

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19000

研究課題名(和文)オートファジー関連低分子化合物の標的蛋白質の探索

研究課題名(英文) Seeking for target proteins of autophagy related small chemical compounds

研究代表者

木村 朋寛 (KIMURA, Tomohiro)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90431501

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)：本研究ではオートファジー関連低分子化合物であるクロロキン、メトホルミン等の標的分子を同定し、その分子の機能と化合物の作用の関係を解明することを目的とする。TOF-MS解析の結果メトホルミン結合蛋白質MBPはHMGB1であることが明らかとなった。メトホルミンはHMGB1による炎症惹起反応を細胞レベルでのin vitroおよびマウス個体レベルでのin vivoの両方で抑制することが明らかとなった。さらにアセトアミノフェン誘導肝障害を抗HMGB1抗体と同等に軽減させることも明らかとなった。本研究によりメトホルミンの抗炎症作用の標的因子の1つが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study object is to determine target molecules of autophagy related small chemical compounds, such as chloroquine and metformin, and to elucidate the relationships between functions of the molecules and effects of the compounds. TOF-MS analysis revealed the metformin binding protein (MBP) was HMGB1. Metformin inhibited proinflammatory effect of HMGB1 in vitro and in vivo. Furthermore, metformin ameliorated liver injury induced by acetaminophen, as same as anti-HMGB1 antibody. This study elucidated one of an anti-inflammatory target molecule of metformin.

研究分野：生化学

キーワード：低分子化合物の標的蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞が栄養飢餓時に、自らの小器官をリソソームで自己消化して、アミノ酸や ATP を産生するシステムである。さらに老化小器官の消化にも用いられる。オートファジーが生じない遺伝子改変マウス等の解析により、オートファジーは多くの生体機能や疾患に深く関わっていることが明らかにされてきた。細胞内寄生菌はオートファジーによって処理される (Nakagawa et al. Science 2004) ように、感染防御に重要な働きをする。着床前の初期胚発生や新生児誕生時の栄養供給 (飢餓適応) はオートファジーによってまかなわれている (Kuma et al. Nature 2004)。さらに、がん細胞はがん組織内で条件の悪い部位でも生き延びるが、その際にオートファジーは重要な働きをする (Degenhardt et al. Cancer Cell 2006)。他にも様々な機能が明らかにされ、オートファジーの制御は多くの疾患での治療ターゲットとなっている。

このオートファジー経路を制御する薬剤がいくつか知られている。免疫抑制薬として用いられている rapamycin は、mTOR を直接抑制し、オートファジーを促進する。糖尿病治療薬メトホルミン (metformin) も、mTOR 経路を抑制することでオートファジーを促進する。当初、メトホルミンは細胞飢餓時に活性化される AMP 依存的リン酸化酵素 (AMPK) を標的とする可能性が考えられていたが、AMPK 遺伝子欠損マウスでもメトホルミンの血糖降下作用が認められたため、今日では標的分子は AMPK 以外と考えられている (Foretz et al. J Clin Invest 2010)。抗マラリア薬として広く用いられているクロロキン (chloroquine) は、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、オートファジー抑制剤として細胞生物学的実験に用いられている。また、オートファジー抑制機能のため、全身性エリテマトーデスや関節リウマチの治療薬として日本以外の世界各国で広く使用されている。しかし、クロロキンやメトホルミンなどの直接の標的分子はこれまでのところ不明である。

### 2. 研究の目的

栄養飢餓時において、栄養情報伝達の鍵因子である mTOR の活性低下はオートファジーを誘導する。オートファジーは自らの小器官をリソソームで自己消化してアミノ酸や ATP を産生するシステムであり、近年の研究によって癌や生体防御等さまざまな生体機能/病態において重要な働きをしていることが明らかになった。抗マラリア薬クロロキンにはオートファジー遮断作用が見出され、細胞実験に用いられ、さらに全身性エリテマトーデス等の治療薬として用いられつつある。一方、糖尿病治療薬メトホルミンは mTOR 経路を抑制し、オートファジーを促進する。しかし、それらの薬剤の直接の標的分子

は未だ不明であり、本研究ではそれらを同定することを目的とする。成果はオートファジーの理解を深め、より効率的なオートファジー制御薬の開発に結びつくであろう。

### 3. 研究の方法

オートファジー関連低分子化合物結合蛋白質の同定

低分子化合物結合ビーズを用いたプルダウン実験で得られた溶出液の一部を SDS-PAGE に供し、銀染色により目的の結合蛋白質を確認し、そのバンドを切り出す。切り出したゲルからタンパク質を溶出し、TOF-MS 解析により同定した。

#### 結合特異性の検証

組換え精製 HMGB1 を用いてメトホルミン結合ビーズでのプルダウン実験を行う際に、構造類似化合物であるフェンフォルミンや共通する官能基である 1 級アミンを持つプトレンおよび 6-アミノヘキサ酸を共存させ、HMGB1 の結合が阻害されるかを溶出液のウェスタンブロットング解析により確認した。

#### メトホルミンと HMGB1 の結合部位の特定

HMGB1 は A box、B box、Acidic tail の 3 つのドメインを持つ。HMGB1 を各ドメインのみもしくは一部ドメインを削除した組換え蛋白質を発現・精製した。それらを用いてメトホルミン結合ビーズでのプルダウン実験を行い、結合に必要なドメインを特定した。

細胞 (in vitro) における抗炎症作用の解析  
p38 のリン酸化を炎症マーカーとして、メトホルミンの抗炎症作用を検証した。1 μg/ml の HMGB1、Acidic tail を削除した HMGB1 (HMGB1-AT) および LPS を、濃度を変えたメトホルミンとともにプレインキュベートした後、予め播いておいた細胞 (RAW264.7 および腹腔マクロファージ) に振りかけて、1 時間後に細胞を回収した。ウェスタンブロットング法にて、リン酸化 p38、総 p38 を検出・定量した。AMPK のリン酸化も併せて検出・定量した。

#### マウス (in vivo) における抗炎症作用の解析

血中 TNF 量を炎症マーカーとしてメトホルミンの抗炎症作用を検証した。1 mg/kg の HMGB1、Acidic tail を削除した HMGB1 (HMGB1-AT) および 0.1 mg/kg の LPS を、300 mg/kg のメトホルミンとともにプレインキュベートした後、24 時間絶食後の Balb/c マウスの腹腔内に投与した。2 時間後に血液を採取し血漿中の TNF 量を ELISA 法にて定量した。

#### アミノアセトフェン誘導肝障害モデルにおけるメトホルミンの作用の解析

Balb/c マウスに 400 mg/kg のアミノアセトフェンを 350 mg/kg のメトホルミンとともに腹

腔内投与した。抗 KLH (keyhole limpet hemocyanin) 抗体、抗 HMGB1 中和抗体は 5 mg/kg で静脈注射により投与した。5 時間後に血液を採取し、血漿中の ALT 濃度を測定した。肝臓組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋、切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色して、組織観察を行った。

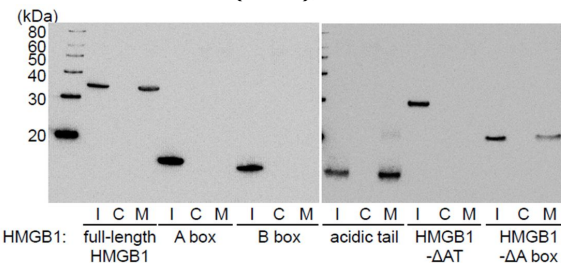
#### 4. 研究成果

本研究ではオートファジー関連低分子化合物であるクロロキン、メトホルミン等の標的分子を同定し、その分子の作用と化合物の関係を解明することを目的とする。TOF-MS 解析の結果 MBP は High mobility group box 1 (HMGB1) であることが明らかとなった(図 1)。

HMGB1 は炎症関連タンパク質であるアラミンの代表的なもの 1 つである。メトホルミンの抗炎症作用における標的蛋白質はこれまで報告されておらず、オートファジーとの関連は薄いが興味深い対象であった。

HMGB1 の遺伝子をクローニ

ングし、その遺伝子組み換えタンパク質を昆虫細胞にて大量調製した。結合実験の結果 HMGB1 とメトホルミンの特異的結合が確認された。その結合はビグアナイド構造をもつフェンフォルミンによって阻害され、1 級アミンを持つプトレシンおよび 6-アミノヘキサン酸によっては阻害されなかったことからビグアナイド構造が結合に重要であることが明らかとなった。さらに、HMGB1 のドメインごとの組換え蛋白質を昆虫細胞および大腸菌にて発現・精製してメトホルミンとの結合実験を行った結果、酸性アミノ酸に富む Acidic tail と呼ばれる領域に結合することが明らかとなった(図 2)。



I: input  
C: control beads  
M: metformin beads

図2 HMGB1ドメインのメトホルミンでのプルダウン実験

メトホルミンは細胞レベル (in vitro) で

HMGB1 による炎症惹起反応、すなわちリン酸化 p38 の上昇を抑制したが、Acidic tail を削除した HMGB1 (HMGB1-AT) による p38 の上昇は抑制しなかった。メトホルミンの抗炎症作用には結合部位が必要であった。しかし、その抑制にはメトホルミンと HMGB1 とのプレインキュベーションが必要であった(図 3)。

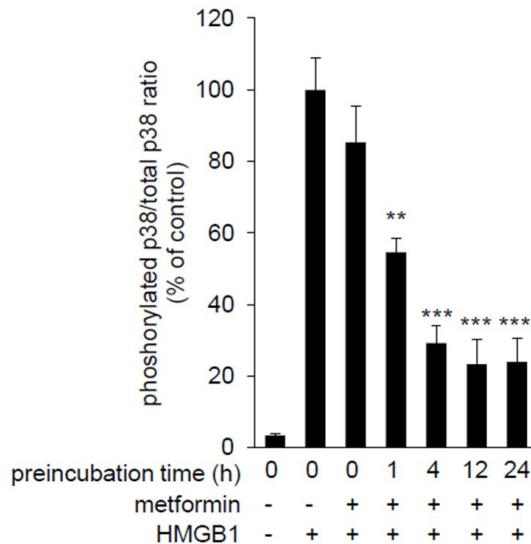


図3 HMGB1による炎症刺激に対するメトホルミンの効果

異なる受容体を介すると考えられる LPS 刺激での炎症惹起反応は抑制しなかった。また AMPK のリン酸化の程度は変化しなかった。プレインキュベーションにおける HMGB1 への変化を想定して、ジスルフィド結合の変化および分子量の変化を測定した。ウェスタンブロッティングでプレインキュベーション前後の HMGB1 を解析したが、ジスルフィド結合は保たれたままであった。また、分解も確認されなかった。プレインキュベーション前後の HMGB1 を TOF-MS 解析したが、分子量に変化は見られなかったことから、メトホルミンとの共有結合の形成は確認されなかった。マウス個体レベル (in vivo) においてもメトホルミンは HMGB1 による TNF の上昇を抑制したが、HMGB1-AT による TNF の上昇は抑制しなかった(図 4)。マウスにおいてはメトホルミンと HMGB1 とのプレインキュベーションをしたほうが高い抑制効果が見られたが、しなくても抑制が見られた(図 4)。メトホルミンは HMGB1 による炎症惹起反応を in vitro および in vivo の両方で抑制することが明らかとなった。

アセトアミノフェン誘導肝障害モデルではメトホルミンは血漿中の ALT 濃度の上昇を抑制した。その程度は抗 HMGB1 中和抗体と同等であった(図 5)。メトホルミンと抗 HMGB1 中和抗体の同時投与では付加効果は見られなかったことから、同じ作用部位 (Acidic tail) を介していると考えられた。

本研究によりメトホルミンの抗炎症作用の標的因子の 1 つが初めて明らかとなった。

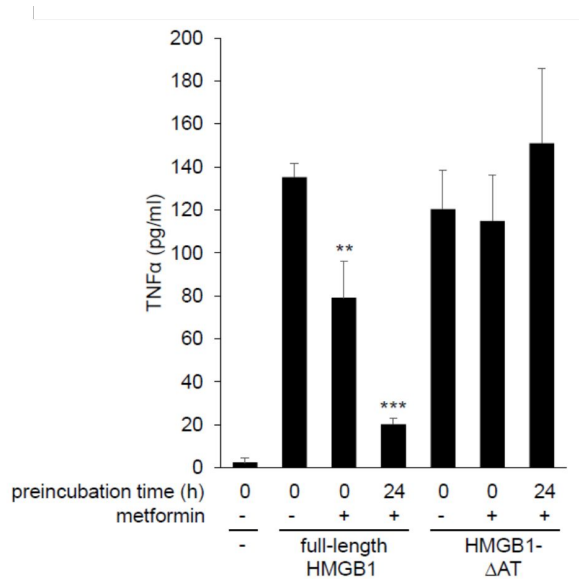


図4マウスにおけるHMGB1による炎症惹起に対するメトホルミンの効果

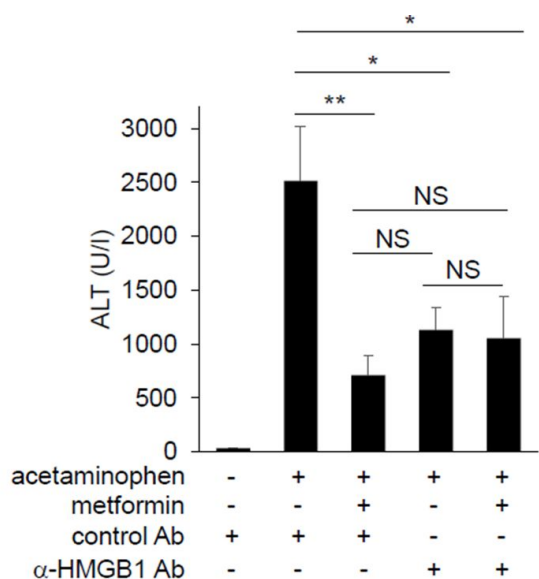


図5アセトアミノフェン誘導肝障害モデルにおけるメトホルミンの効果

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 朋寛 (KIMURA, Tomohiro)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90431501

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Horiuchi T, Sakata N, Narumi Y, Kimura T, Hayashi T, Nagano K, Liu K, Nishibori M, Tsukita S, Yamada T, Katagiri H, Shirakawa R, Horiuchi H.

Metformin Directly Binds the Alarmin HMGB1 and Inhibits its Proinflammatory Activity.

J Biol Chem. 査読有 2017 印刷中 doi: 10.1074/jbc.M116.769380.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/paper.html>