

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 5月 30日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880015

研究課題名（和文）天然由来オートファジー制御化合物の探索及び作用機構の解明

研究課題名（英文）Study on natural bioactive substance that modulate autophagy

研究代表者

宮前 友策 (MIYAMAE YUSAKU)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：30610240

研究成果の概要（和文）：マクロリポファジーとは、オートファジーにより細胞内の脂質代謝が制御される現象のことを示す。本研究では、マクロリポファジーのメカニズム解明を目標に、天然物からのマクロリポファジー制御化合物の取得、並びに作用機構の解明を目的として研究を行った。当初予定していた植物体からは、活性物質を得ることが出来なかったが、スクリーニングの結果、イソキノリンアルカロイドであるテトランドリンに、マクロリポファジーを制御する活性を有することを新たに見出した。またその作用機序にはオートファゴソーム形成に関わる atg7 の発現増加を介した autophagic flux の亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Macrolipophagy is the autophagy that regulates intracellular lipid metabolism. We found that tetrandrine, a known isoquinoline alkaloid, modulated macrolipophagy in hepatic stellate cells. It was also suggested that tetrandrine induces the autophagic flux through the up-regulation of atg7, a mediator of autophagosomal formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成24年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：オートファジー、脂肪蓄積、テトランドリン、リポファジー、肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーとは、飢餓やホルモン刺激等に応答し、細胞内の自己成分がオートファゴソームと呼ばれる扁平膜状の構造物に

取り込まれ、リソソームにより分解される現象のことを示す。発がん制御や免疫応答、神経細胞死など様々な現象に関与し、その生理機能は多岐に渡る。

(2) 一方、細胞内における脂質は脂肪滴に貯蔵されており、栄養飢餓時には脂肪酸に分解され $\beta$ 酸化を経てエネルギーに変換される。近年、新たな脂質代謝経路として、脂肪滴がオートファゴソームに取り込まれ、リソソームにて分解される現象が見出された。マクロリポファジー (macro lipophagy) と名付けられた本現象は、新たな脂質代謝経路として世界中から俄に注目を集めているが、オートファゴソームへの脂肪滴取り込みの選択性など、詳細な分子機構は解明されておらず、その全容は明らかではない。

(3) 研究代表者が所属するグループでは、北アフリカ産植物である *Thymelaea hirsuta* の抽出物に、肝星細胞においてマクロリポファジーを制御する可能性を示唆する結果を得ていた。しかしながら、活性物質の構造やその作用機構は明らかにされていない。マクロリポファジーを制御する天然由来化合物はこれまでに報告されておらず、単離出来れば初めての化合物になる。

## 2. 研究の目的

上述のように、マクロリポファジーの詳細な分子機構は明らかにされておらず、本活性物質の構造及び作用機構を明らかにできれば、オートファジーと脂質代謝を繋ぐ制御機構の鍵を握る分子の解明に繋がるのが期待される。また、オートファジーは研究代表者が着目した脂質代謝のみでなく、がんや神経疾患、糖尿病等多様な疾病に関与することが知られる。本研究によりオートファジーを制御する化合物の構造並びに作用機構を明らかにできれば、オートファジーを作用機序とする他の生命現象制御へと展開できる可能性がある。そこで本研究では、*T. hirsuta* の抽出物から、マクロリポファジーを制御すると考えられる活性物質の単離、構造決定、並

びにその作用機構を明らかにし、オートファジーを糸口とした多様な生理活性を制御できる化合物開発の基盤となるための研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 活性物質の探索

*T. hirsuta* の植物体地上部を水及び有機溶媒で抽出、分配を行った後、得られた各画分から活性試験を指標にして、各種クロマトグラフィーを用いて活性物質の分離、精製を行った。活性の有無は、ラット由来肝星細胞株 HSC-T6 における脂肪滴の蓄積、及びオートファジーのマーカーである LC3-II タンパク質量の増加を指標として判定した。具体的には、脂肪滴の蓄積をオイルレッド O 染色、LC3-II の変動はウェスタンブロッティングを用いて、それぞれ評価した。

### (2) 活性物質の作用機構の解明

化合物を処理した細胞内で確かにリポファジーが制御されているか、下記の手法を用いて検証した。LC3 タンパク質に EGFP を融合させたタンパク質を発現する肝星細胞株に、化合物を処理し、24 時間経過後、脂肪滴の局在を Nile Red 染色で、LC3 の局在を EGFP の蛍光を指標に観察し、その両者が共局在するか、検証した。また、化合物による LC3 タンパク質の増加が autophagic flux の誘導に依るのか、それとも阻害により LC3 が蓄積したことに起因するのか検証を行うため、リソソームの阻害剤を用いた検討を行った。具体的には HSC-T6 に化合物と共にリソソームの阻害剤を共処理し、化合物単独処理時と、阻害剤との共処理時における LC3-II タンパク質量の比較により、autophagic flux の誘導あるいは阻害の判別を行った。

### (3) 神経細胞死抑制活性の検討

オートファジーが関与する他の現象制御への応用可能性を検討するため、本研究ではその一例としてアミロイドβペプチドによる神経細胞死を抑制するかどうか検討を行った。ラット由来神経細胞 PC12 を用いて、Aβ 並びにテトランドリンをそれぞれ単独処理あるいは共処理した細胞の生存率を MTT アッセイにより評価した。

## 4. 研究成果

(1) *T. hirsuta* の植物乾燥体のメタノール抽出物を、酢酸エチル、ブタノール、水を用いて二層分配し、得られた各画分を用いて活性試験を行った。しかし抽出物並びにいずれの画分も、LC3-II を増加させる作用は認められなかった。先行実験で用いた植物体と採取時期などのロットの違いから、活性を示すと考えられる化合物の含有量が少ないため活性が見られなかったものと考えられる。一方、*T. hirsuta* の抽出物及び分離画分に、肝星細胞の静止期への移行に関わる PPAR $\gamma$  のアゴニスト活性が認められたため、PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を指標に精製を行った結果、PPAR $\gamma$  アゴニスト活性物質として daphnolon を単離・構造決定した (図 1)。Daphnolon は 2006 年に単離・構造決定の報告はあるものの、PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を有することはこれまでに報告されていない。

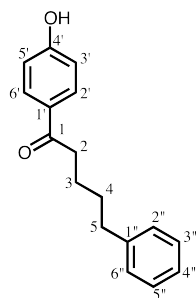


図 1. Daphnolon の構造

(2) 当初着目した *T. hirsuta* の抽出物及び分離画分にオートファジー制御活性が認められなかったため、本植物抽出物からの探索を断念した。代替の探索源として、天然物を含む種々の化合物を用いたスクリーニングを行った結果、イソキノリンアルカロイドであるテトランドリンを処理した肝星細胞株 HSC-T6 細胞、及び Lx-2 細胞において、脂肪滴が顕著に増加すること、及び LC3-II タンパク質量が顕著に増加することを新たに見出した (図 2A, B)。

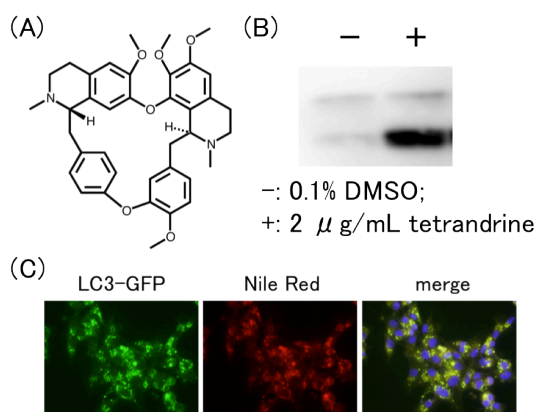


図 2. テトランドリンのリポファジー制御活性 (A) テトランドリンの構造, (B) テトランドリンを処理した細胞内の LC3 の変動, (C) テトランドリン処理による LC3-EGFP 及び脂肪滴の共局在

テトランドリンがリポファジーを制御する活性を有するか確認するため、LC3 タンパク質に EGFP を融合させたタンパク質を発現する肝星細胞株を用いた解析を行った。細胞に化合物を処理し、24 時間経過後、脂肪滴の局在を Nile Red で、LC3 の局在を EGFP の蛍光を指標に観察を行った。その結果、テトランドリンを処理した細胞内において、Nile Red により染色された脂肪滴と、EGFP により検出された LC3 が共局在したことから、本化合物はリポファジー制御活性を有することが

強く示唆された (図 2C)。よって、以後の実験ではテトランドリンによるリポファジー制御の作用機構解析を行うこととした。

(3) 標的分子同定のためのプローブあるいは固定化ビーズ作成を念頭に、テトランドリンの構造上の化学修飾が可能な部位を明らかにするため、構造活性相関を検討した。1位の立体が異なるイソテトランドリン、12位のメトキシ基がヒドロキシル基に置き換わったベルバミンを検討に用いた。構造活性相関の指標には、オイルレッド O 染色による脂肪滴蓄積活性、並びに化合物処理した細胞内における LC3-II タンパク質量の変動を指標に用いた。その結果、テトランドリンと比較して、イソテトランドリンでは脂肪蓄積活性ならびに LC3-II 量の変動ともに、活性が弱くなる一方で、ベルバミンでは完全に活性が消失した。これらのことから、テトランドリンのリポファジー制御活性には、1位の立体、並びに 12 位のメトキシ基の存在が重要であることが明らかになった (図 3)。

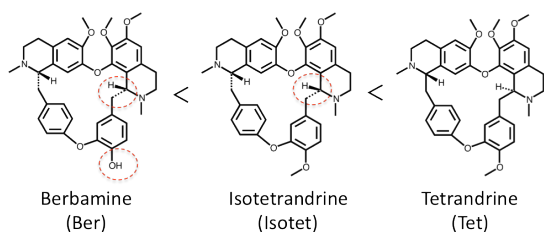


図 3. オートファジー制御活性における構造活性相関

(4) 次に作用機構を詳細に明らかにするため、標的分子の同定を試みた。磁気ビーズに化合物を固定化し、標的タンパク質を検出する方法を試みたが、ビーズ固定化に利用可能な官能基が得られなかったことから断念し、生化学的手法により作用機構を明らかに

することにした。まず、テトランドリンによる LC3-II タンパク質の増加が、autophagic flux の亢進によるものか、途中のステップが阻害されることにより蓄積した結果か、判別を行うためリソソームの阻害剤を用いた検討を行った。テトランドリン単独処理、もしくはリソソームの分解酵素阻害剤である E64d/pepstatin A を共処理した細胞内における LC3-II の変動を調べた結果、テトランドリン単独処理時よりも、阻害剤共処理で LC3-II が増加する傾向が得られた。このことから、本化合物は autophagic flux を亢進している可能性が示唆された。また、オートファジー実行因子である atg5 ならびに atg7 の変動をウェスタンブロッティングにより検討した結果、atg5 では変化が見られなかった一方で、atg7 は化合物処理後 6 時間後をピークに発現量が増加することが明らかになった。Atg7 はオートファゴソームの形成に必須とされるタンパク質であり、オートファジーの実行因子に位置づけられるタンパク質であるため、atg7 の発現増加はテトランドリン処理による autophagic flux の亢進を裏付けるものと言える。現在、テトランドリンによるリポファジー制御に、atg7 の発現増加が必須であるか検証するため、siRNA により atg7 の発現をノックダウンした細胞を用いた解析を行っているところである。

(5) オートファジーを介した他の現象制御への応用可能性を検討するため、本研究では、その一例として、アミロイド β (Aβ) ペプチドによる神経細胞死抑制活性を調べた。近年、Aβ ペプチドによる神経細胞死にオートファジーの異常が関与していることが示されているため、オートファジーを制御する化合物は神経細胞死を抑制する作用を有することが期待された。しかし、Aβ ペプチドによる

PC12 細胞の細胞死をテトランドリンが抑制するか検討した結果、神経細胞死抑制活性は認められなかった。

#### 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 3 件)

- 1) Nakasone, R.; Kurisu, M.; Onodera, M.; Miyamae, Y.; Matsuura, D.; Kanatani, H.; Yano, S.; Shigemori, H. Promoting effects on hepatocyte growth factor production of daphnane diterpenoids from *Daphne Odora*, *Heterocycles*, **2013**, in press 査読あり  
DOI: 10.3987/COM-13-12687
- 2) Miyamae, Y.; Kurisu, M.; Murakami, K.; Han, J.; Isoda, H.; Irie, K.; Shigemori, H. Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of 42-residue amyloid  $\beta$  protein, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 5844-5849 査読あり  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.001
- 3) Fujita, K.; Okamura, M.; Nishimoto, S.; Kurihara, T.; Momma, K.; Miyamae, Y.; Kambe, T.; Nagao, M.; Narita, H.; Masuda, S. Establishment of the monitoring system which modulates the mRNA processing, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2012**, *76*, 1248-1251 査読あり  
DOI: 10.1271/bbb.120226

[学会発表] (計 4 件)

- 1) ○宮前友策、吉田光多郎、大寺杏奈、仲井奈緒美、王健一、秋田徹、前嶋一宏、森直樹、入江一浩、神戸大朋、増田誠司、

永尾雅哉、バンウコンからの PPAR $\gamma$  アンタゴニスト変換活性物質の探索、新規素材探索研究会、2012 年 6 月、新横浜フジビューホテル (神奈川県)

- 2) ○宮前友策、仲井奈緒美、翁長彰子、韓峻奎、磯田博子、芦田久、神戸大朋、増田誠司、入江一浩、永尾雅哉、抗線維化物質テトランドリンの肝星細胞におけるマクロリポファジー制御、日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会、2012 年 6 月、京都大学 (京都府)
- 3) ○宮前友策、仲井奈緒美、翁長彰子、韓峻奎、磯田博子、芦田久、神戸大朋、入江一浩、永尾雅哉、抗線維化物質テトランドリンによる肝星細胞でのマクロリポファジー制御、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都女子大学 (京都府)
- 4) ○栗栖真奈美、宮前友策、村上一馬、Han Junkyu、磯田博子、入江一浩、繁森英幸、ヤセウツボ (*Orobanche minor*) 由来化合物のアミロイド  $\beta$  凝集阻害活性に関する研究、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都女子大学 (京都府)

[図書] (計 1 件)

- 1) 韓峻奎、宮前友策、繁森英幸、磯田博子「カフェオイルキナ酸は神経細胞保護作用を持つ」*化学と生物* 2012, *50*, 77-79

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮前 友策 (MIYAMAE YUSAKU)  
京都大学・大学院生命科学研究科  
助教  
研究者番号：30610240