

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282236

研究課題名(和文) 内因性低分子が切り拓くオートファジー誘導機構の研究

研究課題名(英文) Roles of endogenous small molecule in autophagy induction

研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO, Hirokazu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60262789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは恒常性維持や疾患抑制に貢献する細胞内分解系である。大部分のオートファジーは、分解対象を選ばないが、一部に選択的オートファジーが知られている。選択性発現の分子メカニズムを解明することは、オートファジーを理解する上で極めて重要である。本研究では、私たちの体で作られる(=内因性)の小分子が、選択的オートファジーに関与するか調べた。細胞内に侵入した細菌の周囲に、内因性8-ニトロcGMPによる修飾が集積することが判明し、この集積とユビキチン化、細菌排除とのあいだに津良い相関が見られた。このことから、細菌排除の選択性を決定する初期の段階でマーカーとして働いていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a major intracellular degradation system that serves to maintain homeostasis and to suppress disease progression. Majority of autophagy processes are believed to be non-selective but there are some exceptions. These selective autophagy processes must have different mechanism from canonical autophagy. We have examined in this study whether endogenous small molecules are involved in the selection mechanism. Under the inflammation conditions by bacterial infection, a nitrated nucleotide: 8-nitro-cGMP forms in the host cells. I found this nucleotide accumulated around the invading bacteria cells (group A streptococcus) and this accumulation was found to be an early marker for selective autophagic degradation of the bacterial cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：オートファジー 細菌感染 8-ニトロcGMP

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) オートファジーは、基本的に選択性に乏しいバルク分解系であると考えられてきた。しかし、1990年代後半から2000年代前半にかけて、一部の細胞内基質が選択的に分解されることが次々に報告された。例えば、2004年に中川、吉森らは、細胞内に侵入したA群連鎖球菌が、オートファジーによって選択的に除去されることを見出した。
- (2) これまでに選択的分解が報告された基質は、病原体を始め、私たちの生存に深く関係するものである。したがって、これら選択的分解機構の解明は、疾患の抑制にも貢献すると考えられている。
- (3) オートファジーのプロセスでは、隔離膜と呼ばれる膜が細胞質において成長し、周囲の物質を巻き込んだ小胞であるオートファゴソームを形成する。オートファゴソーム膜の起源は、ミトコンドリアとERが接触する部分にあると言われており、この場合は周囲にどのような物質があるかは考慮されていないようである。一方で、選択的オートファジーにおいては、分解されるべき基質の周囲で隔離膜が伸長する必要がある。しかし、その詳細は、ほぼ未解明のまま残されている。
- (4) 分解されるものを認識する機構は、多様性に富むと予想されるが、一度、「排除すべし」と認識された基質には、なんらかの目印が付加されると考えることもできる。実際、これまでに知られている選択的オートファジーの基質の多くがユビキチン化を受けることが知られている。ユビキチン化は、ユビキチンリガーゼと呼ばれる酵素によって行われるため、このリガーゼが、分解されるべき基質のなんらかの特徴を認識していると考えられる。
- (5) ユビキチン化には、ユビキチン鎖のタイプによって多様性がある。このなかで、どのようなユビキチン鎖がオートファジーと関連するかは、よくわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

特に感染症や炎症の条件下における選択的オートファジーに着目し、その分子基盤に内因性小分子がどのように関わるか調べた。

### 3. 研究の方法

- (1) バクテリア成分であるLPSによって誘導されるオートファジーにおいて、一酸化窒素や活性酸素が重要な役割

を果たすというGottliebらの報告(2009年)を参考にして、ニトロ化された内因性分子に着目した。

研究代表者らは、過去の科研費課題において8-ニトロ cGMPの機能を解析してきたので、本研究課題でも引き続き、この分子から解析を始めた。

- (2) オートファジーの評価は、LC3陽性のドット状の構造を、免疫細胞化学、もしくは、EGFP融合LC3を用いたライブ観察によって検出し、細胞当りの数を指標におこなった。このとき、オートファジー後段の阻害もドット状構造の増加を示し、両者を区別する必要がある。そこで、オートファゴソームの分解を止めた条件で、さらに化合物によるLC3陽性ドットが増加するかも合わせて確認した。
- (3) 用いる細胞は、主にマクロファージ様細胞株であるRAW264.7を用いた。一部の実験は、マウス骨髄から調整した初代培養マクロファージを用いて行った。
- (4) 細胞に感染させる細菌として、A群連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes* JRS-4)を用いた。この菌株は、前述の中川、吉森らの2004年の論文で使用したものと同一であるため、結果の比較が可能と考えたからである。
- (5) 細菌の排除効率は、インベージョンアッセイによって行った。感染後、各測定時間において、感染細胞を破壊し、内部の細菌を回収する。これをプレート上で培養し、出現するコロニー数から元の生菌数を知る方法である。
- (6) 細胞内侵入細菌の顕微鏡観察は、各種の免疫細胞化学により行った。S-グアニル化の検出には自製抗体を、ユビキチン鎖の検出などは、市販抗体でおこなった。

### 4. 研究成果

- (1) 中川らが報告したA群連鎖球菌感染系において、細胞内で8-ニトロ cGMPが生成することを確認した。
- (2) 細菌感染をおこなっていない培養細胞に、外部から8-ニトロ cGMPを投与するとLC3陽性のオートファゴソームが形成されることがわかった。このオートファジー誘導は、マクロファージ以外に、ヒト肺がん由来細胞株であるA549でも観察された。
- (3) 一酸化窒素の合成に関わるiNOS欠損マクロファージを用いると、細菌排除は遅延した。この効果は、リソソーム阻害剤で抑制されることから、一酸化窒素がリソソーム系に作用していることが明らかになった。これまで、一酸化窒素や活性酸素は、直接的な殺菌作用が主と考えられてきたので、興味深い知見と言える。
- (4) A群連鎖球菌を感染させた培養細胞に、外部から8-ニトロ cGMPを投与すると、細菌排除が促進された。
- (5) 外部から8-ニトロ cGMPを投与しない条

件で、細菌感染細胞を顕微鏡観察すると、8-ニトロ cGMP によるタンパク質修飾である「S-グアニル化」が細菌の周囲に集積していた。

- (6) 阻害剤によって内因性の8-ニトロ cGMP の生成を抑制すると、細菌周囲のユビキチン化修飾が抑制された。一方、ユビキチン化の阻害剤によって、これを抑制しても、細菌周囲のS-グアニル化修飾は抑制されなかった。このことは、S-グアニル化が、初期の目印となって、引き続く、基質選択的ユビキチン化を促進していると考えられる。この結果から、本研究の主たる目的である選択的オートファジーの分子機構について、一端を明らかにすることができた。
- (7) オートファジー関連タンパク質のうち、この選択的オートファジーに関与するものを割り出すため、各種のノックアウト株を用いて検討した。Atg5, LC3 (Atg8 ホモログ)が必要であることなどを明らかにした。

#### 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 1件)

Ito, C.; Saito, Y.; Nozawa, T.; Fujii, S.; Sawa, T.; Inoue, H.; Matsunaga, T.; Khan, D.; Akashi, S.; Hashimoto, R.; Aikawa, C.; Takahashi, E.; Sagara, H.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Akaike, T.; Nakagawa, I.; Arimoto, H., Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria, *Molecular Cell*, 査読有, 52巻, 2013, 794-804  
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.024

[学会発表](計 12件)

有本 博一、S-グアニル化を起点とする細胞内分解経路, 第11回 レドックス・ライファイノベーションシンポジウム, 2016年3月18日, お茶の水女子大学, 東京都文京区

有本 博一、内因性ヌクレオチドが関与する選択的オートファジーの分子機構, 日本農芸化学会 第150回 東北支部大会 シンポジウム, 2015年10月3日, 東北大学, 宮城県仙台市

有本 博一、細菌感染症克服にむけ

た化学生物学研究, 平成27年度 化学系学協会 東北大会 有機化学コロキウム, 2015年9月13日, 弘前大学, 青森県弘前市

有本 博一、内因性低分子による選択的オートファジーの制御機構, 第50回 天然物談話会, 2015年7月3日, グリーンピア岩沼, 宮城県岩沼市

ARIMOTO, Hirokazu, Roles of 8-nitro-cGMP in autophagy regulation, The 7<sup>th</sup> International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications, 2015年6月20日, トリーア市, ドイツ

有本 博一、細菌感染症克服にむけた化学生物学研究, 日本化学会 第95春季年会, 2015年3月26日, 日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部, 千葉県船橋市

ARIMOTO, Hirokazu, Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria, The 4<sup>th</sup> Joint Campus Asia Symposium, 2014年11月27日, 東北大学, 宮城県仙台市

有本 博一、内因性ニトロ化ヌクレオチドがオートファジー制御に果たす役割, 第87回 日本生化学会大会 シンポジウム: 新しい側面を見せるオートファジー: その高次機能に迫る, 2014年10月16日, 国立京都国際会館, 京都市

ARIMOTO, Hirokazu, Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria, The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014年9月23日, 奈良県新公会堂, 奈良県奈良市

ARIMOTO, Hirokazu, Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria, Nitric Oxide-Nitrite/Nitrate Conference, 2014年6月18日, クリーブランド市, アメリカ合衆国

有本 博一、ニトロ化ヌクレオチドがオートファジー制御に果たす役割, 新規素材探索研究会 第13回セミナー, 2014年6月6日, 新横浜フジビューホテル, 神奈川県横浜市

ARIMOTO, Hirokazu, Endogenous Nitrate Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and Innate Defense against Bacteria, Gordon Research Conferences: Autophagy in Stress, Development & Disease, 2014年3月19日、ルッカ市, イタリア

〔図書〕(計 1件)

ARIMOTO, Hirokazu, TAKAHASHI, Daiki, Springer 出版, 8-Nitro-cGMP: A Novel Protein-Reactive cNMP and Its Emerging Roles in Autophagy (Chapter 44), Handbook of Experimental Pharmacology, 2016, 印刷中

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2013/11/press20131115-01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 博一 (ARIMOTO, Hirokazu)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号:

60262789