

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611007

研究課題名 (和文) 小分子化合物による液胞形成機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of vacuole formation by small organic molecules

研究代表者

川添 嘉徳 (KAWAZOE YOSHINORI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：20402927

研究成果の概要 (和文)：研究代表者は、細胞に巨大な液胞を形成させる化合物を見出した。この化合物の作用機構を明らかにすることによって、液胞形成機構を解明することを目的とした。まず、液胞の由来を明らかにする目的で、各種オルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いて、免疫染色を行った所、AAE1 および M6PR という初期・後期末期エンドソームの局在が変化していた。そこで、生細胞におけるエンドソームの形態を観察したところ、エンドソーム同士の融合を介してエンドソームが巨大化していることを明らかにした。さらにこの化合物は、オートファジーをも誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：I discovered a small organic molecule that induces a huge vacuoles in mammalian cells. The aim of this study is elucidating a molecular mechanism of vacuolation by means of this compound as a tool. To examine the vacuole origin, I conducted a immuno-fluorescence microscopic study and found that localizations of AAE1 and M6PR, early and late endosome marker protein, respectively, was different from those under normal state. And I found that endosomes are enlarged by fusion each other. Furthermore, the compound was appeared to induce autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：オルガネラ形成、液胞、小分子有機化合物

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する基本単位は細胞であり、例えばヒトはおおよそ 60 兆個の細胞から成り立っていると言われている。しかし、細胞の内部は決して均一なものではなく、オルガネラと呼ばれる構造物が発達している。オルガネラも近年の研究から決して静的なものではなく、常に消失と生成、形態変化を繰り返す

イナミックな動きをする構造体であることが明らかにされつつある。特に液胞は、エンドソームやリソソーム、小胞体・ゴルジ体からの膜小胞と絶えず融合を繰り返していることが知られている。液胞に内在する分子装置に関してはその解明が進んでいるが、その形成と融合のダイナミクスがどのように維持されているのかについては未解明な部分

が多く、細胞生物学的にも非常に重要な課題の一つであった。

2. 研究の目的

上記課題に対するアプローチとして、研究代表者は小分子有機化合物の利用を提案する。申請者は今回、細胞ベースのスクリーニングを実施し、一万二千個の化合物の中から細胞に大きな液胞を誘導する化合物を三つ見出した(図1)。このうち、非常に構造の良く似ている二つの化合物、**106C9**・**106E9**について、双方の特徴を併せ持つような化合物、**VA**を合成した(図2)。そこで本研究計画においては、本化合物 **VA** を道具として利用することによって、液胞形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 液胞膜の由来の解明：スクリーニングヒット(図1)から誘導展開を行った化合物 **VA**(図2)は、細胞に巨大な液胞を形成させる(図3)。そこでまずは、この液胞の由来を明らかにするために、各種オルガネラ(原形質膜、核、ミトコンドリア、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム)のマーカートンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行い、化合物処理によってその局在が変化するかどうかを観察した。

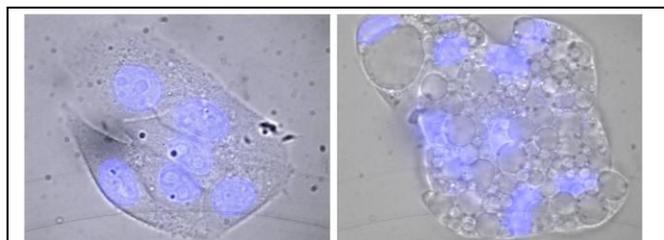
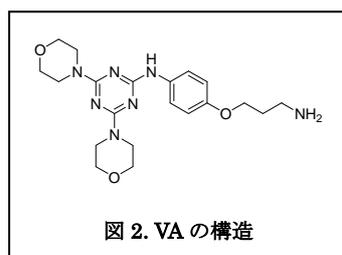
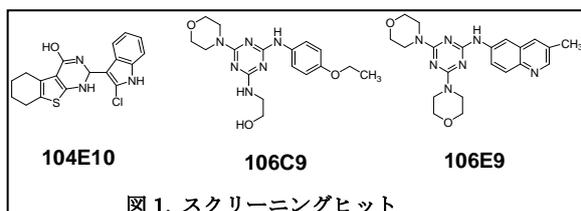


図3. VAによる液胞形成 VA未処理(左)、処理後24時間(右)のHepG2細胞。ヘキストで核を染色している。

(2) 生細胞におけるエンドソームの観察：蛍光標識したトランスフェリンを用いて生細胞におけるエンドソームの形態を観察した。さらに、赤・緑の二色を用いた蛍光標識トランスフェリンによるパルス・チェイス実験を行った。

(3) VAによる、オートファジーの誘導：オートファジーとは細胞内の大規模分解装置であり、飢餓状態をはじめとした様々なストレスで引き起こされることが知られている。オートファジーは、LC3タンパク質の特異的な脂質付加を介したプロセッシング、及び同じくLC3タンパク質のオートファゴソームと呼ばれる独特な細胞内小器官への局在によって特徴付けられる。そこで、本化合物処理によるLC3タンパク質のプロセッシング、及び局在を、抗LC3抗体を用いたウェスタンブロッティングと間接蛍光抗体法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 液胞膜の由来の解明：化合物VA処理、未処理のHepG2細胞を用いて、Bcl-2(ミトコンドリア)、EEA1(初期エンドソーム)、GM130(ゴルジ体)、インテグリン(原形質膜)、Lamp1(リソソーム)、LC3(オートファゴソーム)、M6PR(後期エンドソーム)、スクレオポリン(核)の各オルガネラマーカートンパク質に対する抗体で免疫染色を行った。ほとんどのマーカートンパク質の局在は、化合物VAの処理、未処理に関わらず変化は認められなかったが、EEA1、M6PR、及びLC3の局在が変化していた。以上のことから、初期・後期エンドソーム及びオートファゴソームが化合物VAによる液胞形成に関与している可能性が示唆された(図4)。

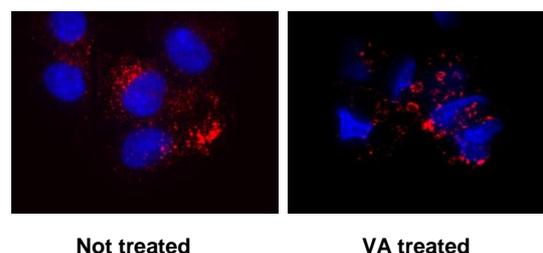


図4. VA処理によるエンドソームマーカートンパク質(EEA1)の局在変化

(2) 生細胞におけるエンドソームの観察：(1)で示した化合物VAによるエンドソームマーカの局在変化をさらに検証するために、蛍光色素標識したトランスフェリンを利用することによって、生細胞でのエンドソームの形態を確認した。その結果、化合物VA

の処理によってエンドソームが肥大化することが明らかとなった (図 5)。

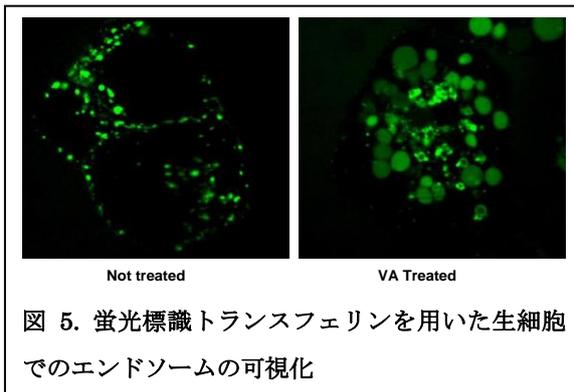


図 5. 蛍光標識トランスフェリンを用いた生細胞でのエンドソームの可視化

エンドソームが肥大化するには、二つの可能性が考えられる。すなわち、1) 各々のエンドソームが個別に肥大化する、あるいは 2) 複数のエンドソームが融合することによって肥大化する、である。これらの可能性を検討するために、二色の蛍光色素で標識されたトランスフェリンを用いて、パルス・チェイス実験を行った。まず緑色標識トランスフェリンを用いて細胞をラベルしたのち(図 5 の状態)、赤色標識トランスフェリンでさらにラベルした。標識トランスフェリンを除いてさらに培養を続け、顕微鏡下で観察した。可能性 1) であれば、緑あるいは赤に染色されたエンドソームが観察されるはずである。可能性 2) ならば、緑と赤の両方に染色されたエンドソームが観察されると考えられる。観察の結果、緑と赤の両方に染色されたエンドソームが見られたことから、可能性 2)、すなわちエンドソームの肥大化は融合を介して行われる

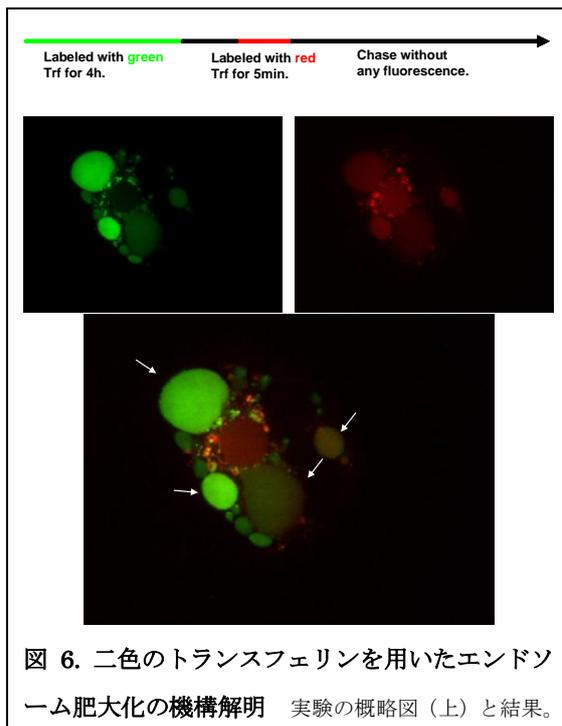


図 6. 二色のトランスフェリンを用いたエンドソーム肥大化の機構解明 実験の概略図(上)と結果。

ことが明らかとなった (図 6)。

(3) VA による、オートファジーの誘導：これらの過程で、化合物 VA はオートファジーを誘導することが明らかとなった。オートファジーは、LC3 タンパク質のオートファゴソームと呼ばれる独特な細胞内小器官への局在、及び同じく LC3 タンパク質の特異的な脂質付加を介したプロセッシングによって特徴付けられる。そこで、本化合物処理による LC3 タンパク質の局在及びプロセッシングを抗 LC3 抗体を用いた関節蛍光抗体法とウェスタンブロッティング法にて検討した。まず、間接蛍光抗体法の結果であるが、化合物 VA の処理によって、LC3 の局在が変化し、細胞質に拡散していた LC3 が輝点を形成するように局在している (図 7)。これは、オートファゴソームに特徴的な局在であると考えられた。

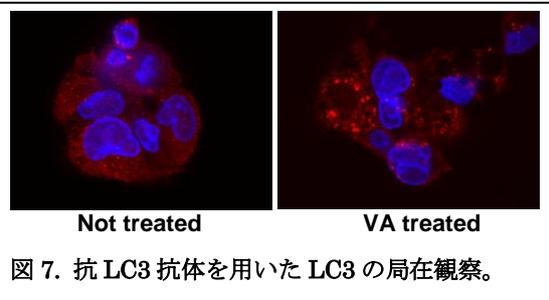


図 7. 抗 LC3 抗体を用いた LC3 の局在観察。

さらに、LC3 のプロセッシングを抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって確認したところ、化合物 VA の処理によって LC3 のプロセッシングが時間依存的に増加していた(図 8)。これらのことから、化合物 VA は、オートファジーも誘導すると考えられた。

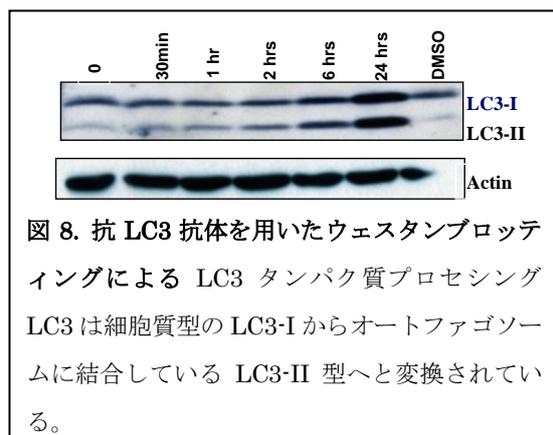


図 8. 抗 LC3 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる LC3 タンパク質プロセッシング LC3 は細胞質型の LC3-I からオートファゴソームに結合している LC3-II 型へと変換されている。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Murata, A., Sato, S., Kawazoe, Y., and Uesugi, M. Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets. *Chem. Commun.* 査読有 **47**, 4712-4714, (2011)

②Shirakawa, T., Kawazoe, Y., Tsujikawa, T., Jung, D., Sato, S., and Uesugi, M. Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK. *J. Biol. Chem.* 査読有 **286**, 4003-4010, (2011)

③Murai, R., Yoshida, Y., Muraguchi, T., Nishimoto, E., Morioka, Y., Kitayama, H., Kondoh, S., Kawazoe, Y., Uesugi, M., and Noda, M. A novel screen using the Reck tumor suppressor gene promoter detects both conventional and metastasis-suppressing anticancer drugs. *Onco Target* 査読有 **1**, 252-264 (2010)

④Kamisuki, S., Mao, Q., Abu-Eliheiga, L., Gu, Z., Kugimiya, A., Kwon, Y., Shinohara, T., Kawazoe, Y., Sato, S. Asakura, K., Choo, H., Sakai, J., Wakil, S.J., Uesugi, M. A Small Molecule that Blocks Fat Synthesis by Inhibiting the Activation of SREBP. *Chem. Biol.* 査読有 **16**, 882-892 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川添 嘉徳 (KAWAZOE YOSHINORI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：20402927