現誘導できるTet-Off系制御下にKeimaを発現することができる細胞株を樹立した。

(2)樹立した細胞に於いて、飢餓、ラパマイシン等でオートファジーを誘導した時に、予想通りに590nmの光で励起されるドット状の蛍光を観察することが出来た。

(3)こうしたオートファジーの結果と思われる590nmで励起されるドットは、リソソームを中和する塩化アンモニウムにより消失し、また、オートファジーの阻害剤3-MAで処理することで消失した。さらに、オートファジー必須の因子であるUlk1、Vps34、Beclin1のRNAiによる発現抑制でも大幅に減弱するため、590nmで励起されるドットはオートファジーを表していることが確認できた。

(4)オートファジーを時間経過で観察すると、栄養飢餓後1-2時間程度で590nmで励起されるドットが観察できるようになり、その後、24時間程度まで、時間依存的にドットの数が増加した。このことから、ドットの数からオートファジーの程度を半定量的に反映すると思われる。

## 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 12件)

1. Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiyama T, Kang D. Casein kinase 2 is essential for mitophagy. EMBO Rep. 2013; 14(9): 788-94. doi: 10.1038/embor.2013.114. 査読有り
2. Matsuda T, Kanki T, Tanimura T, Kang D, Matsuura ET. Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A

- on lifespan and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(2):717-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.084. 査読有り
3. Uchiumi T, Tanamachi H, Kuchiwaki K, Kajita M, Matsumoto S, Yagi M, Kanki T, Kang D. Mutation and functional analysis of ABC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Res*. 2013;43(5):569-75. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01103.x. 査読有り
  4. Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Saito T, Takazaki S, Kanki T, Yamaza H, Nonaka K, Kang D. Protein instability and functional defect by mutations of dihydroorotate dehydrogenase with Miller syndrome patients. *Biosci Rep*. 2012; 32(6): 631-9. doi: 10.1042/BSR20120046. 査読有り
  5. Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8(4):445-544. doi:10.4161/auto.19496 査読有り
  6. Yagi M, Uchiumi T, Takazaki S, Okuno B, Nomura M, Yoshida SI, Kanki T, Kang D. p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA-binding ability. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(19):9717-37. doi: 10.1093/nar/gks774. 査読有り
  7. Matsumoto S, Uchiumi T, Saito T, Yagi M, Takazaki S, Kanki T, Kang D. Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion*. 2012;12(3):391-8. doi: 10.1016/j.mito.2012.02.004. 査読有り
  8. Matsumoto S, Uchiumi T, Tanamachi H, Saito T, Yagi M, Takazaki S, Kanki T, Kang D. Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA. *Biochem J*. 2012;443(2):573-84. doi: 10.1042/BJ20111728. 査読有り
  9. Hirota Y, Kang D, Kanki T.

The physiological role of mitophagy: new insights into phosphorylation events.

- Int J Cell Biol*. 2012; 2012:354914. doi: 10.1155/2012/354914. 査読有り
10. Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem*. 2012;287(5):3265-72. doi: 10.1074/jbc.M111.280156. 査読有り
  11. Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Phosphorylation of Ser114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell*. 2011;22(17):3206-17. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0145. 査読有り
  12. Kanki T, Klionsky D, Okamoto K. Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(10):1989-2001. doi: 10.1089/ars.2010.3762. 査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

1. Kanki T. Signaling pathways regulating mitochondria autophagy in yeast ASMRM2013, 韓国ソウル、2013年11月4日
2. 神吉智丈、ミトコンドリアオートファジーの分子機構と生理的意義、第363回日本泌尿器科学会新潟地方会、長岡、2012年9月8日

〔図書〕(計 2件)

1. Kanki T and Okamoto K. Assays for Autophagy II: Mitochondrial Autophagy. Wei Xiao (ed.), *Yeast Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2014;1163:165-73. doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1\_11.
2. Kurihara Y and Kanki T. ATG32 CONFERS SELECTIVE MITOCHONDRIAL SEQUESTRATION AS A CARGO FOR AUTOPHAGY, CANCER, OTHER PATHOLOGIES, INFLAMMATION, IMMUNITY, INFECTION AND AGING, VOLUME 4: MITOPHAGY (印刷中)

〔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

[http://www.niigata-u.ac.jp/tenure\\_track/researcher/kanki\\_tomotake.html](http://www.niigata-u.ac.jp/tenure_track/researcher/kanki_tomotake.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神吉 智丈 (KANKI, Tomotake)

新潟大学医歯学系・教授

研究者番号：50398088

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：