

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08528

研究課題名（和文）リソソーム - アラニンプールの代謝的意義

研究課題名（英文）Metabolic significance of lysosomal beta-alanine

研究代表者

上野 隆（Ueno, Takashi）

順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：10053373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではピリミジン異化代謝経路でウラシルから生成された β -アラニンが肝細胞のリソソームに蓄えられる機構を明らかにするのが目的であった。HepG2, BRL, Huh7などの肝細胞由来の培養系を始め、多くの培養細胞で前駆体のウラシルやウレイドプロピオン酸から β -アラニンが作られるかをアミノ酸分析やCE-MSによるメタボローム解析で検討してきたが、 β -アラニン合成量は極めて少なく、この内在性合成経路が細胞内 β -アラニン合成に寄与する可能性は非常に小さいと結論。14C標識 β -アラニンは細胞内へ速やかに取り込まれるので、外来 β -アラニンがさらにリソソームに貯留する可能性を明らかにする余地がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓のピリミジン分解で生じる β -アラニンがタンパク分解の拠点であるリソソームになぜ多いのかという疑問は、アミノ酸代謝の未知の問題として興味深く、 β -アラニンが筋収縮を活性化するイミダゾールジペプチドのカルノシンやアンセリンの材料として機能することに鑑みれば、肝リソソームでの β -アラニン貯留機構を明らかにする意義は、臓器間のクロストークという意味合いからも大きい。本研究で肝細胞での内在性 β -アラニン合成そのものを確実に捉えられずに終わった点は、生化学的アプローチで扱える酵素反応の時間軸を遥かに超えた緩慢な反応と理解できる点で予想を裏切られたという感慨である。

研究成果の概要（英文）：During the course of my research on liver autophagy I found that β -alanine, a non-proteinaceous amino acid, is abundantly present in autolysosomes and lysosomes isolated from rat and mouse livers. In view of this novel finding, I aimed at clarifying the mechanism by which endogenous β -alanine produced from uracil in the pyrimidine catabolic pathway is stored in lysosomes of many hepatocyte-derived cell lines, including HepG2, BRL, and Huh7. However, when the cells were cultured in the presence of β -alanine precursors, such as uracil and ureidopropionic acid, the amount of β -alanine synthesis was very low, and the possibility that this endogenous synthetic pathway contributes to β -alanine accumulation in the lysosome is very small. Since 14C-labeled β -alanine is rapidly taken up into the cells from the media, it is necessary to investigate the possibility that exogenous β -alanine taken up into the cells are further sequestered in the lysosome.

研究分野：タンパク分解

キーワード：ピリミジン分解 ウラシル ウレイドプロピオン酸 β -アラニン リソソーム ジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼ ウレイドプロピオナ-ゼ

1. 研究開始当初の背景

リソソームは細胞内大規模分解系としてオートファジーやヘテロファジーによるタンパク分解の拠点として働き、細胞のホメオスタシスに不可欠な役割を担う。オートファジーでは、サイトゾルタンパクに加え、ミトコンドリアやリボソーム、小胞体などを取り込んだオートファゴソームがリソソームと融合してオートリソソームに変化し、リソソームの加水分解酵素でアミノ酸に分解される。生成したアミノ酸はリソソームから細胞質へ排出されてタンパク合成に再利用されるほか、異化代謝でエネルギー産生に与る。

研究代表者はラットやマウスの肝臓のオートリソソームに存在するアミノ酸を分析する過程で、タンパク分解で生成される 20 種類のアミノ酸に加え、非タンパク性アミノ酸である β -アラニンが非常に多いことを発見した。 β -アラニンは肝臓の RNA 分解で生じるピリミジン塩基のウラシルが 2 段階の酵素反応を受けて作られる (右図)。 β -アラニンがなぜオートリソソームに多いのか、その理由やリソソームに貯留するメカニズムを明らかにすることは肝臓のピリミジン異化代謝を理解する上でも重要な意義があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓細胞質のウラシル分解経路で生成する β -アラニンがリソソームに輸送されて貯留するという仮説を実証検討することを目的とする。具体的には、肝臓や肝臓系の培養細胞系でウラシルを始めとする β -アラニン前駆体を与えたときに β -アラニンが増えるかを調べ、次にリソソームに外から加えた β -アラニンが取り込まれるかを証明する。

3. 研究の方法

(1) β -アラニン生合成経路の解析

β -アラニン生合成系の 2 つの鍵酵素であるジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼとウレイドプロピオナーゼは HepG2, BRL, RLC27 などの肝細胞由来の培養細胞に発現している。そこでこれらの培養細胞に β -アラニンの前駆体であるウラシルやウレイドプロピオン酸を 1~2mM 加えたとき、細胞内に β -アラニンが増えてくるかをアミノ酸分析、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、あるいは capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) によって解析する。前駆体存在下および非存在下で 24~48 時間培養した細胞をトリプシン処理でディッシュから剥がし、細胞を集める。得られた細胞を 3%スルホサリチル酸処理してタンパクを固定後遠心し、上清の遊離アミノ酸を集めてアミノ酸分析、あるいは HPLC によって定量する。CE-MS 解析では、ディッシュを 5%マニトールで洗浄して培地を洗い出し、洗浄液をアスピレーターで除いた後、内部標準含有のメタノールで細胞内低分子物質を抽出。分子量 3000 カットのフィルターを通した濾液を質量分析で定量する。

(2) β -アラニンの細胞への取り込み活性測定

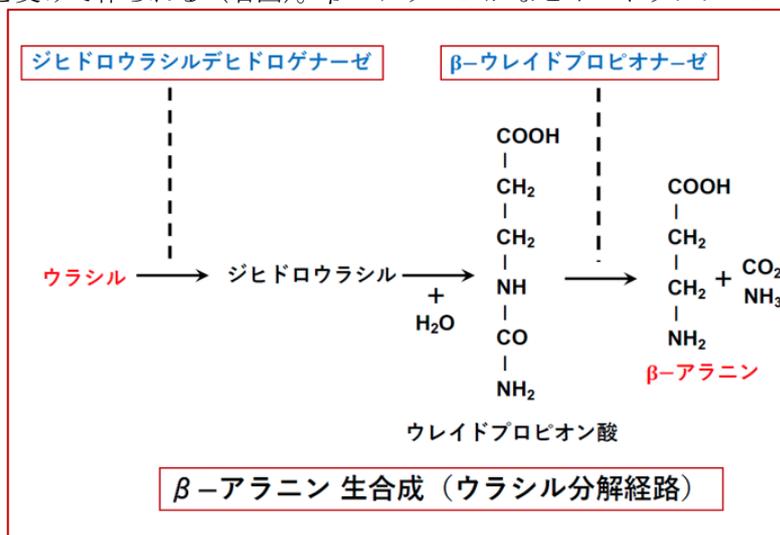
24-well plate に播いた BRL 細胞の培地に ^{14}C - β -アラニンを加えて一定時間 (4~24 時間) インキュベートし、培地を除去した後、ウェルを 20mM Na-phosphate(pH7.5)-0.15M NaCl (PBS) で洗浄。PBS を除去後 1N NaOH を加えて細胞を可溶化。可溶化画分の一定量を液体シンチレーションカウンターで測定し、細胞に留まる ^{14}C - β -アラニンの放射活性を定量する。

(3) 培養細胞からのリソソーム単離

10cm ディッシュ数枚に培養した BRL 細胞や HepG2 からセルスクレーパーで細胞を剥がして遠心回収する。沈殿の細胞ペレットにプロテアーゼ阻害剤を含む 1~2ml の抽出液 (5mM TES-NaOH (pH7.4), 0.3M スクロース) を加えて 16 gauge の注射針で 10 回ホモゲナイズ。ホモジネートを低速で遠心して核を除き、得られた post nuclear supernatant (PNS) を 45% Percoll を含む抽出液と混合して 55,000×g, 1 時間遠心する (Ueno et al. J. Biol. Chem. 274, 15222, 1999)。低層に分離されるリソソーム画分から Percoll を除いて実験に供す。

(4) リソソームへの ^{14}C - β -アラニン取り込み測定

(3) で得た分離リソソームを 20mM Tes-NaOH (pH7.4)-2mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 0.3M sucrose, 1mM ATP を含む反応液に加え、32°C インキュベーション。反応液を 0.47 μm ポアサイズのメンブレンフィルターでろ過し、5%マニトールで洗浄後メンブレンフィルターに捕捉される放射活性を液体シンチレーションカウンターで定量する。



4. 研究成果

(1) ウラシル分解経路で作られるβ-アラニン量について

BRL, HepG2, Huh7 などの肝細胞系培養細胞はもとより、C2C12, マウス胚性線維芽細胞など多様な培養系を用いて 24 時間から 48 時間までの追跡を試みたにも関わらず、ウラシルやウレイドプロピオン酸を加えてβ-アラニン量が有意に増えてくる確証は結局得られなかった。測定感度の問題を考慮して、さらに細胞内の代謝産物特定に優れた CE-MS による高感度の定量解析を試みた。細胞を富栄養条件で培養した場合、また、栄養飢餓条件においてオートファジーを亢進させた場合、いずれの条件下でもウラシルやウレイドプロピオン酸を加えた効果は認められなかった。CE-MS では細胞内のウラシルとウレイドプロピオン酸は測定できていて、培地に加えたこれら前駆体が細胞内に取り込まれないという技術的な問題は否定できている。したがって、現段階では 2 つの前駆体から細胞質のウラシル分解経路が働いてβ-アラニンが作られる反応が極めて緩やかであると考えるのが妥当である。最終的に内在性代謝経路が働いてリソソームに貯留するβ-アラニンを合成する可能性が有るとしても、1 週間あるいは 1 ヶ月というようなオーダーでの反応にならざるを得ないと推察できる。

(2) 栄養としてのβ-アラニンの利用とリソソームへの貯留について

ウラシル異化経路ではない形で、外来性β-アラニンが細胞に取り込まれる可能性について解析を行った。ここではそもそも外来性のβ-アラニンがどのような形で供給されるかをまず考えなければならぬが、その手がかりはラットやマウスを飼育する際の固形飼料すなわち standard chow に求められる。固形飼料を乳鉢で擦り潰し、PBS で抽出した後スルホサリチル酸でタンパクを変性させて遠心で除く。上清の低分子をアミノ酸分析計で測定したものが右表である。固形飼料に含まれる遊離アミノ酸のうち実に 0.8% を占めることが判明した。このことから、動物の餌に含まれるβ-アラニンが代謝的に利用されることが稀だという事情で肝臓に到達し、肝細胞のリソソームに輸送されて濃縮され留まる可能性は有りそうだとと言える。

そこで肝細胞にβ-アラニンが輸送される仕組みをまず調べたところ、培地に加えた¹⁴C-β-アラニンは時間とともに数時間まで直線的に増えていくことが確認できた。β-アラニンの輸送系については、SLC6A14 が報告されている (Anderson et al. J Physiol. 4061, 2008)。この輸送は Na に依存してβ-アラニンの

| 乾燥重量0.12gあたりの餌に由来する遊離アミノ酸組成 | | |
|-----------------------------|--------|------------|
| 遊離アミノ酸 | nmol | total nmol |
| taurine | 41.733 | 177.8 |
| aspartic acid | 1.422 | 6.1 |
| threonine | 10.772 | 45.9 |
| serine | 18.024 | 76.8 |
| asparagine | 89.708 | 382.2 |
| glutamic acid | 78.096 | 332.7 |
| glutamine | 18.569 | 79.1 |
| sarcosine (methylglycine) | 1.83 | 7.8 |
| glycine | 31.082 | 132.4 |
| alanine | 82.125 | 349.9 |
| valine | 15.129 | 64.5 |
| methionine | 81.809 | 348.6 |
| isoleucine | 8.06 | 34.3 |
| leucine | 9.752 | 41.6 |
| tyrosine | 6.013 | 25.6 |
| phenylalanine | 9.205 | 39.2 |
| beta-alanine | 5.269 | 22.4 |
| hydroxylysine | 1.202 | 5.1 |
| ornithine | 5.754 | 24.5 |
| lysine | 16.766 | 71.4 |
| 1-methylhistidine | 0.635 | 2.7 |
| histidine | 7.655 | 32.6 |
| anserine | 4.309 | 18.4 |
| carnosine | 0.342 | 1.5 |
| arginine | 56.304 | 239.9 |
| hyproxyproline | 0.611 | 2.6 |
| proline | 55.594 | 236.9 |

| β-アラニン輸送活性 (BRL細胞) | 40分あたりの取り込み (nmol/mgタンパク) |
|--------------------|---------------------------|
| 対照 | 23.0 |
| 1 mM glycine存在下 | 16.0 |
| 5 mM glycine存在下 | 12.6 |

他ロイシンやリシンも輸送すると報告されている。今回調べた BRL 細胞や BHK-21 細胞では細胞への取り込みがグリシンで抑制されるが、リシンの影響が認められなかった。SLC6A14 の特性とは若干異なる (左表)。今後阻害剤などの影響をさらに検討してトランスポーターの性質を明らかにしなければならない。

一方、細胞に取り込まれたβ-アラニンがさらにリソソームに輸送されるシステムを明らかにすることはさらに重要な課題となる。3 の研究方法の項で述べたメンブレンフィルター法で条件をいろいろ変えて輸送活性の測定を試みているが、今のところまだポジティブなデータは得られていない。次のステップとして課題申請を行い、リソソームβ-アラニンプールのメカニズムを解明しなければならないと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ueno T and Komatsu M | 4. 巻 1880 |
| 2. 論文標題 Measuring Nonselective and Selective Autophagy in the Liver. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 535-540 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8873-0_34. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 上野 隆、数野彩子、平岡由佳、三浦芳樹 |
| 2. 発表標題 リソソーム アラニンの代謝的意義 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 数野 彩子 (Kazuno Saiko) (00338344) | 順天堂大学・大学院医学研究科・助教 (32620) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|