

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06178

研究課題名(和文)オートファジーの活性制御に関わる代謝物の検索と制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation mechanism of autophagy by metabolites

研究代表者

船越 智子(石井智子)(Funakoshi, Tomoko)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：90318460

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)：オートファジーは真核生物に広く保存された自己成分を分解する機構である。オートファジー自体が代謝中間体あるいは代謝産物によって制御される可能性が示唆されていた。オートファジー可視化リポーター、セミインタクト・リシーリング技術を組み合わせてオートファジー解析系を構築した。代謝中間体標品ライブラリーのスクリーニングで得られた一候補については、その細胞透過型を化学合成し、その効果がリソソーム機能抑制に起因していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーの生理機能とその重要性が示されてきたが、分子機構の詳細は不明な点が多く残されている。代謝中間体や代謝産物によるオートファジー活性制御についても明らかにされつつある。本課題では、新たなスクリーニング系を構築し、オートファジー活性を変化させる代謝中間体標品を複数同定した。これらの効果標的の解析を通して、オートファジーの代謝中間体による制御機構について知見を得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a mechanism for degrading self-components that is conserved in eukaryotes. It has been suggested that autophagy itself may be regulated by metabolic intermediates or metabolites. I constructed an autophagy analysis system by using an autophagy visualization reporter and semi-intact resealing technology. One candidate, obtained by screening a library of metabolic intermediate samples, was chemically synthesized in its cell-permeable form. The effect was found to be mediated by suppression of lysosomal function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：代謝中間体 代謝産物 オートファジー セミインタクト・リシール法 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内成分の分解機構の一つである。オートファジーを駆動する主要分子群(ATG タンパク質群)を中心とした研究が推進され、オートファジーと生理機能や病態との関連が明らかにされてきた。所属研究室では、メタボロームやリポドーム解析から、オートファジーが選択的なタンパク質分解を介して、糖、アミノ酸、脂肪酸代謝を制御することが明らかにされていた。細胞内代謝機構には代謝中間体や代謝産物によるフィードバック制御が存在するため、オートファジーに関しても、これまで知られていない代謝中間体や代謝産物による制御機構が存在する可能性がある。しかしながら、その解析の困難さから代謝中間体によるオートファジー制御についての包括的な解析はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

代謝中間体、代謝産物によるオートファジー制御に関して、包括的な解析はほとんど行われていなかった。本課題では、まず独自のスクリーニング法の構築を試み、代謝中間体標品ライブラリーのスクリーニングを実施し「オートファジーを制御し得る代謝中間体候補の同定」を行う。さらにヒット代謝中間体の作用機序について検証し、代謝中間体によるオートファジー誘導あるいは抑制のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

オートファジーリポーターと、セミインタクト・リリーシング技術を利用して独自のスクリーニング法を構築した(図1)。オートファジーリポーターとして、2種類の蛍光タンパク質、RFPとGFPをLC3のアミノ末端に繋いだ融合タンパク質(tandem

fluorescent-tagged LC3、以下 tfLC3)を利用した。tfLC3はオートファジー研究に多く用いられた実績がある。オートファジーの進行を tfLC3 の GFP と RFP の蛍光輝度比の変化として捉えることができる(図2)。

細胞膜に微小な穴をあけたセミインタクト細胞に、個々の代謝中間体標品と tfLC3 を発現させた細胞から調整した細胞質を同時に導入したのち、穴を閉じてリリーシング細胞とした(図1)。tfLC3 を発現させた細胞から遠心分離によ

って調整した細胞質画分には膜結合型 tfLC3 は含まれない。リリーシングまでの間に導入された tfLC3 の RFP/GFP 蛍光輝度比の上昇(もしくは GFP/RFP 蛍光輝度比の減少)はオートライソソームに取り込まれた tfLC3 の増加、つまりオートファジーの進行の程度を示すことが想定される。Torin1、Bafilomycin を導入した場合、それぞれオートファジーの誘導、抑制効果が確

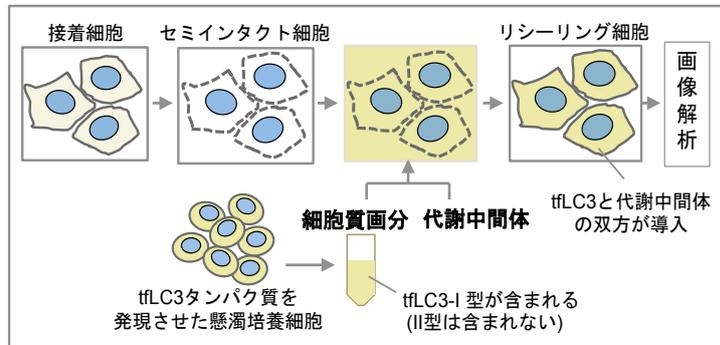


図1 セミインタクト・リリーシング法
代謝中間体とオートファジーリポーターtfLC3(I型)を含む細胞質はリリーシング細胞に直接同時に導入することができる。

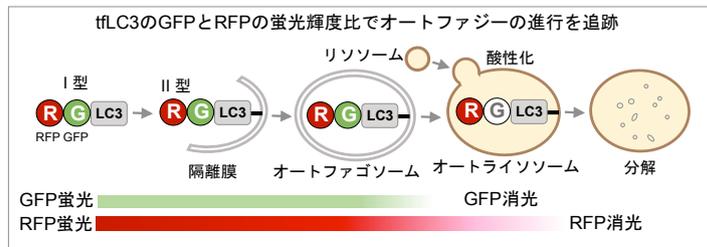


図2 代謝中間体によるオートファジー活性への影響
tfLC3(I型)のRFPとGFPの酸性条件下での安定性の違いを利用してオートファジーの進行を数値化できる

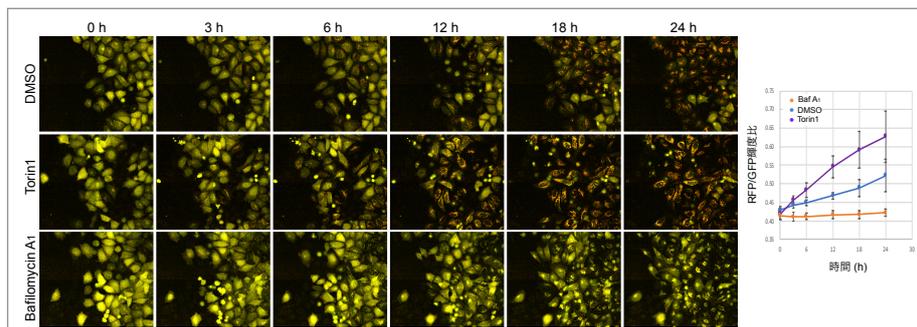


図3 リリーシング細胞の蛍光画像と tfLC3 の RFP/GFP 輝度比の変化

Torin1, Bafilomycin A1, DMSO(溶媒)をリリーシング細胞に導入した後24時間のRFP/GFP輝度比の変化。

認められた (図 3)。本アッセイ系を利用してリシーリング細胞の蛍光画像を継時的に取得し、各代謝中間体標品によるオートファジー活性への影響を検証した (図 3)。

4. 研究成果

セミインタクト・リシーリング技術を利用したスクリーニング法を構築した (図 1, 3)。本スクリーニング法を利用して、134 種の代謝中間体標品からなるライブラリーをスクリーニングし、オートファジーを促進する代謝中間体 1 種 (図 5-A)、抑制する代謝中間体 5 種 (図 5-B~F) を得ることができた。

この 6 候補の中でも、リシール直後から 18 時間後まで抑制効果が認められた 1 種 (図 5-E) に着目して解析を進めた。本代謝中間体の細胞膜透過型を化学合成して、通常培養細胞に対する効果を **tfLC3 の蛍光輝度値** や、**オートファジーの指標となるタンパク質のウェスタンブロット** により検討し、濃度依存的な抑制効果を確認した。リソソーム活性への影響をプロテアーゼで切断されると蛍光を発する DQ-Red-BSA を用いて検証した。

リソソーム機能を阻害する Bafilomycin A1 や塩化アンモニウムによる顕著な抑制効果に比較すると弱いながら、膜透過型によって溶媒のみのコントロールの約 70%まで DQ-Red-BSA 由来の蛍光輝度値が低下した。本膜透過型の抑制効果は、リソソーム活性抑制、もしくはオートファゴソームとリソソームの融合過程に作用する可能性がある。

他のヒット代謝中間体 5 種のうち 1 種は、通常培養細胞に対しても濃度依存的にオートファジーへの効果が認められた。

これらヒット代謝中間体についての検証を通して、代謝中間体によるオートファジー制御メカニズムについて新たな知見が得られることが期待される。

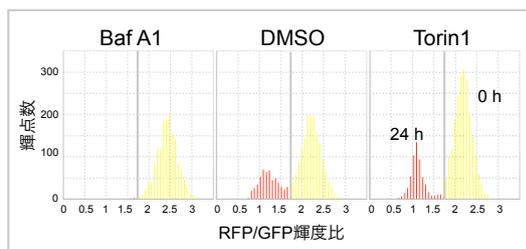


図 4 GFP/RFP 輝度比のヒストグラム

Torin1 を導入直後(黄)と 24 時間後(赤)はほぼ完全な 2 つのピークに分かれるため、一定以下の値 (この場合 1.7) はオートライソソームに取り込まれたことが示唆される。Bafilomycin A1 を導入した場合には一定以下の GFP/RFP 比 (この場合 1.7) の輝点はほとんど認められない。

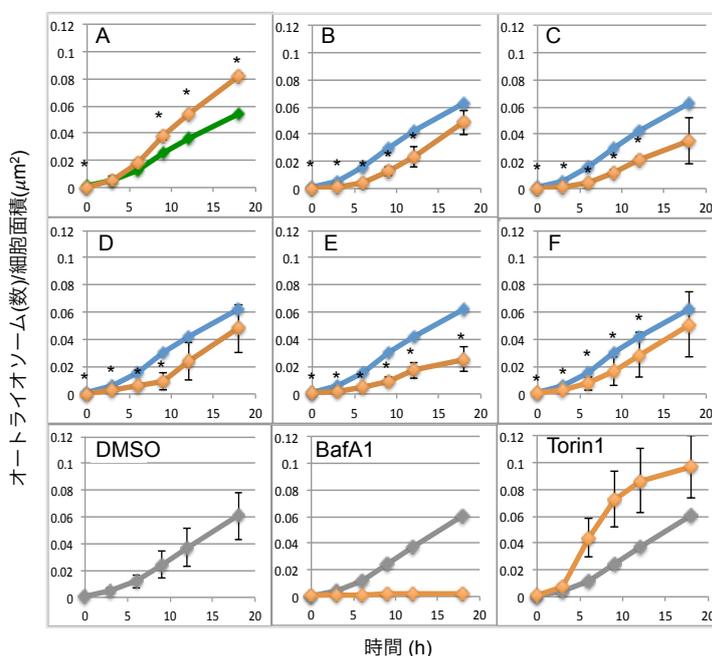


図 5 代謝中間体によるオートファジー活性への影響

細胞面積あたりのオートライソソーム数の継時的変化を示す。オートライソソーム数は GFP/RFP 比から規定した (図 4 参照)。オレンジ: 代謝中間体 (A~F)、Bafilomycin A1, Torin1。緑, 青, 灰色: 各溶媒の結果を示す。

代謝中間体によるオートファジー制御メカニズムについて新たな知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------