

令和元年6月3日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12749

研究課題名(和文)オルガネラ選択的オートファジーの新規可視化法の開発

研究課題名(英文) Probes for organelle-specific autophagy

研究代表者

谷田 以誠 (Isei, Tanida)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：30296868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは神経変性疾患、心筋症、2型糖尿病などの生活習慣病、脂肪肝や肝がん、心不全、病原体感染など多くの疾患の発症を抑止している。疾患に關与するオルガネラ選択的オートファジーの重要性が注目され、オルガネラ選択的オートファジーをリアルタイムでモニターする測定系の開発が急務であった。そこで、今回、パーキンソン病に深い関わりがあるミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)プローブ、脂質代謝や酸化ストレスに変化するペルオキシソーム特異的オートファジー(ペキソファジー)プローブを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した、ミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)プローブおよびペルオキシソーム特異的オートファジー(ペキソファジー)プローブにより、それぞれのオルガネラ特異的オートファジーが神経変性、老化、酸化ストレスを伴う環境因子などにより、どのように変化していくかが解析できるようになり、将来的にはこれらを抑制する創薬開発へと展開できるであろう。

研究成果の概要(英文)：Autophagy has significant roles against many diseases including neurodegenerative diseases, cardiomyopathy, type II diabetes, fatty liver, liver cancer, heart failure, and infectious diseases. Recently, organelle-specific autophagy is focused, because of the relation between autophagy and these diseases. Therefore, probes to monitor organelle-specific autophagy are awaited. We generated probes for mitochondria-specific autophagy (mitophagy) and peroxisome-specific autophagy (pexophagy).

研究分野：分子生物学・生化学・細胞生物学・解剖学

キーワード：オートファジー 神経変性疾患 パーキンソン病 酸化ストレス ミトコンドリア ペルオキシソーム  
脂肪滴 オルガネラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内バルク分解システムで、神経変性疾患、心筋症、2型糖尿病などの生活習慣病、脂肪肝や肝がん、心不全、病原体感染など多くの疾患の発症を抑止している。オートファジーにおいては、オートファゴソームが分解すべき標的を取り囲み、オートファゴソームがリソソームと融合し、リソソーム内加水分解酵素によって標的を分解する。従って、分解標的を取り囲んだオートファゴソーム内腔はほぼ中性であり、リソソームが融合した時点で内腔は酸性となる。申請者らは、EGFP に比べ酸性 pH により高い感受性を示す緑色蛍光蛋白質 pHluorin を用いて (図1) より高感度な pHluorin-mKate2-LC3 による典型的なオートファジー可視化系を開発した (Tanida et al. PLOS ONE 2014)。しかしながら、疾患に関与するオルガネラ選択的オートファジーの重要性が注目されており、オルガネラ選択的オートファジーをリアルタイムでモニターする測定系の開発が急務であったが、これまでそれぞれのオルガネラ選択的オートファジーを評価するプローブ自体が存在していなかった。

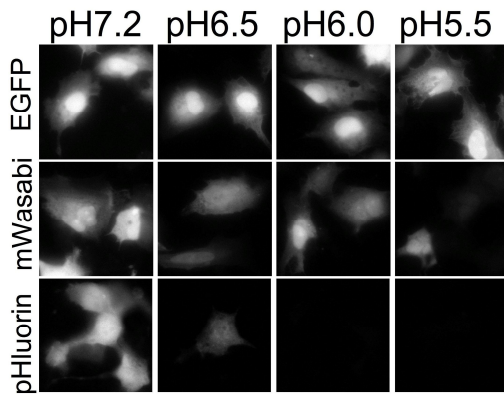


図1 最も酸性pHに感受性であるpHluorin

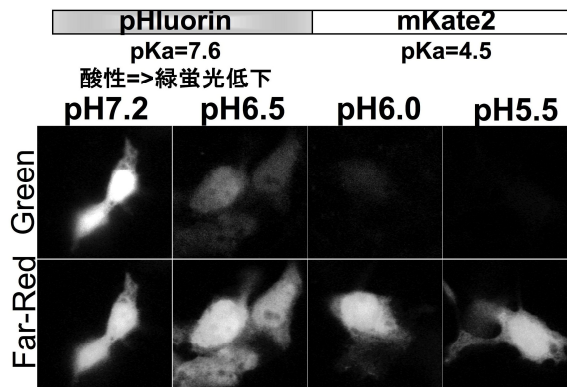


図2 酸性pHモニターツールのpHluorin-mKate2

### 2. 研究の目的

pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質 (図2) に、オルガネラ標的のシグナルをつけることで、各々のオルガネラに局在する pHluorin-mKate2 プローブを作成し、正常なオルガネラでは緑-遠赤外二重蛍光を示し、オルガネラ選択的オートファジーによりリソソームが融合した際には分解標的のオルガネラが遠赤外蛍光のみを発光する現象を指標とした測定系を開発することを目的とした。具体的には、パーキンソン病やミトコンドリア障害に関与するといわれるミトコンドリア特異的オートファジー (マイトファジー)、酸化ストレスや薬剤代謝など環境変化によって起こるペルオキシソーム特異的オートファジー (ペキソファジー)、栄養状態により活性化されると言われる脂肪滴特異的オートファジー、リソソーム異常によって引き起こされるリソソーム特異的オートファジー (リソファジー) などに注目して、研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) オルガネラ局在 pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の発現ベクターの作製

ミトコンドリア局在 pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の発現ベクターの作製

ミトコンドリアへの標的シグナルとして、ヒト チトクローム c オキシダーゼのサブユニットのプリカーサー配列 (MSV LTP LLL RGL TGS ARR LPV PRA KIH SLG DPP VAT) をタンデム蛍光蛋白質のアミノ末端に融合させた発現ベクターを作成した。また、ミトコンドリア局在の有効性を比較するため、*Listeria monocytogenes* の ActA 遺伝子のミトコンドリア標的シグナル (KLI AKS AED EKA KEE PGN HTT LIL AML AIG VFS LGA FIK IIQ LRK NN) との融合タンパク質の発現ベクターを作成した。それぞれのアミノ酸をコードする DNA 断片は相補的な一組の一本鎖のオリゴ DNA を合成し、リン酸化、アニーリング後、pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の発現ベクターのそれぞれアミノ末端とカルボキシル末端に相当する部位に読み枠を合わせて導入した。

ペルオキシソーム局在 pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の発現ベクターの作製

ペルオキシソームへの標的シグナルとして、PTS1 配列が知られている。pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質のカルボキシル末端に PTS1 配列 (SKL) を融合させた融合タンパク質の発現ベクターを作成した。

脂肪滴局在 pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の作製

脂肪滴に局在に有効なシグナルとして、ALDI (associated with lipid droplet protein 1) の疎水性ドメインとカベオリン 1 の脂肪滴標的シグナルとの合成配列である HPos 配列が脂肪滴への移行に有効であることが報告された。そこで HPos 配列 (MDV LVP LLQ LLV LLL TLP LHL LAL GCW QPL FEA IGF IFS NIR IST QKE I) と pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の融合タンパク質の発現ベクターを作成した。HPos 配列に関してはヒト化コドンの塩基配列を設計し、2本鎖 DNA を全合成した。

リソソーム局在 pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質の作製

リソソーム局在膜タンパク質である LAMP-1 および LAMP-2 (ダノン病の原因遺伝子産物) のカルボキシル末端近傍に pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質を融合した発現ベクターを作成した。LAMP-1 及び LAMP-2 cDNA については、ヒト cDNA ライブラリーを用いて、PCR により増幅し、pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質をコードする DNA のカルボキシル末端に相当する領域に融合させた。

(2) 融合タンパク質の細胞内発現の確認は、細胞を回収後、1% SDS-TBS 溶液で総タンパク質を可溶化し、98、10 分で変性させた。総タンパク質を SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に移行させ、膜上の pHluorin-mKate2 タンデム蛍光蛋白質を抗 GFP 抗体、および抗 tRFP 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により検出した。

(3) 融合タンパク質の細胞内局在に関しては、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス社) および共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (オリンパス社) を用いて解析した。

(4) pH 感受性のプローブの評価については、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、細胞外に pH5.5-7.0 の緩衝液に置換してインキュベーション後、緑色蛍光を GFP フィルター、赤色蛍光を TexasRed フィルターにて、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、酸性条件になるほど、オルガネラ局在した蛍光タンパク質が緑色-赤色 2 重陽性から、赤色 1 重陽性にシフトすることで評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイトファジープローブ

マイトファジーを評価するためのプローブとして、最初にミトコンドリア局在 EGFP の局在シグナルとして、採用されているヒトのミトコンドリアのチトクロム c オキシダーゼ サブユニット VIII のアミノ末端シグナル 29 アミノ酸を局在配列として採用した。しかしながら、ウエスタンブロットにより発現を確認すると計算分子量に相当する位置にバンドが検出されるとともに、分解産物と思われるバンドが低分子量の位置に検出された。また、蛍光タンパク質の細胞内分布を調べると、ミトコンドリア様の形態を示すとともに、細胞全体に分散している蛍光が認められた。これは、EGFP に比べて、pHluorin-mKate2 融合タンパク質が約 2 倍の分子量であるためかと思われた。

その解決策として、IRES (Internal ribosomal entry site) 配列を用いて、同じミトコンドリア局在シグナルを pHluorin あるいは mKate2 にもたせた pHluorin-mito (緑色蛍光) および mKate2-mito (赤色蛍光) を一つの mRNA で発現させる系を立ち上げた。pHluorin が GFP のバリエーションであり、mKate2 も単独蛍光であれば、ミトコンドリアに局在することが知られていたためである。また、容易に安定発現株をライン化できるように、EBNA1-oriP によるエピゾーマルプラスミドを作成した。

このプラスミドを用いて、COS1 細胞に pHluorin-mito および mKate2-mito を発現させ、pH 感受性があるかどうかを調べた。その結果、pHluorin 由来の緑色蛍光と mKate2 の赤色蛍光両方でミトコンドリア様の局在をしめす蛍光像が得られた (図 3, pH7.2)。次に、pHluorin 緑色蛍光が pH 依存的に変化するかどうかを調べたところ、pH6.2 で緑色蛍光がほとんど消失し、予想どおり酸性化により緑色蛍光が減衰することがわかった。このとき赤色蛍光は pH5.2 においてもほとんど赤色蛍光の減衰は認められなかった。

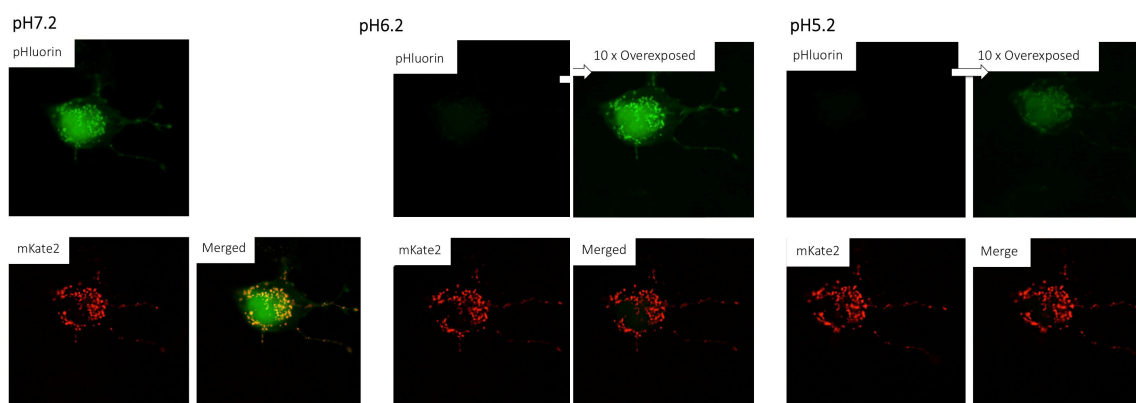


図 3 pHluorin-mito と mKate2-mito の pH による蛍光強度の変化

このことから、マイトファジーをモニターできるプローブとして利用できることがわかった。

また、pHluorin-mKate2 融合タンパク質として、ミトコンドリアに局在できないかどうかを検討するために、ミトコンドリア局在シグナルをスクリーニングしたところ、*Listeria monocytogenes* の ActA 遺伝子のミトコンドリア標的シグナルが PK プローブをミトコンドリアに局在できることがわかった。

##### (2) ペキソファジープローブ

pHluorin-mKate2のカルボキシル末端にペルオキシソームPTS1ペルオキシソーム局在配列を結合した融合タンパク質(PK-pex)をコードするcDNAをCMVプロモーターの下流に置いたPK-pex発現ベクターを作成した。PK-pexをCOS1細胞内に発現させて、ペルオキシソームへの局在を調べた。発現量が多すぎると細胞質に分布してしまう問題点があったが、ある程度細胞を選んで、測定することは可能であり、pH変化による蛍光変化も観察できた(図4)。しかしながら発現量が多すぎると細胞質に分布してしまう問題点は客観性・定量性を担保できない可能性が高く、安定PK-pex発現株で、且つ、発現量をコントロールできる発現ユニットを作成する必要がある。そこでEBNA1-OriPとTet-onシステムを導入し、エピゾーマルにプラスミドを維持でき、ドキシサイクリン依存性に発現量をコントロールできるベクターを作成した。

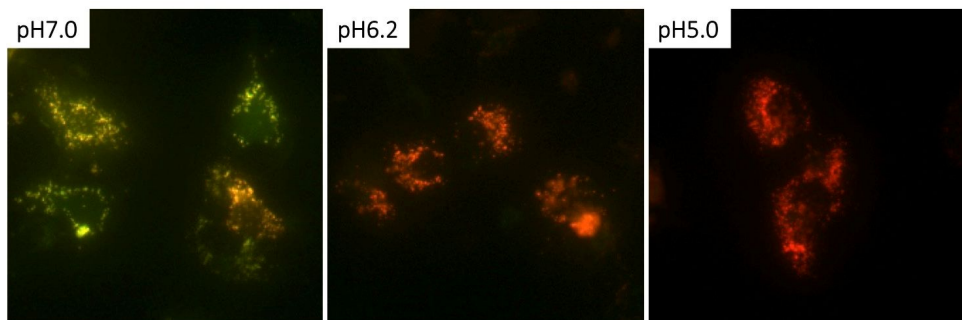


図4 COS1細胞に発現させたPK-pexプローブのpHによる蛍光変化

### (3) リポファジープローブ

脂肪滴特異的に局在する人工シグナルHPosを用いて、CAGプロモーターの下流でHPos-PK融合タンパク質をHeLaに発現させ、オレイン酸をもちいて脂肪滴を誘導し、HPos-PKが脂肪滴に局在するかどうかを調べた。その結果、脂肪滴染色色素LipidDyeと一致する形で、pHluorin緑色蛍光、mKate2赤色蛍光が観察され、HPos-PKが脂肪滴に観察された(図5)。リポファジーの良いinvitro誘導実験系が無いために、オレイン酸で脂肪滴を誘導後、オレイン酸除去による脂肪滴減少時にリポファジーが起こるか試みたが、検出可能なシグナルは検出できなかった。

また、肝細胞由来のHuh7.5.1-8はもともとある程度の脂肪滴を持っているのでmTor阻害剤のTorin1でmTorを阻害してオートファジーを誘導しても、HPos-PKプローブがリソソームに移行するようなシグナルは得られなかった。近年、過去のリポファジーの報告にいくつかの疑問点が呈せられているが、すくなくともHPos-PKではリポファジーは検出できなかった。

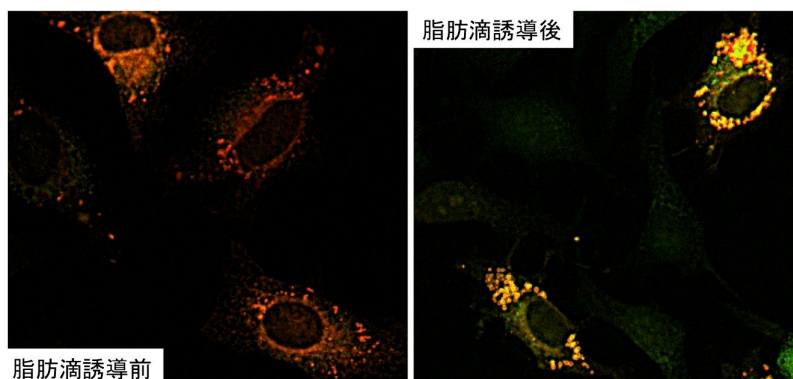


図5 HeLa細胞に発現させたHpos-PKプローブの脂肪滴局在

### (4) リソファジープローブ

リソソームに標的するためにLAMP-1およびLAMP-2とPKプローブの融合タンパク質(それぞれLAMP1-PKおよびLAMP2-PK)を作成し、これらLAMPs-PKプローブがリソソームに局在するか否かを調べた。COS1細胞にLAMP1-PK及びLAMP2-PKを発現させたところ、LAMP1-PKは発現がうまく行かなかった。LAMP2-PKは発現はするものの、部分的にリソソームに局在するものの、細胞内に凝集しているような細胞内蛍光シグナルが多く見受けられ、リソファジーを適切に評価するためには、標的シグナルの変更、あるいは、発現量の調整が必要な可能性が高い(図6)。

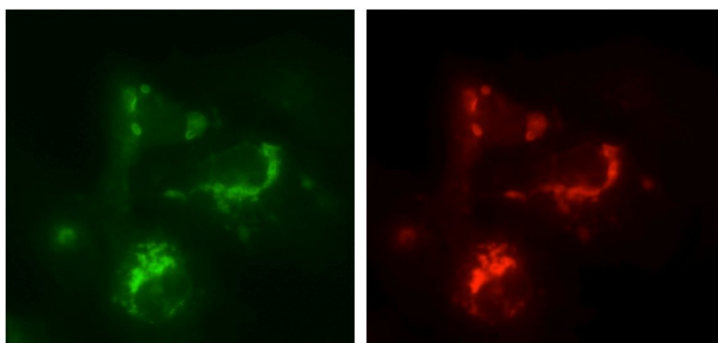


図6 COS1細胞に発現させたLAMP2-PKプローブの細胞内局在

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Chigure Suzuki, Isei Tanida, Masaki Ohmuraya, Juan Alejandro Oliva Trejo, Soichiro Kakuta, Takehiko Sunabori, Yasuo Uchiyama, Lack of Cathepsin D in the Renal Proximal Tubular Cells Resulted in Increased Sensitivity against Renal Ischemia/Reperfusion Injury, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有、20 巻 (7)、2019、E1711、DOI: 10.3390/ijms20071711.

Emiko Tanida-Miyake, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Isei Tanida, Optimization of mNeonGreen for *Homo sapiens* increases its fluorescent intensity in mammalian cells, *PLOS ONE*, 査読有、13 巻 (1)、2108、e0191108、DOI: 10.1371/journal.pone.0191108.

Isei Tanida, Takashi Ueno, Yasuo Uchiyama, Use of pHluorin-mKate2-human LC3 to Monitor Autophagic Responses, *Methods in Enzymology*, 査読有、587 巻、2017、87-96、DOI: 10.1016/bs.mie.2016.09.054.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

谷田以誠、pHluorin を用いたオートファジー評価法、シンポジウム「オートファジー研究の今、オルガネラ～細胞～組織～個体」、第 123 回日本解剖学会総会、2018

谷田以誠、角田 宗一郎、内山 安男、精密”光線-電子相関顕微鏡法からマルチカラー-CLEM へ、ワークショップ「細胞内スーパーイメージングの世界」、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

谷田以誠、小池正人、酸性 pH 感受性緑色蛍光タンパク質 pHluorin を用いたミトファジーモニタープローブの作成、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017

Isei Tanida, Takashi Ueno, Yasuo Uchiyama, Use of pH-sensitive fluorescent protein to monitor autophagic responses, the 8th International Symposium on Autophagy, 2017

### 〔その他〕

ホームページ

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=C9H0DzcAAAAJ&hl=ja>

谷田以誠、脳・神経細胞におけるオートファジーを視る、第 34 回 Wako ワークショップ「神経科学：基礎から臨床」、東京、2018

内山 安男、上野 隆、谷田 以誠、ノーベル医学・生理学賞 “オートファジー” どう影響？、首都圏ネットワーク・NHK 総合テレビ、2016

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。