

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870309

研究課題名(和文)テtrandリンをバイオプローブとしたオートファジー経路による脂肪滴分解機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism by which tetrandrine modulates lipid degradation via blockade of autophagy

研究代表者

宮前 友策 (MIYAMAE, Yusaku)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30610240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内の不要なタンパク質やオルガネラを自己分解する品質管理機構である。本研究では、植物由来アルカロイドであるテtrandリンによる、オートファジー経路を介した脂肪滴分解メカニズムの解析を行った。種々の解析により、本化合物がリソソームの機能に影響を与えることなく、オートファジー経路を阻害することや、オートファゴソームとリソソームの融合を司る因子を標的とする可能性が示唆された。さらに脂肪滴表面タンパク質であるペリリピンがオートファゴソームのマーカータンパク質であるLC3と共局在したことから、オートファジー経路による脂肪滴分解における脂肪滴表面タンパク質の潜在的な役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular quality control system which degrades unnecessary proteins and organelles. In this study, we analyzed the mechanism by which tetrandrine, a plant-derived isoquinoline alkaloid, modulates lipid degradation via blockade of autophagy. We showed that the compound inhibits the autophagy pathway without affecting lysosomal function. A phenotypic comparison using siRNA knockdown suggested that tetrandrine may target regulators, involved in fusion between autophagosomes and lysosomes. Moreover, perilipin, an lipid droplet (LD)-coated protein, co-localized specifically with LC3, a marker protein for autophagosomes, in tetrandrine-treated cells. This suggests a potential role for perilipin in autophagy-mediated LD degradation.

研究分野：生物分子化学

キーワード：オートファジー 脂肪滴 テtrandリン perilipin 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は、真核細胞に広く保存されたエネルギー貯蔵器官であり、トリアシルグリセロールなどの中性脂質がリン脂質一重膜に覆われた構造を有する。近年オートファジー・リソソーム経路により細胞内の脂肪滴が分解される現象「リポファジー」が見出され、メタボリックシンドロームや肝臓疾患などとの関連から大きな注目を集めている (Singh *et al.*, 2009)。細胞内自己消化システムであるオートファジー・リソソーム経路は、バルク分解系と称されるように、一般的に非選択的な分解系として知られるが、リポファジーは、ミトファジーなどのようにオルガネラ選択的なオートファジーと考えられている。しかし、選択性及び分解に関わる具体的な因子群など詳細な分子機構や、その生理的意義は未だ明らかにされていない。

一方、本研究代表者は、種々の天然物を探索源とし、リポファジーを制御する化合物の探索研究を行い、ツツラフジ科植物に含まれるビスベンジルイソキノリンアルカロイドであるテトランドリンにオートファジーを介して脂肪滴を蓄積させる作用のあることを見出した。テトランドリンは、細胞内で Ca^{2+} ATPase に結合し、その機能を阻害することが既に知られるが、蛍光タンパク質発現系を用いた解析から、同化合物はオートファジー経路の後期のステップを阻害する可能性が示唆されており、単なる Ca^{2+} ATPase 阻害のみでは説明ができない結果が得られていた。実際、 Ca^{2+} ATPase 阻害剤であるタブシガルギンではこれらの作用は全く見られなかったことから、テトランドリンは、オートファゴソームの成熟機構を担う重要な因子を標的としていることが示唆されている。

また、本化合物は抗がんや抗炎症をはじめとする多彩な生物活性を示すことが報告されているが (Bhagya *et al.*, 2016)、本研究のように既知の標的である Ca^{2+} ATPase の阻害のみでは説明がつかないと思われる未解決の現象が数多く残されている。しかしこれまでに Ca^{2+} ATPase 以外の標的分子は一切明らかにされていない。標的分子同定に利用可能な分子プローブが合成できれば、これらの活性発現機構の解明や各生物活性における標的分子の機能解析に波及させることが可能であると考えられる。以上の研究背景に基づき、テトランドリンの分子プローブを合成し、標的分子を同定するとともに、同化合物によるオートファジー経路を介した脂肪滴分解機構を化学生物学的に明らかにすることを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、テトランドリンを用いた化学生物学的研究を行い、オートファジー経路により脂肪滴がどのように分解されるのか、分子レベルで明らかにすることを目的とする。また、同化合物が、リポファジーに関わるとされる疾患において有用な創薬リードとなりうるかは検討すべき重要な課題である。本研究では、リポファジー関連疾患の一つであり、肝硬変の成因である肝線維化に着目した解析を行う。

3. 研究の方法

(1) アルキン付加体の合成

各種ビーズ等へのフィスゲン反応による固定化を念頭に置き、アルキン付加した分子プローブを有機合成により作出した。

(2) 分子プローブを用いた標的分子のアフィニティ精製

(1)で合成したプローブを用いて標的タンパク質の精製および同定を行った。アルキン付加体をアジド化ナノ磁性ビーズにフィスゲン反応により固定化した後、細胞抽出液から標的タンパク質をアフィニティ精製した。得られた候補タンパク質を、LC-FT-MSを用いて同定した。

(3) テトランドリンの抗肝線維化活性の検討

肝星細胞株 HSC-T6 にテトランドリンを処理した後、脂肪滴の蓄積、およびコラーゲン産生量を、Oil Red O、および Sirius Red 法により、それぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) アルキン付加体の合成

当初の研究計画では、計 25 段階からなる合成ルートによるアルキン付加したテトランドリンの全合成を予定していたが、標的分子の解明には多くの時間がかかることを見越し、類縁化合物を用いて合成段階を極力簡略化する方針に変更した。具体的には、テトランドリンのジアステレオマーであるイソテトランドリン (図 1) がテトランドリンと同等の活性強度、活性フェノタイプを示すことに着目し、イソテトランドリンをテトランドリンの surrogate (=代用物) として用いることにより、イソテトランドリンの標的分子を同定した後、テトランドリンがその分子を同じく標的とするか、検証を行う方針を着想した。イソテトランドリンへのアルキン付加は、イソテトランドリンのメトキシ基が一つだけ水酸基に置き換わったベルバミン (図 1) を用いた。5-hexynoic acid を酸クロライド化した後、ベルバミンの水酸基にエステル結合させ、ベルバミンのアルキン付加体 (図 1) を 2 段階で得ることができた。以後、得られた化合物をアルキン付加イソテトランドリンと記述する。アルキン付加イソテトランドリンは、テトランドリンやイソテトランドリン

ンに比べると若干活性が低下する傾向が見られたものの、オートファジー阻害活性を保持することを確認できた。

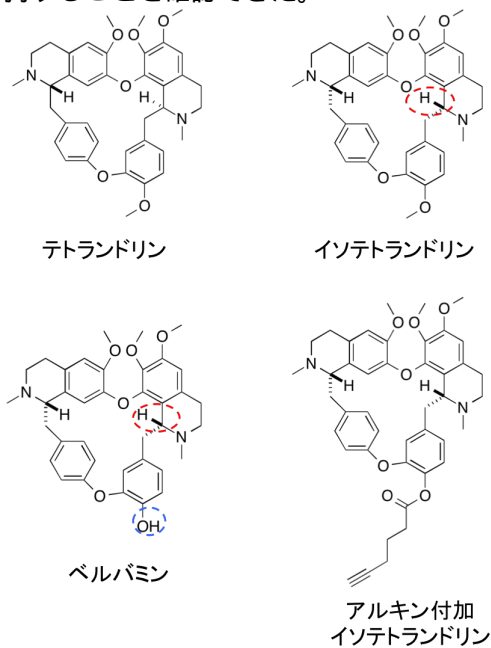


図 1. テトランドリン及び類縁化合物の構造

(2) 分子プローブを用いた標的分子のアフィニティ精製

合成したアルキン付加イソテトランドリンを、フイスゲン反応を用いてアジド化ナノ磁気性ビーズに固定化した。その後、マウス由来繊維芽細胞、ヒト由来肝がん細胞株、ラット由来肝星細胞株より、全細胞抽出液を調整し、それぞれを化合物固定化ビーズと混合した後、結合タンパク質のアフィニティ精製を行った。この際、固定化ビーズと細胞液を混合後、固定化していない未修飾の化合物を添加してビーズに結合したタンパク質を洗い流し、溶出したタンパク質を結合タンパク質とみなした（ドラッグエリユーション法）。

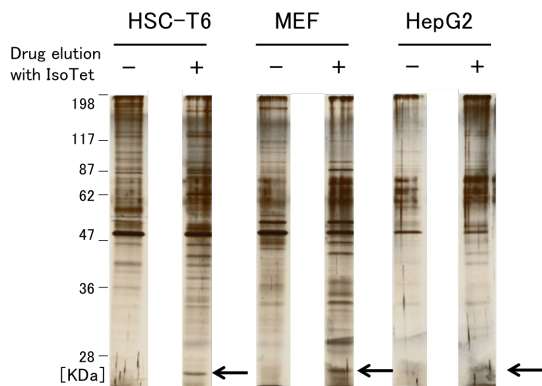


図 2. 固定化ビーズを用いた結合タンパク質のアフィニティ精製。ビーズに細胞抽出液を混合し未修飾の化合物で結合タンパク質を溶出させた。-, +は溶出の有無を表す。矢印は HMGB1 を示す。

精製したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、複数の細胞株で共通するバンドを絞り込み、LC-FT-MS 解析によりタンパク質の同定を行った（図 2）。その結果、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) が結合タンパク質として同定された。HMGB1 は従来、核内 DNA 結合タンパク質として認識されてきたが、近年、オートファゴソームの形成初期に関与することが示唆されている（Tang *et al.*, 2012）。本タンパク質はオートファジーにおいて促進的に働くと考えられていることから、イソテトランドリンやテトランドリンが HMGB1 に結合しその活性を阻害することによりオートファジー経路を阻害する可能性が考えられた。しかし、先行研究において観察されている、テトランドリンはオートファジーの後期のステップ、特にオートファゴソームとリソソームの融合過程を阻害するという現象との整合性が見られなかった。

これらの結果から、HMGB1 は結合タンパク質の一つではあるものの、オートファジー阻害においては別の主要な分子標的が存在すると考えられたが、アフィニティビーズを用いた手法では同定が困難と思われたため、個別の因子群に着目した作用点の解析を試みた。まず、テトランドリンがリソソームの機能に影響を与えるか検討を行った。リソソームの pH 調整に重要な役割を果たす、V-type ATPase の阻害活性を検討したところ、まったく阻害活性は見られなかった。また、化合物を処理した細胞内における酸性小胞の存在量を観察したところ、ポジティブコントロールであるパフィロマイシン A₁ ではアクリジンオレンジで染色される蛍光が完全に消失した一方で、テトランドリン処理ではまったく影響が見られなかった。以上の結果から、本化合物はリソソームの機能には影響を与えることなく、オートファジー経路を阻害することが強く示唆された。

近年、SNARE タンパク質の一種である Stx17 がオートファゴソーム上に局在し、細胞質、およびリソソームに局在する SNAP29 および VAMP8 と複合体を形成することにより、オートファゴソームとリソソームの融合を促進することが明らかにされた（Itakura *et al.*, 2012）。そこで、テトランドリンがこれらの過程を標的とするか検証した。Stx17 を siRNA によりノックダウンした細胞とテトランドリン処理した細胞のフェノタイプを比較したところ、脂肪滴や LC3-II の蓄積、ならびに脂肪滴と LC3 の共局在などで類似したフェノタイプを示した（図 3）ことから、テトランドリンはオートファゴソームとリソソームの融合過程を阻害する可能性が考えられた。今後、これらのタンパク質に対し結合するかどうか検証を行っていく予定である。

また、脂肪滴分解機構に関わる解析として、脂肪滴表面タンパク質の局在を観察したところ、パルミチン酸およびレチノール処理により蓄積が誘導される adipose

differentiation-related protein (ADRP)は、テトランドリン処理では全く検出されなかった一方で、ペリリピンのみが特異的に脂肪滴上に局在した(図4)。脂肪細胞では、ADRPが脂質の貯蔵に役割を果たすのに対し、刺激による分解時にADRPが脂肪滴上から解離し、ペリリピンが会合することにより脂肪滴分解が開始されることが知られるが、オートファジー経路による脂肪滴分解に脂肪滴表面タンパク質が関わることはこれまでに報告がなく、本結果はペリリピンの新たな機能を示唆するものと言える。

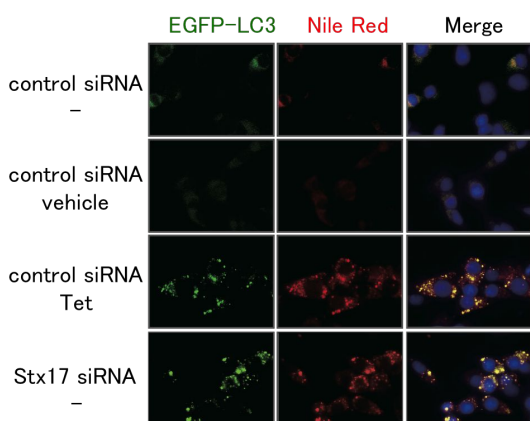


図3. Stx17 ノックダウン細胞とのフェノタイプ比較. EGFP-LC3 を安定発現する細胞株に Stx17 siRNA あるいはテトランドリンを処理した後, Nile Red で細胞内脂肪滴を染色した。

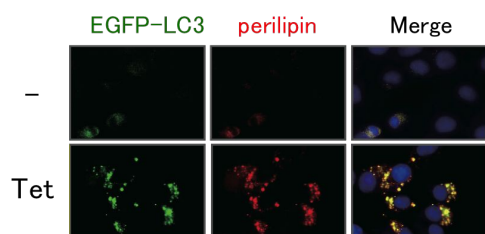


図4. ペリリピンの局在観察. EGFP-LC3 を安定発現する細胞株にテトランドリンを処理した後, 抗ペリリピン抗体を用いてペリリピンを蛍光標識し, 局在を観察した。

(3) テトランドリンの抗肝線維化活性の検討
肝線維化は肝硬変の成因であり、肝星細胞がその発症や進行に重要な役割を果たす。肝星細胞は、通常、ビタミンAに富む脂肪滴を貯蔵し、静止状態にあるが、障害や炎症などの刺激に応答して、筋芽様細胞に形質転換する。この過程で、脂肪滴を分解し、コラーゲンや α -SMA などの線維を発現、分泌し、線維化を発症する。近年、オートファジーが、肝星細胞における脂肪滴の分解に重要な役割を果たすことが示唆されており (Thoen *et al.*, 2012) オートファジーの阻害が、肝線維化の治療戦略として着目されている。本研究ではテトランドリンが肝星細胞における脂

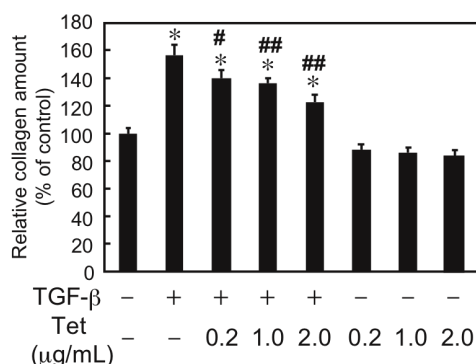


図5. テトランドリンの抗線維化活性. HSC-T6 細胞に TGF- β 処理して線維化を誘導後、テトランドリンを加えた際のコラーゲン産生量を Sirius Red 法により定量した. * $p < 0.05$ vs vehicle control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs TGF- β .

肪滴分解を抑制し、抗線維化活性を示すか、検討した。

ラット由来肝星細胞株 HSC-T6 にテトランドリンを処理し、細胞内の脂肪滴を Oil Red O 法により染色した。その結果、テトランドリン処理により顕著な脂肪滴の蓄積が観察された。さらに、コラーゲン産生量を Sirius Red 法により定量した結果、TGF- β 処理により増加したコラーゲン産生量が、テトランドリン共処理により有意に減少した(図5)。これらの結果は同化合物が抗線維化物質のリードとなり得ることを示唆している。

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 7 件)

Kurata, M., Murata, Y., Momma, K., Mursi, A. I. F., Takahashi, M., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H., Shibuya, Y., Masuda, S. The isoflavone fraction from soybean presents the mRNA maturation inhibition activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017 年, 81 巻, 551-554 査読あり

DOI: 10.1080/09168451.2016.1249451

Miyamae, Y.*, Nishito, Y., Nakai, N., Nagumo, Y., Usui, T., Masuda, S., Kambe, T., Nagao, M.* Tetrandrine induces lipid accumulation through blockade of autophagy in a hepatic stellate cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016 年, 477 巻, 40-46 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.018

宮前友策、永尾雅哉

核内受容体 PPAR γ のユニークな特性と新奇リガンド開発への新展開 *化学と生物*, 2016 年, 54 巻, 791-793 査読あり

<https://katosei.jsbba.or.jp/>

Kidachi, E., Kurisu, M., Miyamae, Y.

Hanaki, M., Murakami, K., Irie, K., Shigemori, H. Structure-activity relationship of phenylpropanoid glycosides on the inhibition of amyloid β aggregation. *Heterocycles*, 2016 年, 92 巻, 1976-1982 査読あり

DOI: 10.3987/COM-16-13533

Fujimoto, S., Tsuji, T., Fujiwara, T., Takeda, T., Merriman, C., Fukunaka, A., Nishito, Y., Fu, D., Hoch, E., Sekler, I., Fukue, K., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., Kambe, T. The PP-motif in luminal loop 2 of Znt transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochemical Journal*, 2016 年, 473 巻, 2611-2621 査読あり

DOI: 10.1042/BCJ20160324

Ohtera, A., Miyamae, Y.*, Yoshida, K., Maejima, K., Akita, T., Kakizuka, A., Irie, K., Masuda, S., Kambe, T., Nagao, M. Identification of a new type of covalent PPAR γ agonist using a ligand-linking strategy. *ACS Chemical Biology*, 2015 年, 10 巻, 2794-2804 査読あり

DOI: 10.1021/acschembio.5b00628

Hashimoto, A., Ohkura, K., Takahashi, M., Kizu, K., Narita, H., Enomoto, S., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., Irie, K., Ohigashi, H., Andrews, G. K., Kambe, T. Soybean extracts increase cell surface ZIP4 abundance and cellular zinc levels: a potential novel strategy to enhance zinc absorption by ZIP4 targeting. *Biochemical Journal*, 2015 年, 472 巻, 183-193 査読あり

DOI: 10.1042/BJ20150862

[学会発表](計 4 件)

宮前友策、西藤有希奈、仲井奈緒美、増田誠司、神戸大朋、永尾雅哉、口頭発表 オートファジー阻害剤テトランドリンの新規作用機序、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年 9 月 9 日、神奈川県民ホール、神奈川県横浜市

宮前友策、大寺杏奈、吉田光多郎、前嶋一宏、秋田徹、垣塚彰、入江一浩、増田誠司、神戸大朋、永尾雅哉、口頭発表 リガンド結合ポケットの特性に着目した新規共有結合性 PPAR γ アゴニストの創製、第 10 回日本ケミカルバイオロジー学会、2015 年 6 月 10 日、東北大学、宮城県仙台市

西藤有希奈、宮前友策、仲井奈緒美、Han Junkyu、磯田博子、増田誠司、神戸大朋、永尾雅哉、肝線維化抑制物質テトランドリンによるオートファジー経路制御機構の解明、第 9 回日本ケミカルバイオロジー学会、2014 年 6 月 11 日、大阪大学、大阪府豊中市

Yusaku Miyamae, Anna Ohtera, Kotaro Yoshida, Toru Akita, Kazuhiro Maejima,

Akira Kakizuka, Kazuhiro Irie, Seiji Masuda, Taiho Kambe, Masaya Nagao. Cooperative activation of PPAR γ by combination of irreversible antagonist and partial agonists: implication for novel activation mechanism based on covalent modification. *International Chemical Biology Society*, 3rd annual meeting, 2014 年 11 月 17 日, InterContinental San Francisco, サンフランシスコ (アメリカ合衆国)

[その他]

ホームページ等

筑波大学 TRIOS

<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003934>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮前 友策 (MIYAMAE, Yusaku)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30610240