東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO

オートファジーの活性を簡便かつ定量的に測定できる新規プローブの開発
―生体内のオートファジーの活性も測定可能に―

１．発表者

貝塚　剛志（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野
特任研究員、現所属：理化学研究所　訪問研究員）
森下　英晃（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野　助教）
水島　昇　（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野　教授）

２．発表のポイント

◆主要な細胞内分解システムである「オートファジー、注１」の活性を簡便かつ定量的に測定できる新規プローブを開発しました。
◆本プローブを用いることで、培養細胞だけではなく、マウスやゼブラフィッシュの受精卵や組織でのオートファジー活性を測定することに成功しました。
◆本法は多検体解析にも適しており、既承認薬ライブラリーから新規オートファジー誘導薬・阻害薬を同定しました。今後、本プローブの利用によってさらにオートファジーの基礎的および臨床的研究が進展することが期待されます。

３．発表概要：

オートファジーは細胞内の代表的な分解システムです。オートファジーの分子機構、生理機能、疾患との関連については近年急速に研究が進んでいます。しかし一方で、オートファジーの活性を定量的に評価することは容易ではなく、未だに十分確立された方法がありません。

このたび、東京大学大学院医学系研究科の貝塚剛志特任研究員、森下英晃助教、水島昇教授らの研究グループは、オートファジーの活性を簡便かつ定量的に測定できる新規プローブを開発しました。このプローブは培養細胞だけでなくマウスやゼブラフィッシュなどの動物個体内でも利用可能なことが特徴です。本プローブを用いることで、受精卵や特定の筋肉細胞では高いオートファジー活性を認めることが分かりました。さらに本法を用いて、株式会社 LTT バイオファーマとの共同で、同社が独自に構築した既承認薬ライブラリー（日本とアメリカで市販されている医薬品だけを集めた化合物ライブラリー）を用いてスクリーニングを行い、新規オートファジー誘導薬・阻害薬を同定しました。

今後、本プローブの利用によってオートファジーの基礎的研究や疾患研究が進展することが期待されます。本研究は日本学術振興会　新学術領域研究「オートファジーの集学的研究」（領域代表：水島昇）などの一環で行われました。

本研究成果は、2016 年 11 月 4 日に国際科学誌「Molecular Cell」のオンライン版で公開されました。

４．発表内容：

(1) 研究の背景

細胞内ではタンパク質などの生体成分の合成と分解が繰り返されることで、細胞の機能や健康が維持されています。この細胞内の分解を担うシステムの一つがオートファジーです。オートファジーはオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造で細胞質の一部を取り囲み、その後リソソームと融合することで内容物を分解するシステムです（図１）。近年、オートファジーは

飢餓適応、細胞内品質管理などのさまざまな役割を担うことが分かってきており、その破たんは神経変性疾患、腫瘍など多様な疾患と関連することが報告されています。

オートファジーの分子機構、制御機構、生理機能、疾患との関連などを研究するうえで、オートファジー活性の定量的な測定法の存在は必須となります。これまでにオートファジーの活性測定法としては、電子顕微鏡法や蛍光顕微鏡法によるオートファゴソームの数の計測、LC3タンパク質（脂質修飾型、注２）の量を定量する方法が用いられてきました。しかし、これらの方法では、オートファジーが誘導されてオートファゴソームが増えたことと、オートファジーの最終分解段階が阻害されてオートファゴソームが増えたことの区別ができません。そこで、オートファジーによる一連の分解の「流れ」をオートファジーフラックスとして測定することがより重要です。これまで、オートファジーフラックスを測定する方法が種々報告されてきましたが、熟練を要するものや、2種の細胞の比較を要するなど、簡便さ、感度、特異性などにまだ課題が残っているのが現状です。さらに、モデル動物でのオートファジーフラックスの定量的測定は非常に困難でした。今回、本研究グループは、簡便かつ定量的にオートファジーフラックス（以降、簡単にオートファジー活性と呼びます）を測定できる新規プローブとしてGFP-LC3-RFP-LC3ΔG(およびGFP-LC3-RFP)を開発し、本プローブが培養細胞だけでなく生体内でも利用できることを示しました。

(2) 研究の内容

本研究グループは、新規オートファジー活性測定プローブとしてLC3に緑色蛍光タンパク質（GFP）と赤色蛍光タンパク質（RFP）を融合させたGFP-LC3-RFP-LC3ΔG(およびGFP-LC3-RFP)を開発しました（図２）。本プローブは、細胞内で合成されると直ちにATG4タンパク質によって切断され、GFP-LC3とRFP-LC3ΔGを一対一の量比で生成します。GFP-LC3は細胞質中では緑色の蛍光を発しますが、オートファゴソーム膜に局在化してリソソームに運ばれると蛍光を発しなくなります。これはGFPの蛍光がリソソームの酸性環境下で減弱することによります。一方、RFP-LC3ΔGはオートファゴソーム膜への局在化に必要な末端のグリシン(G)を欠くため細胞内に留まり、プローブの発現量を反映する内部標準となります（RFP-LC3ΔGの代わりにRFPだけを用いたGFP-LC3-RFPを使用することも可能です）。したがって、GFPとRFPの蛍光強度の比が、オートファジー活性の指標となります。例えばGFP/RFP比が低いほど、オートファジー活性が高いことを示唆します。

本プローブを発現させた培養細胞を用いた実験の結果、栄養飢餓（図３Ａ）や既知の代表的オートファジー誘導剤の処理によってGFP/RFP比が減少し、既知のオートファジー抑制剤によってGFP/RFP比が増加したため、GFP/RFP比がオートファジー活性の指標として妥当であると考えられました。さらに株式会社LTTバイオファーマとの共同研究で1054種類の既承認薬からなる化合物ライブラリー（既承認薬ライブラリー：同社が独自に構築し、大学・企業等に無償提供している）を用いたスクリーニングを行い、47種類のオートファジー誘導剤、43種類のオートファジー抑制剤を同定しました。これらの中にはオートファジー制御剤としては新規のものも含まれています。

本プローブの特徴のひとつとして、生体内での解析が可能なことが挙げられます。これまでマウス受精卵でオートファジーが活性化することが知られていましたが、今回本プローブをもちいてそれを確認するとともに（図３Ｂ）、ゼブラフィッシュの受精卵でもオートファジーが活性化することを初めて示しました（図３Ｃ）。また、本プローブを発現する生きたゼブラフィッシュ胚を用いることで、水晶体では網膜などの他の組織と比較してオートファジー活性が高いことが示されました（図４Ａ）。さらにマウス骨格筋ではオートファジー活性の異なる細

胞がモザイク状に存在しており（図４Ｂ）、これらの違いは骨格筋の筋繊維の種類の違いによることも分かりました（赤筋（遅筋）で活性が低く、白筋（速筋）で高い）。
　以上の結果から、本プローブは培養細胞だけでなく生体内においてもオートファジー活性を簡便かつ定量的に測定可能なプローブであることが示されました。

(3) 社会的意義
　オートファジーは神経変性疾患、腫瘍、感染などさまざまな疾患と関連することが強く示唆されています。また、米国ではオートファジー阻害効果を持つ薬剤の抗がん剤としての臨床試験も行われています。今後、これらのオートファジーと疾患との関連に関する研究や基礎的研究において本研究によって開発されたプローブが用いられることで、オートファジーが関連する生命現象や病態の理解に役立つことが期待されます。また今回見出された新規オートファジー誘導薬・阻害薬は既に臨床で使用されている既承認薬ですので、新規物質に比べ比較的短期間の内に臨床での効果確認が可能です（ドラッグ・リポジショニング、注３）。

７．発表雑誌：
雑誌名： *Molecular Cell*　(2016 年 11 月 4 日米国東部時間　オンライン版)
論文タイトル： An autophagic flux probe that releases an internal control
著者： Takeshi Kaizuka[1], Hideaki Morishita[1], Yutaro Hama, Satoshi Tsukamoto, Takahide Matsui, Yuichiro Toyota, Akihiko Kodama, Tomoaki Ishihara, Tohru Mizushima, and Noboru Mizushima* ([1] equal contribution, *corresponding author)

８．問い合わせ先：
＜本研究に関するお問い合わせ＞
東京大学大学院医学系研究科　分子細胞生物学専攻　分子生物学分野
教授　水島　昇（みずしま　のぼる）
Tel ： 03-5841-3440、Fax ： 03-3815-1490
E-mail ： nmizu@m.u-tokyo.ac.jp

＜報道に関するお問い合わせ＞
東京大学大学院医学系研究科　総務係
Tel ：03-5841-3304、Fax ：03-5841-8585
E-mail ： ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

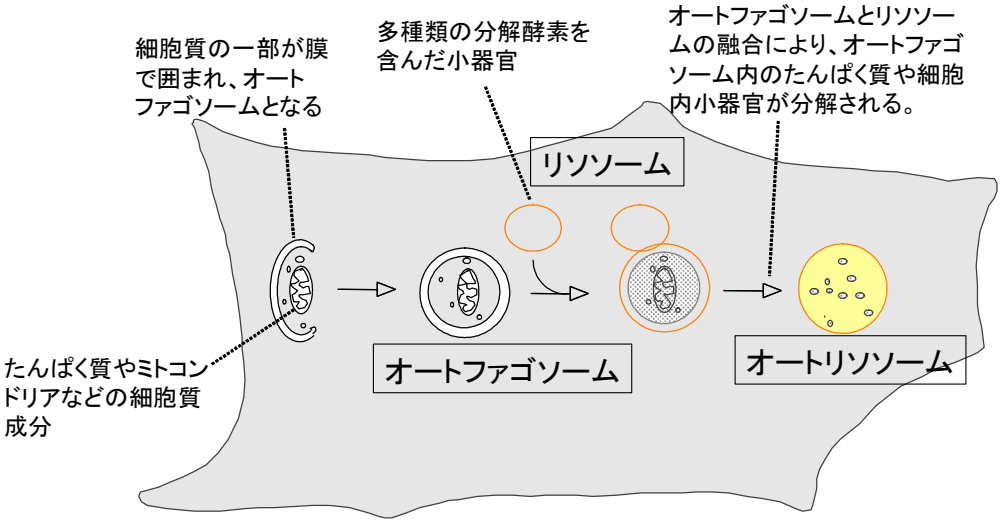
９．用語解説：
（注１）　オートファジー
細胞に備わっている細胞質成分を分解するための仕組みの１つ。細胞質成分を膜で取り囲んでリソソーム（さまざまな分解酵素を含む細胞内小器官）に運び込み分解する（図１）。

（注２）　LC3 タンパク質
LC3（MAP1LC3: Microtubule-associated protein light chain 3）はオートファゴソーム関連膜に特異的に局在するタンパク質で、オートファゴソームマーカーとして頻繁に用いられています。LC3 はタンパク質として合成されると、直後に ATG4 タンパク質によって C 末端が切断され、グリシン残基を露出します。この状態では主に細胞質中に局在しますが、グリシ

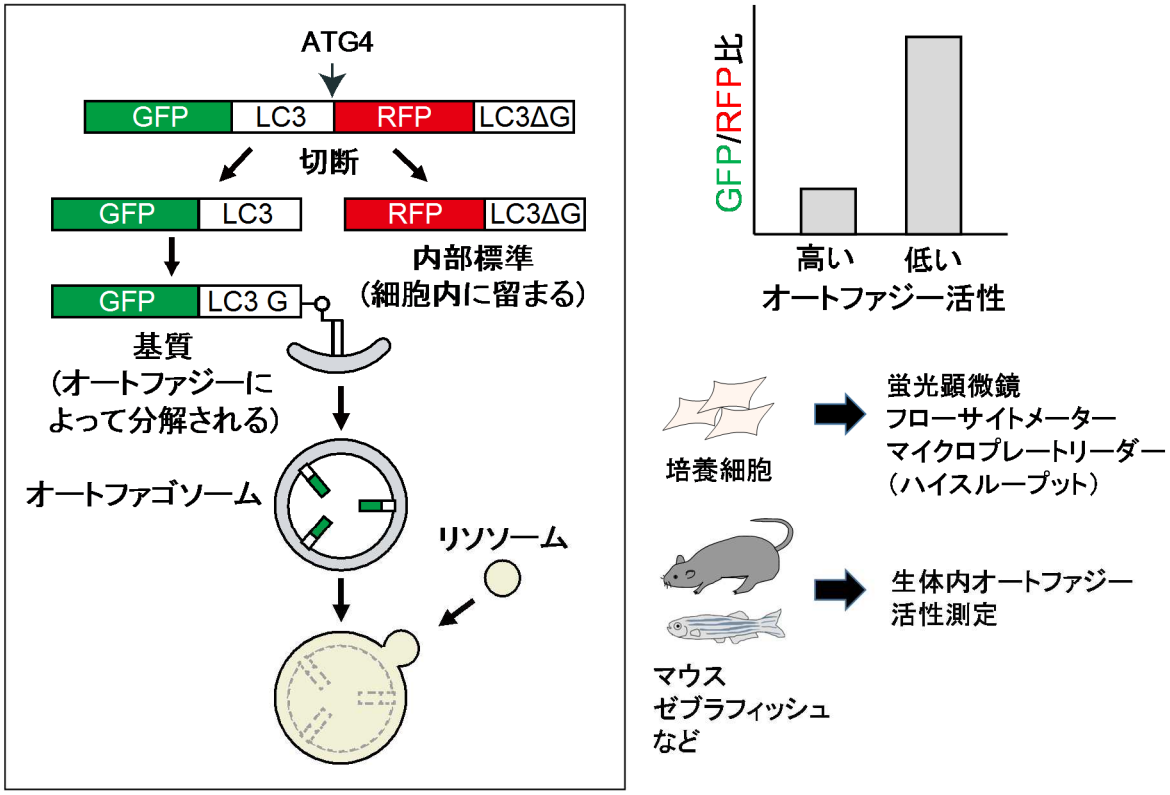
ンとオートファゴソーム関連膜上のリン脂質ホスファチジルエタノールアミンとが結合することで膜局在型となります。

（注３）　ドラッグ・リポジショニング
ヒトでの安全性が充分に証明されている既承認薬の新しい薬理効果を発見し、別の疾患治療薬として開発する戦略。既に臨床で使われている医薬品なので、ヒトでの安全性がよく分かっており、医薬品開発の成功確率が高いこと、また既にあるデータを再利用できるので、開発にかかる時間とコストを削減できることがドラッグ・リポジショニングのメリットです。

10. 添付資料：

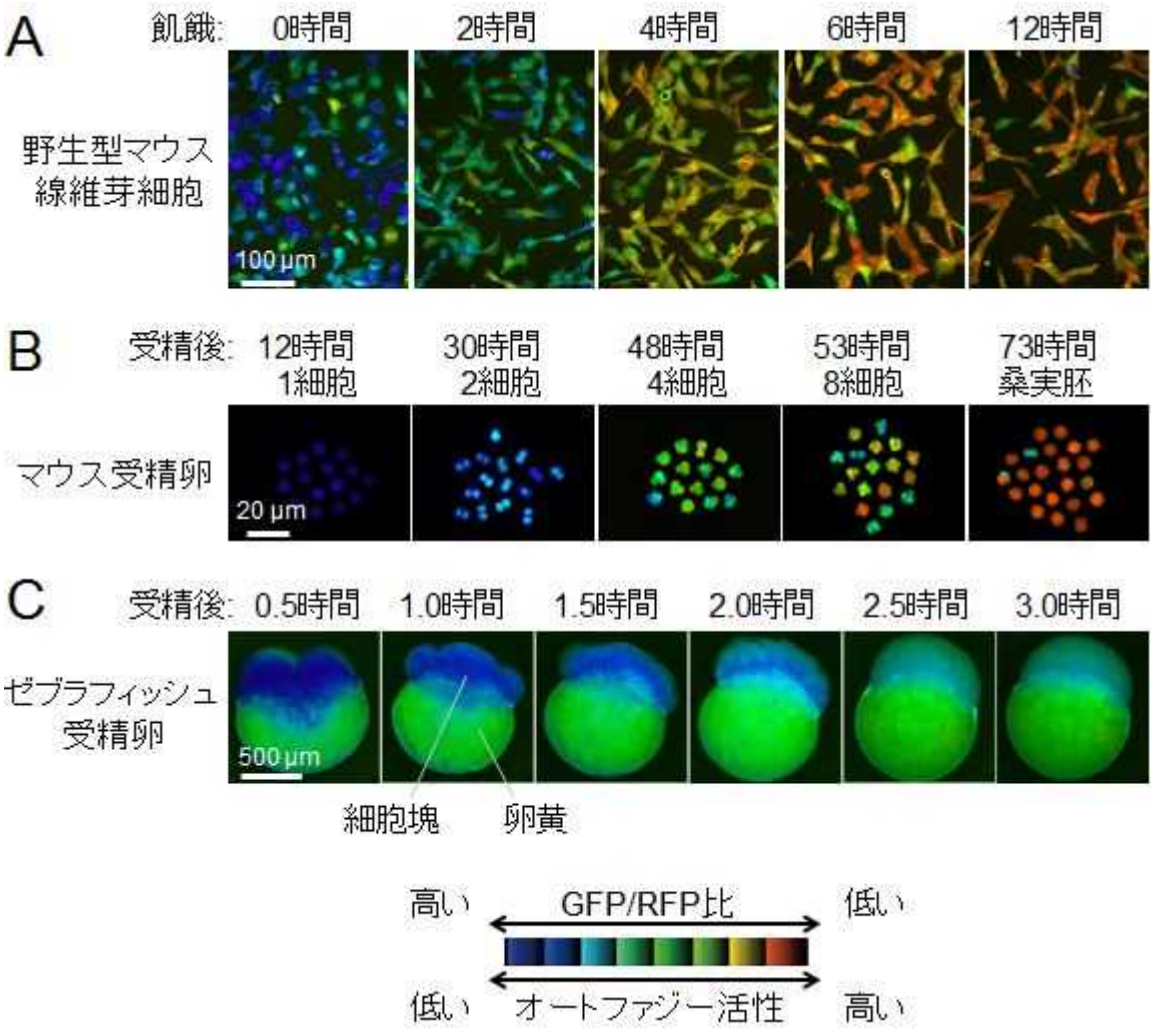


（図１）オートファジーのしくみ
オートファジーが誘導されると隔離膜が細胞質成分を取り囲みながら伸長し、オートファゴソームを形成します。続いてオートファゴソームはリソソームと融合し、オートファゴソームで囲んだ細胞質成分が分解されます。細胞質成分の分解により生じたアミノ酸などの分解産物は再利用されます。

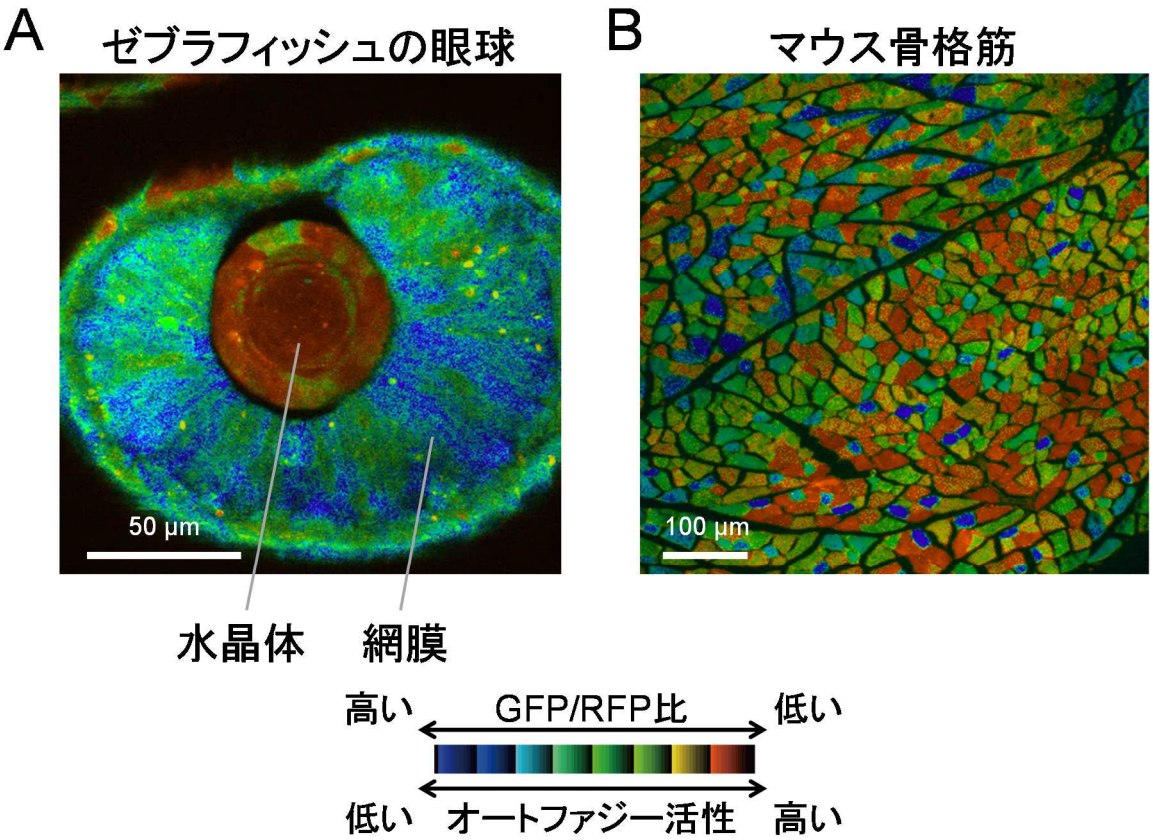


（図２）オートファジー活性測定プローブの原理

オートファジー活性測定プローブタンパク質 GFP-LC3-RFP-LC3ΔG は、細胞内で合成されると ATG4 タンパク質によって GFP-LC3 と RFP-LC3ΔG の二つに切断されます。GFP-LC3 はオートファゴソーム膜に局在し、オートファジーによって分解されます。一方、RFP-LC3ΔG は末端にグリシン(G)を欠くためオートファゴソーム膜へ局在化できず、細胞内に留まり内部標準となります。RFP-LC3ΔG の代わりに RFP を用いることも可能です。GFP と RFP の蛍光強度の比を求めることでオートファジー活性を評価でき、GFP/RFP 比が低いほどオートファジー活性が高いことを示唆します。この方法を用いることで、培養細胞だけでなくマウスやゼブラフィッシュなどの動物個体においてもオートファジー活性測定が可能となりました。



（図３）飢餓や受精によって誘導されるオートファジーの可視化
Ａ．本プローブ（GFP-LC3-RFP-LC3ΔG）を発現しているマウス線維芽細胞。栄養飢餓に伴ってオートファジーが誘導されていることがわかります。
Ｂ．本プローブを発現しているマウス受精卵。受精後に徐々にオートファジーが誘導されていることがわかります。
Ｃ．本プローブを発現しているゼブラフィッシュ受精卵。マウスと同様に受精後にオートファジーがおこることがわかります。



（図４）マウス組織でのオートファジーの活性の測定
Ａ．GFP-LC3-RFP-LC3ΔG を発現する生きたゼブラフィッシュ胚の発生過程の眼。網膜に比べて、水晶体でオートファジーの活性が高いことがわかります。
Ｂ．GFP-LC3-RFP-LC3ΔG を発現するトランスジェニックマウス（2 日間の飢餓後）の骨格筋。筋繊維の種類によってオートファジーの活性が異なることがわかります。詳しい実験から、赤筋（遅筋）で活性が低く、白筋（速筋）で高いことがわかりました。