

2021 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	オートファジー活性を制御する代謝物の検索と制御機構の解明
キーワード	①オートファジー、②代謝、③スクリーニング

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	フナコシ トモコ 船越 智子
配付時の所属先・職位等 (令和3年4月1日現在)	順天堂大学 医学部 特任助教
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	順天堂大学 医学部 特任助教
プロフィール	学生の頃に面白いと思って以来、所属を10回程変えながら基礎研究に携わってきた。その度、ゼロからのスタートを繰り返すことになったが、興味ある多くのテーマにトライすることができたことは貴重な経験であった。オートファジーは博士課程で取り組んだ研究テーマであった。現在、オートファジー研究の分野が大きく発展したことを体感しながら、再び新しい事象に遭遇したい思いで取り組んでいる。

1. 研究の概要

オートファジーは、細胞内のタンパク質や凝集体、さらにはミトコンドリアのような細胞内小器官や外部から侵入したバクテリアをも標的とする細胞内分解機構である(図1)。基本的な細胞内代謝に貢献するにも関わらず、代謝中間体によるオートファジーの制御機構については、まだ分からないことが多く残されている。本研究では、代謝中間体の標品を人工的に細胞内に導入し、**オートファジー活性に影響を及ぼす代謝中間体のスクリーニングを試みた**。スクリーニングには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。GFP は酸性下で蛍光を失うが RFP は酸性化においても赤色蛍光を維持するという性質を利用して、オートファジーの進行を tfLC3 の GFP と RFP の蛍光輝度の変化として捉えることができる(図2)。上記スクリーニングにより、オートファジーを促進する候補を1種、抑制する候補を5種、得ることができた。同定することができた。候補標品の1候補に関しては、幕透過修飾型を合成して、培養細胞の**オートファジー活性への影響を生化学的に解析し**、オートファジー経路のどのステップに作用するか検証を試みた。

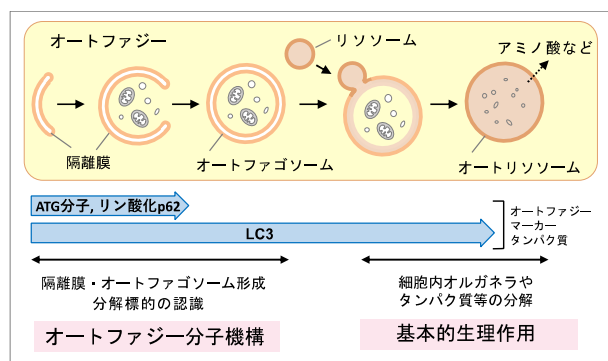


図1 オートファジーの模式図

2. 研究の動機、目的

研究の動機：出芽酵母の遺伝学的手法によってオートファジーに関わる ATG (AuTophagy) 遺伝子群が単離されたことを契機に、ヒトをはじめ様々な生物種を対象としたオートファジー研究が精力的に進められてきた。これまでの研究結果の蓄積によって、オートファジーは栄養飢餓に応じたアミノ酸プールの維持のみならず、変性タンパク質や余剰あるいは異常な細胞小器官の分解を担うことで細胞の恒常性、個体としての健康維持に貢献することがわかってきた。さらに、発生や老化といった高次生命現象や、がん、神経変性疾患などの難治性疾患との関連が明らかになり、創薬ターゲットとしても注目されはじめている。

現在も国内外を問わず、オートファジー研究は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し進められている。所属研究室では、メタボロームやリポドームといった包括的な解析によって、オートファジーが糖、アミノ酸、脂肪酸代謝を制御することが明らかにされた。生体内代謝機構には代謝中間体によるフィードバック機構が存在するため、**オートファジーが代謝中間体に制御される可能性があるが、これまで詳細な知見はない。**これには、主に二つの本質的な問題として「代謝中間体の標品がなかった」こと、そして「それらを細胞に導入する方法がなかった」ことが挙げられる。細胞機能を制御する可能性のある代謝中間体の標品ライブラリーを、セミインタクト・リシーリング技術によって細胞内に導入することで上記問題を解消できると考えた。

セミインタクト・リシーリング法は、細胞の細胞膜に開けた小孔を介して、細胞膜を透過しない物質を細胞内に導入する手法である。

細胞内の小器官や構造物はそのまま維持されており、開けた孔を閉じること (リシーリング) が可能なため、導入後も一定時間培養して観察することが可能である。代謝中間体標品と tfLC3 を同時に細胞に導入して継時的に蛍光を観察すれば、オートファジー活性を変化させる候補中間体を同定できると考えた (図2)。

研究の目的：134種の代謝中間体標品をセミインタクト・リシーリング技術によって細胞内に導入し、蛍光プローブの蛍光輝度を指標としたスクリーニングによって、オートファジー活性に影響を及ぼす代謝中間体を同定する。オートファジーのアロステリックな制御について知見を得ることを目指す。

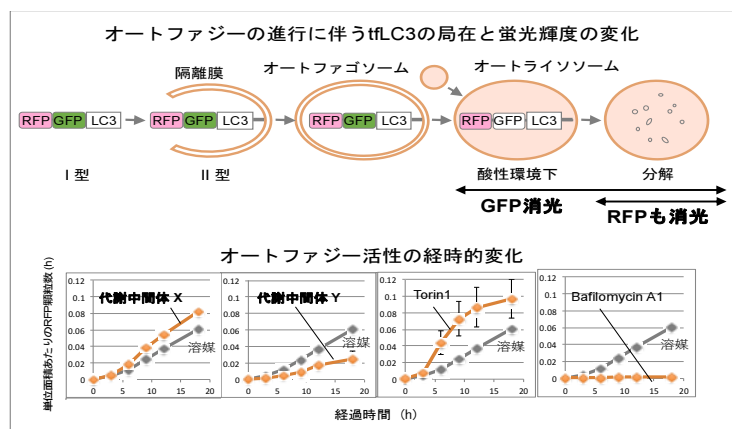


図2 オートファジー活性の定量化

tfLC3のRFP,GFPの蛍光輝度比を指標としてオートライソソーム数を算出する。例) X(誘導型)、Y(抑制型)代謝中間体の測定結果。Torin1 (オートファジー活性化剤)、Bafilomycin A1(リソソーム酸性化阻害剤: リソソーム酵素が阻害されるためtfLC3のGFPが消光しない。酸性化で機能する分解酵素が阻害される。)

3. 研究の結果

134種の代謝中間体標品、蛍光プローブ tfLC3 を含む細胞質成分をセミインタクト化した HeLa 細胞に導入した後、リシールした。リシリング後、共焦点蛍光顕微鏡で GFP と RFP の蛍光画像を継時的に取得した。GFP は酸性下で消光するため RFP/GFP 輝度比が高い顆粒 (=オートライソソーム) の数の変化は、オートファジーの進行程度を意味する。細胞面積あたりのオートライソソーム数を算出し継時的变化を比較した。134種の代謝中間体の内、各溶媒と比較してオートファジーを促進する候補を1種(A)、抑制する候補を5種(B-F)同定した(図3)。6候補の中でも、リシール直後から18時間後まで活性抑制が観察された候補Eに着目して解析を進めた。

リシールされた細胞には、内在性の LC3II 型(膜結合型)が残存しているため生化学的解析には適さなかった。そこで、膜透過が期待できる修飾型 E を化学合成して、培養細胞での検証を試みた。HeLa 細胞にアデノウイルスベクターで tfLC3 を一過性に発現させ、培養液に修飾型 E を添加して GFP、RFP 蛍光を継時的に観察した。溶媒のみを加えた場合と比較して修飾型 E を加えた際に、RFP/GFP 輝度比が添加濃度依存的に低下した。一方、修飾していない標品 E を添加しても RFP/GFP 値の低下は観察されなかった。以上から、修飾型 E は細胞膜透過性を有し、tfLC3 を指標としたオートファジーを抑制すること示唆された。ウェスタンブロット解析により、HeLa 細胞に修飾型 E を添加すると、オートファジーの分解基質である LC3、p62 が細胞内に蓄積することがわかった(図3上段)。次に、リソソーム活性への影響を調べるため、DQ-BSA を用いて検証した。DQ-BSA はウシアルブミン(BSA)に蛍光色素である BODIPY が付加されており、細胞内で分解をされて初めて蛍光を発する特徴を持つ。HeLa 細胞の培養液に DQ-BSA を添加した後、修飾型 E を加えて DQ-BSA の蛍光を観察した。リソソーム機能を阻害する Bafilomycin A₁ や塩化アンモニウムに比較すると弱いながらも、溶媒のみのコントロールの約70%まで DQ-BSA の蛍光輝度値が低下した(図4)。修飾型 E による抑制効果は、部分的なリソソーム活性阻害、もしくはオートファゴソームとリソソームの融合過程の阻害によると考えられる。今後は、上記の可能性を検証するとともに、スクリーニングで得られた他の候補についても解析を進めたい。

4. 研究者としてのこれからの展望

先人の方々に隔々まで開拓された分野でも、よく見るとまだ面白い事象が残されているようです。目の前にある研究対象に向き合い、常識にとらわれ拘ることなく、まだ知られていない生命現象を見つける垣間見ることができる眼を持てるよう心がけたい。

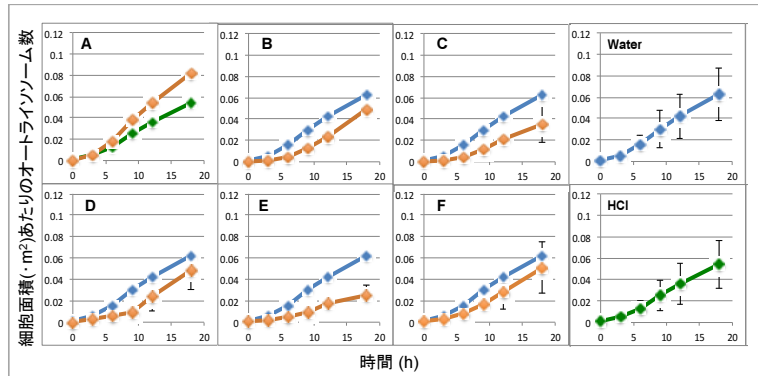


図3 代謝中間体標品導入後のオートファジー活性の継時的变化
単位面積あたりのオートライソソーム数の継時的变化を示す(n=3)。標品(橙色)、各溶媒(水:水色、もしくは0.1N HCl:緑色)。

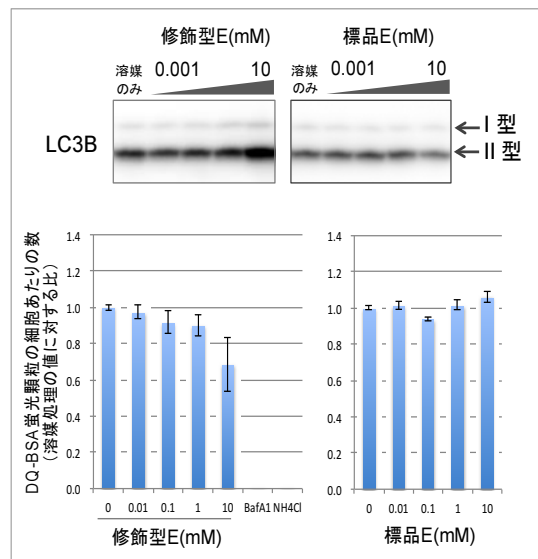


図4 標品 E と膜透過修飾型 E の抑制効果
(上段) LC3B のウェスタンブロット: 修飾型 E (10 mM) 添加で LC3B の蓄積が認められた。(下段) DQ-BSA を用いたリソソーム活性測定: 細胞あたりの活性リソソーム数を溶媒(0 mM)に対する比で表した。修飾型 E (10 mM) 添加でリソソーム活性抑制が認められた。BafA1: 100 nM Bafilomycin A₁, NH₄Cl: 10 mM 塩化アンモニウム。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究課題に対して助成いただきましてありがとうございました。予想通り、予定通りに研究は進みません。壁の前で右往左往している時間がほとんどかもしれません。このようなご支援をいただき、大きな励みとなりました。重ねて御礼申し上げます。ありがとうございました。