

160. 老化関連疾患における生体抗酸化システムのはたらき

山寄 博未

弘前大学 大学院医学研究科 分子生体防御学講座

Key words : マイトファジー, イメージング, 化合物スクリーニング

緒言

ミトコンドリアは、好気呼吸によるエネルギー産生をおこなっているが、膜電位の低下などによるミトコンドリアの機能障害は活性酸素分子であるスーパーオキシドの産生につながる事が知られている¹⁾。活性酸素は、DNA・タンパク質・脂質を直接修飾することで、細胞に大きなダメージを与え、最終的には細胞老化あるいは細胞死を引き起こす。我々の体には、オートファジーによるミトコンドリア分解を行うマイトファジーという仕組みが備わっており、不良ミトコンドリアによる細胞障害を抑制すると考えられている。がんや神経変性疾患などの老化関連疾患にはミトコンドリア機能低下が関与すると考えられており²⁾、そのような疾患の予防・治療にはマイトファジーを誘導することが有効であることが予想される。本研究では、マイトファジー誘導剤を探索するためのスクリーニング系を樹立するとともに、マイトファジーの詳細な分子機構の解明を目指す。

方法および結果

AcidiFluorORANGE は酸性で蛍光強度の増加するプローブである。ミトコンドリアマトリックスに局在を示す Tetraphenylphosphonium (TPP) 化合物と融合させた AcidiFluorORANGE-TPP がマイトファジーの可視化に用いることができるかの検討を行った。同プローブを HeLa 細胞に添加した後、マイトファジー誘導作用のある脱共役剤 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) を処理すると、蛍光強度が顕著に増加した (図 1A)。一方、TPP を含まない AcidiFluorORANGE を HeLa 細胞に取り込ませたあと CCCP を添加した場合は、蛍光強度の増加を示さなかった (図 1A)。すなわち、AcidiFluorORANGE-TPP で認められた CCCP による蛍光強度の増加は、プローブのミトコンドリアへの局在に依存すると考えられた。マイトファジー誘導作用のある鉄キレート剤 Deferoxamine (DFO) による蛍光強度の増加は認められなかった (図 1B)。また、CCCP による AcidiFluorORANGE 蛍光強度の増大は、リソソーム阻害剤である Bafilomycin A1 (Baf A1) により抑制されたことから、蛍光はリソソームのはたらきに依存的であることを確認した (図 1C)。しかしながら、隔離膜形成を抑制することによりオートファジーを阻害する 3-Methyladenine (3-MA)、オートファジー経路に必須の役割を果たす *Beclin1* (*BECN1*) 遺伝子のノックダウンおよびマイトファジー経路に必須の役割を果たす *PINK1* 遺伝子のノックダウンによって蛍光の消失は認められなかったことから (図 1C、D)、AcidiFluorORANGE-TPP で観察された蛍光は、マイトファジーを直接モニターしていないことが明らかとなった。

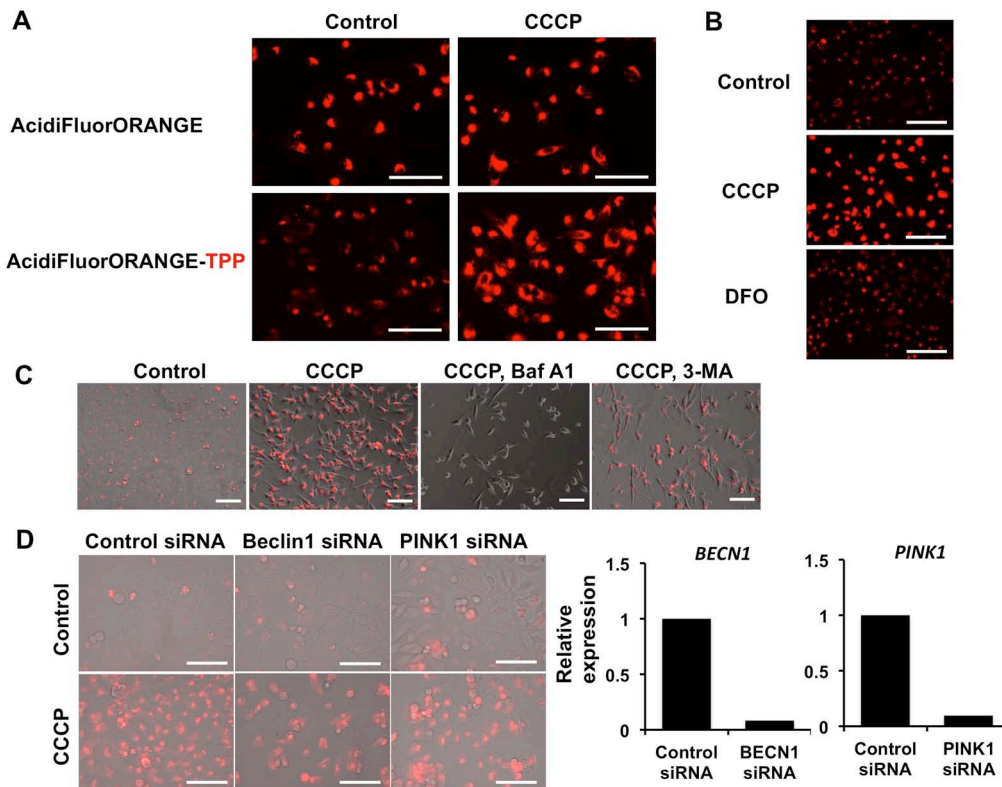


図1. AcidiFluorORANGE-TPP プローブの特性

(A) HeLa 細胞に AcidiFluorORANGE $1 \mu\text{M}$ または AcidiFluorORANGE-TPP $1 \mu\text{M}$ 、CCCP 20 nM を添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。(B) HeLa 細胞に 2 時間 AcidiFluorORANGE-TPP $1 \mu\text{M}$ を取り込ませた後、CCCP 20 nM または DFO $500 \mu\text{M}$ を添加し、さらに 24 時間後に観察した。(C) HeLa 細胞に 2 時間 AcidiFluorORANGE-TPP $1 \mu\text{M}$ を取り込ませると同時に BafA1 または 3-MA を処理、2 時間後に CCCP 20 nM を添加し、さらに 24 時間後に観察した。(D) HeLa 細胞に各 siRNA を導入し、24 時間後に CCCP 20 nM を添加し、さらに 4 時間後に観察した。定量的 RT-PCR により各遺伝子がノックダウンできていることを確認した。スケールバー： $100 \mu\text{M}$ 。

次に、既に報告された mCherry-GFP-FIS1 による検出系を利用しマイトファジーの検出を試みた³⁾。この検出系では、mCherry および GFP の cDNA と FIS1 のミトコンドリア外膜局在シグナルを連結させたプラスミド DNA を細胞内に発現させることで、2 種類の蛍光タンパク質 mCherry、GFP がミトコンドリアにて発現する。2 つの蛍光タンパク質を使っている理由は、GFP の pH 感受性を利用するためである。マイトファジーを起こしていないミトコンドリアは、GFP と mCherry の両方が発現するため、それぞれの画像を合わせた際に、黄色いミトコンドリアとして検出される。一方、マイトファジーが生じ、ミトコンドリアが pH の低いリソソームに運ばれると、GFP の蛍光の発現は著しく減少する。mCherry は pH の影響を受けにくいいため、それぞれの画像を合わせた際に、マイトファジーを起こしているミトコンドリアが赤色の斑点として検出される。mCherry-GFP-FIS1 を安定的に発現する HeLa 細胞 (FIS1-HeLa 細胞) を樹立し、鉄キレート剤 (DFO) による赤い斑点の増加を確認した (図 2A)。CCCP によっても赤い斑点は増加するが DFO と比較して、軽度であった (図 2A)。また、リソソームの阻害剤である Baf A1 や 3-MA により DFO による赤い斑点が減少したことから、赤い斑点はマイトファジーを示していることを確認した (図 2B)。

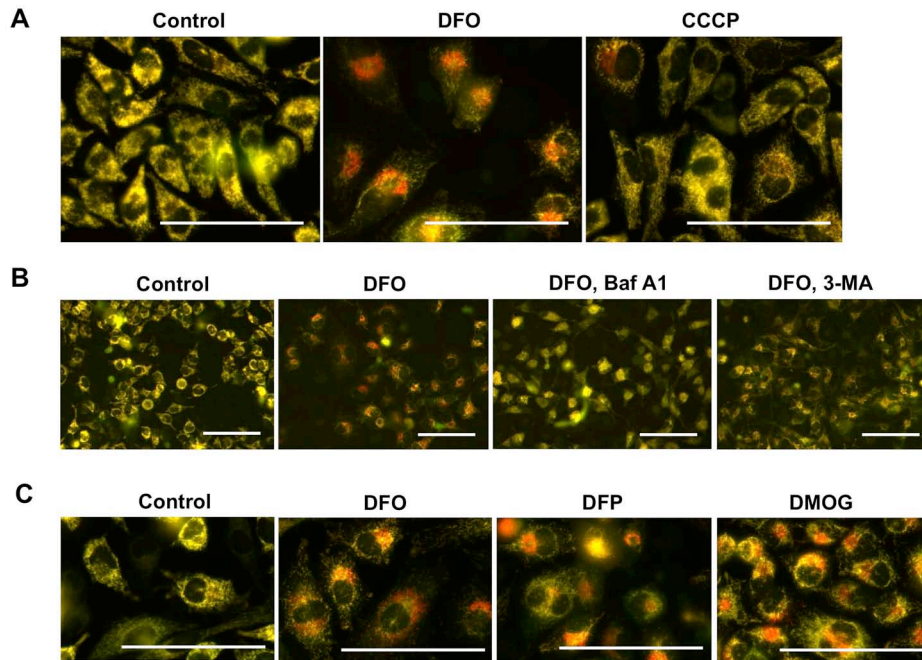


図2. mCherry-GFP-FIS1 プローブの特性

(A) 安定的に mCherry-GFP-FIS1 を発現する HeLa 細胞 (FIS1-HeLa 細胞) を樹立した。DFO 500 μ M または CCCP 20 nM を添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。GFP フィルター (GFP 蛍光)、TexRed フィルター (mCherry 蛍光) で取得した画像を合わせた際、マイトファジーを起こしていないミトコンドリアは黄色、起こしているミトコンドリアは赤色の斑点として検出される。(B) FIS1-HeLa 細胞に Baf A1 または 3-MA を処理し 2 時間後に DFO 500 μ M を添加し、さらに 24 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。(C) FIS1-HeLa 細胞に DFO 500 μ M、DFP 500 μ M、DMOG 500 μ M を処理し、24 時間後に蛍光顕微鏡により観察した。スケールバー：100 μ M。

FIS1-HeLa 細胞に対して 26 種類の化合物の添加もしくはアミノ酸飢餓培地での培養を行い、マイトファジーを誘導するか検討した。その結果、prolyl hydroxylase (PHD) の阻害剤である Dimethyloxaloylglycine (DMOG) が既知のマイトファジー誘導剤 (DFO、Deferiprone: DFP) と同様にマイトファジーを強く誘導することが明らかとなった (図 2C、表 1)。

表 1. mCherry-GFP-FIS1 プローブを用いたマイトファジー誘導剤の探索

化合物	濃度	作用	マイトファジー誘導
Rotenone	500 nM	Complex I 阻害	-
Antimycin A	25 μ M	Complex III 阻害	+
Oligomycin B	2 μ M	ATP 合成酵素阻害	+
Antimycin A, Oligomycin B	10 μ M 2 μ M	Complex III 阻害 ATP 合成酵素阻害	+
Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)	20 μ M	脱共役剤	+
Chloramphenicol	100 μ g/mL	ミトコンドリア翻訳阻害	-
Doxycycline	15 μ g/mL	ミトコンドリア翻訳阻害	-
Rapamycin	200 nM	オートファジー誘導	+
Met・Cys 飢餓		オートファジー誘導	+
Cisplatin	20 μ M	アポトーシス誘導	-
5, 6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-1H-benzimidazole (DRB)	50 μ M	アポトーシス誘導	-
all-trans retinoic acid (ATRA)	1 μ M	ビタミン A 誘導体	-
Resveratrol	100 μ M	Sirt1 活性化	-
LY294002	20 μ M	PI3K 阻害	-
Wortmannin	5 μ M	PI3K 阻害	-
Phenylarsine	10 μ M	酸化ストレス剤	-
Sulforaphane	10 μ M	Nrf2 活性化	-
tBHQ	50 μ M	Nrf2 活性化	-
Carnosic acid	100 nM	Nrf2・ATF4 活性化	+
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)	10 μ g/mL	PKC 活性化	+
Dimethylxaloylglycine (DMOG)	500 μ M	PHD 阻害	+++
Tunicamycin	200 μ M	ER ストレス剤	-
MG132	5 μ M	プロテアソーム阻害	-
Bortezomib	20 nM	プロテアソーム阻害	-
Zinc protoporphyrin (ZnPP)	4 μ M	HO-1 阻害	-
Sulfasalazine (SASP)	500 nM	xCT 阻害	-
(S)-4-Carboxyphenylglycine (4CPG)	200 nM	xCT 阻害	-

26 種類の化合物の添加もしくはアミノ酸飢餓培地での培養を行い、マイトファジーを誘導するかを蛍光顕微鏡により判定した。マイトファジーの誘導が強さを+で示した。

考 察

AcidiFluorORANGE-TPP はマイトファジーをモニターする系ではないことが明らかとなった。TPP にヨウ素を付加した 4-iodobutyl triphenylphosphonium (IBTP) は、脱共役剤 Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) によるミトコンドリアへの局在が失われることが報告されている⁴⁾。このことから、CCCP による蛍光増加は、ミトコンドリアから細胞質へと局在を変えた蛍光プローブがリソソームにて染まっていることが予想され、同蛍光プローブが膜電位低下に依存するマイトファジーと相関を示す可能性は考えられた。限定的ではあるが、AcidiFluorORANGE-TPP は膜電位低下を引き起こすようなマイトファジーを誘導する化合物のスクリーニングの探索には有用である可能性が考えられる。

また、今回樹立した FIS1-HeLa 細胞を用いることにより、簡便にマイトファジー誘導剤をスクリーニングすることができると思われる。実際に DMOG がマイトファジーの誘導剤であることが明らかとなった。今後は、定量法を確立し、大規模な化合物スクリーニングを行うことによりマイトファジー誘導剤の探索に応用できればと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、弘前大学大学院医学研究科の伊東健教授、三村純正博士、諏訪秀行さん、松本駿さんである。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035. PMID: 22424226.
- 2) Leandro GS, Sykora P, Bohr VA. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutat Res*. 2015 Jun;776:31-9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011. Epub 2015 Jan 4. PMID: 26255938.
- 3) Allen GF, Toth R, James J, Ganley IG. Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep*. 2013 Dec;14(12):1127-35. doi: 10.1038/embor.2013.168. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24176932.
- 4) Lin TK, Hughes G, Muratovska A, Blaikie FH, Brookes PS, Darley-Usmar V, Smith RA, Murphy MP. Specific modification of mitochondrial protein thiols in response to oxidative stress: a proteomics approach. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17048-56. Epub 2002 Feb 22. PMID: 11861642.