

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660110

研究課題名(和文)オートファジー活性の指標となる新規分泌性マーカー分子の探索

研究課題名(英文) Search for novel secretory biomarkers indicating 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・特別研究員(PD)

研究者番号：80723816

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)：細胞内異常分子の分解を担うオートファジーは、老化やそれに伴う幅広い疾病の予防戦略として注目される一方、生体における活性強度を簡便に評価する手段に乏しい。本研究では、オートファジー活性を反映する新規分泌性マーカー分子の同定を目的とした。

培養細胞から分泌される分子に対して質量分析装置を用いた網羅的解析を行い、オートファジー活性と相関して分泌されるタンパク質としてpyruvate kinase M1/M2を同定した。しかし、本分子は、オートファジー活性化条件だけでなく、オートファジー分解を阻害した条件においてもその分泌量が増加することが明らかとなり、マーカー分子としての応用は難しいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Regulation of autophagy, a degradation system essential for the removal of the intracellular aggregates, has been considered as a new strategy for the prevention of various age-related disorders. However, there is still few experimental methods to evaluate the autophagic activity accurately. Then, we attempted to identify novel secretory biomarkers indicating the autophagic activity. Comprehensive analysis of the extracellular molecules secreted from murine cells by a mass spectrometer showed the correlation of the secretion of pyruvate kinase M1/M2 with the cellular autophagic activity. However, we concluded that it was not available for an autophagy biomarker, since pyruvate kinase M1/M2 secretion was also significantly increased by the inhibition of cellular autophagic activity.

研究分野：農芸化学

キーワード：オートファジー pyruvate kinase M1/M2 ceramide 細胞外分泌分子 質量分析装置 マーカー分子

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内異常分子に対する分解機構の一つであり、生体恒常性を維持する上で極めて重要な働きを担う。近年、加齢に伴いオートファジー活性が減弱することや、オートファジー不全と広範囲の疾病（がん、神経変性疾患、糖尿病など）との因果関係が強く示唆されており、本機構を適切に活性化させることは、老化や疾病に対する有力な予防戦略の一つと考えられている。

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・分解を介する動的な多段階分解機構であるため、その活性を正確に評価することは難しい。例えば、現在、マーカー分子として最も一般的に用いられているオートファゴソーム膜タンパク質 LC3-II は、オートファジーの活性化により短期的にその発現が増加した後、オートファジー分解に伴い徐々に減少する。また、オートファジー分解基質として知られているタンパク質 p62 は、オートファジー分解に伴ってそのタンパク質発現が減少するが、酸化ストレス等、種々の生体ストレス刺激によりその遺伝子発現が顕著に誘導されることが明らかとなっている。このように、生体におけるオートファジー活性を正確且つ簡便に評価することが困難な現状は、オートファジー誘導物質の探索研究における大きな障壁となっている。

2. 研究の目的

高齢化社会の進展に伴い、疾病や老化に対する予防戦略の充実が求められている。日常的に摂取する食品成分の機能性に期待が寄せられ久しいが、オートファジーに焦点を絞った研究例は極めて少ない。細胞内異常分子の分解を担うオートファジーは、老化やそれに伴う幅広い疾病の予防戦略として注目される一方、生体における活性強度を簡便に評価する手段に乏しく、新たな機能性食品の研究開発を遅らせている。本研究では、細胞外分泌分子に着目し、オートファジー活性を反映する新規マーカー分子の探索を目的とした。同定した分泌分子を指標としたオートファジー活性の新規評価系を構築する他、その分泌機構や周辺細胞への生理作用について検証し、オートファジーの細胞外恒常性に対する重要性を新たに提示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 質量分析装置を用いた細胞外分泌性オートファジーマーカー分子の探索

マウス胚性繊維芽細胞(MEF)に対し、既知のオートファジー誘導条件であるアミノ酸飢餓刺激や、リソソーム酸性化阻害剤である bafilomycin 処理を行い、オートファジー活性を正負に制御した。これらの細胞の培養上清から低分子画分及びタンパク質画分を回収し、それぞれのサンプルに対して、質量分析装置 (LC-Q-TOF MS, TripleTOF® 5600, AB SCIEX)を用いた網羅的定量解析を行った。

また、オートファジーの誘導に必須な遺伝子の一つである Atg7 をノックアウトした MEF の培養上清に対しても同様の解析を行い、細胞のオートファジー活性に特異的に依存して分泌量に変動するマーカー分子を探索した。

(2) 同定した候補分子の精査

質量分析装置による網羅的定量解析によって、オートファジー活性と分泌量との間に顕著な相関性を見出した細胞外分子の分泌挙動について、LC-Q-TOF MS とは異なる分析手段を用いてその再現性を確認した。低分子画分に対しては質量分析装置 (LC-MS/MS, API3200, AB SCIEX)を、また、タンパク質画分に対してはウェスタンブロット法(WB)により再分析を行い、その分泌量とオートファジー活性との相関性について改めて検証した。

(3) 同定した分子の分泌機構の解析

近年、細胞質内において成熟したオートファゴソームが細胞膜と融合し、小胞内部の分子が細胞外へと分泌される現象が報告されており、エキソファジー(exophagy)と呼ばれている。本研究により見出した分泌分子に関しても、エキソファジーにより細胞外へと輸送される可能性が考えられるため、本分泌機構の関与について評価した。具体的には、各種刺激によりオートファジー活性を調節した際の分泌分子の細胞内局在の変化を検証し、オートファゴソームとの相互作用性について検証した。

(4) 分泌分子の細胞外に対する生理活性の評価

近年、がん細胞や脂肪細胞から炎症性サイトカインが分泌され、周辺組織における炎症反応を調節することが

明らかとされていることから、本研究において同定された分泌分子も同様の生理活性を有する可能性を予想した。各種刺激によりオートファジー活性を調節した MEF 細胞の培養上清をマウスマクロファージ様細胞(J774.1)に対して投与し、cyclooxygenase-2(COX-2)の発現に対する影響を評価することで、細胞のオートファジー活性と、その周辺組織における炎症反応との関わりについて検証した。

4. 研究成果

(1) 質量分析装置を用いた細胞外分泌性オートファジーマーカー分子の探索

①低分子画分の分析

アミノ酸を含有しない HBSS 培地において MEF 細胞(Atg7-WT 及び KO)を 8 時間培養し、その培養上清からメタノール可溶性(親水性)低分子画分と、クロロホルム可溶性(疎水性)低分子画分をそれぞれ回収した。また、bafilomycin 処理によりオートファジー分解を阻害した細胞から分泌された分子も同様の手法により回収した。それぞれの細胞培養上清から得られた低分子画分を LC-Q-TOF MS による網羅的定量解析に供し、細胞におけるオートファジー活性の変化と、その分泌量との間に相関関係が認められる分子を網羅的に探索した。その結果、アミノ酸飢餓条件で培養した MEF 細胞の培養上清から得られた疎水性低分子画分において C-16 ceramide の分泌量が顕著に増加することが明らかとなった。また、bafilomycin 処理により、その分泌量がさらに増加することを見出した。興味深いことに、Atg7-WT MEF 細胞で認められた C-16 ceramide 分泌量の変化は、Atg7-KO MEF 細胞においては認められなかった。

②タンパク質画分の分析

①と同様の処理を行った MEF 細胞の培養上清から、限外ろ過法により 3kDa 以上のタンパク質画分を回収した。得られたタンパク質画分に対し、LC-Q-TOF MS による高精度な網羅的定量解析(SWATH)を実施したところ、アミノ酸飢餓条件において pyruvate kinase M1/M2 (PKM)の分泌が顕著に増加することが明らかとなった。また、bafilomycin 処理により、その分泌量がさらに増加することを見出した。重要なことに、PKM 分泌量の変化は、Atg7-KO MEF 細胞においては認められなかった。

上述したように、LC-Q-TOF MS を用いた網羅的定量解析により、MEF 細胞からの C-16 ceramide 及び PKM の分泌量が、オートファジー活性の誘導・阻害に伴って変化することが明らかとなった。興味深いことに、Atg7-KO MEF 細胞からの分泌量には変化が認められなかったことから、これらの分子の分泌機構にはオートファジーが密接に関与している可能性が考えられた。Ceramide はエキソソーム(細胞外分泌小胞)の膜構造に豊富に存在することから、C-16 ceramide の分泌量が増加する事実は特に興味深い。オートファジー活性の変化に伴い、PKM が C-16 ceramide を多量に含むエキソソームと共に分泌される可能性を想定した。エキソソームの成熟過程の場である後期エンドソームがオートファゴソームと融合し、アンフィソームと呼ばれる細胞内小胞を形成することも、本仮説の妥当性を支持するものと考えられた。

(2) 同定した候補分子の精査

LC-Q-TOF MS (TripleTOF® 5600, AB SCIEX)を用いた網羅的定量解析により同定された分子の分泌量が、確かにオートファジー活性の調節により変化するかを、独立した異なる評価系を用いて精査した。

①LC-MS/MS による C-16 ceramide の絶対定量

(1)①と同様の手法を用いて回収した疎水性低分子画分を、質量分析装置(LC-MS/MS, API3200, AB SCIEX)を用いて改めて定量分析した。C-17 ceramide を内部標準として培養上清中の C-16 ceramide の絶対定量を行ったところ、Atg7-WT MEF 細胞からの分泌挙動に関しては再現性を認めることができたが、Atg7-KO MEF 細胞から得られた培養上清においても C-16 ceramide の顕著な増加を認めた。

②WB による PKM の検出

(1)②と同様の手法を用いて回収したタンパク質画分を、抗 PKM 抗体を用いた WB により解析したところ、LC-Q-TOF MS で得られた結果と同様の Atg7 依存的な PKM 分泌挙動を認めた。

上述したように、MEF 細胞培養上清中の C-16 ceramide 及び PKM を LC-Q-TOF MS 分析と独立した異なる評価系により再分析した結果、C-16 ceramide の分泌挙動に関しては再現性を得られなかった。一方で、オート

ファジー活性の変化にตอบสนองして PKM の細胞外分泌が増減することは再確認できた。しかし、PKM の分泌量は、オートファジー活性化条件であるアミノ酸飢餓により Atg7 依存的に増加する一方で、リソソーム酸性化阻害剤である bafilomycin によりオートファジー分解を阻害した条件においても増加した。このような複雑な結果が得られたことから、PKM の分泌量を指標にオートファジー活性を簡便に評価することは難しいと考えられた。研究開始当初に目的の一つに挙げていたオートファジーマーカーとなりうる分泌分子を同定することはできなかった。

しかし、PKM が Atg7 依存的に分泌される機構を検証することは、オートファジーと細胞外分泌機構との関与を理解する上で重要と考えられた。そこで、PKM 分泌機構とエキソファジーとの関与を想定し、アミノ酸飢餓条件における PKM の細胞内局在の変化を検証した。

(3) PKM 分泌機構の解析

近年、細胞質内において成熟したオートファゴソームが細胞膜と融合し、小胞内部の分子を細胞外に分泌する現象が報告されており、エキソファジーと呼ばれている。本研究において見出した PKM の分泌に関しても、Atg7 のノックアウトにより分泌量が減少する点や、bafilomycin 処理によりオートファジー分解を阻害することで分泌量が増加する点など、共通点が多く認められたことから、エキソファジーにより分泌される可能性を想定した。

まず、PKM の細胞内タンパク質発現を WB により検証した。アミノ酸飢餓刺激、及び、bafilomycin 処理を行った MEF 細胞においても、PKM の細胞内発現量に大きな変化は認められなかったことから、細胞内に発現している PKM のごく一部が Atg7 依存的に分泌される可能性が示唆された。続いて、PKM のオートファゴソームへの局在性について検証した。アミノ酸飢餓条件において PKM が細胞内膜構造へ移行することが明らかとなったが、オートファゴソームを形成できない Atg7-KO MEF 細胞においても同様の現象が認められた。以上の結果から、PKM はエキソファジーとは独立した機構を介して細胞外へと輸送される可能性が高い。

(4) 分泌分子の細胞外に対する生理活性の評価

(1)における LC-Q-TOF MS 分析により、オートファジー活性を制御することで MEF 細胞からの分泌分子群が大きく変化する可能性が示唆された。そこで、オートファジー活性を調節した MEF 細胞の培養上清をマウスマクロファージ様細胞(J774.1)に投与し、COX-2 の発現に対する影響を評価することで、細胞のオートファジー活性と、その周辺組織における炎症反応との関わりについて検証した。

MEF 細胞を培養した DMEM 培養上清を J774.1 細胞に投与したところ、興味深いことに COX-2 発現の顕著な誘導が認められた。しかし、アミノ酸飢餓刺激、及び、bafilomycin 処理を行った MEF 細胞から得られた培養上清においても同様の活性が認められた。細胞のオートファジー活性と、その周辺組織における炎症反応との関与を見出すことはできなかったが、MEF 細胞培養上清が J774.1 細胞における COX-2 発現を誘導した事実は興味深い。現在、LC-Q-TOF MS を用いて本炎症誘導分子の同定を試みている。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 大西康太、河合慶親：アミノ酸飢餓条件におけるリポ多糖刺激マクロファージのプロテオーム解析：GCN2-eIF2 α シグナルによるタンパク質翻訳制御。第 37 回日本分子生化学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 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
特別研究員 (PD)
研究者番号：80723816