

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 3年 4月 30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 徳島大学大学院 医歯薬学研究部
職 名 助教
研究代表者 大西 康太

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 20014)

1. 共同研究課題名	天然フラボノイドによる mTORC1 非依存的なオートファジー活性化機序の解明		
2. 共同研究目的	天然由来フラボノイド化合物が、培養細胞において mTORC1 シグナルを制御することなく、オートファジー活性を亢進する分子機序の解明を目的とする。		
3. 共同研究期間	令和 2年 4月 1日 ~ 令和 3年 3月 31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 大西 康太	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 臨床食管理学分野	助教	研究の総括 哺乳動物細胞を用いた実験
(分担研究者) 大橋 一登	群馬大学 生体調節研究所	助教	出芽酵母を用いた実験とその解析
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	生体調節研究所附属拠点 研究支援センター	氏 名 大橋 一登

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

これまでに研究代表者は、ヒト由来培養細胞(HeLa 細胞、及び、Caco-2 細胞)を用いたスクリーニング試験から、オートファジー活性を亢進する数種の食品由来フラボノイド化合物を同定している。興味深いことに、タマネギやリンゴに含まれるイソラムネチンは、上述した2種のヒト培養細胞においてオートファジーを強く誘導するが、オートファジーの主要な制御因子として知られる mTORC1 シグナルに作用しない。一方で、mTOR 阻害剤である Torin1 との共処理による相加作用が認められないことから、イソラムネチンが mTORC2 シグナルを制御することによりオートファジーを活性化する可能性が強く示唆されている。

そこで本研究では、出芽酵母の遺伝子欠損株ライブラリを用いることで、イソラムネチンによるオートファジー誘導メカニズムに mTORC2 シグナルが関与する可能性を検証する実験計画を立てた。しかし、予備的検討の結果、出芽酵母におけるオートファジー活性を評価するための実験系を構築するために予想以上の時間を必要とすることが分かり、また、哺乳動物由来 J774.1 細胞(マウス由来マクロファージ様細胞)において mTORC2 活性欠失株(ric1-KO 細胞)の作出に成功したことから、当初の計画を変更し、J774.1 細胞を用いてイソラムネチンの作用機序解析を進めることにした。

7. 共同研究の成果

J774.1 細胞に対して DQ-BSA(蛍光分子で化学修飾されたアルブミンタンパク質)を処理することで、細胞外異常タンパク質に対する分解活性を定量評価する実験系を構築した。重要なことに、イソラムネチンで本細胞株を前処理することにより DQ-BSA の分解が有意に亢進したことから、イソラムネチンはマクロファージ様細胞においても異常タンパク質分解系を活性化することが明らかとなった。続いて、イソラムネチンが mTOR シグナルに与える影響を検証するために、ウェスタンブロット法により mTORC1 もしくは mTORC2 シグナルの基質タンパク質のリン酸化状態をそれぞれ検証した。その結果、興味深いことに、イソラムネチンは、mTORC1 シグナルには影響を与えない一方で mTORC2 シグナルを強く抑制することが明らかとなった。さらに、イソラムネチンによる DQ-BSA 分解の亢進が mTORC2 シグナルへの作用により誘導されているのかを検証するために、CRISPR/Cas9 system を用いて ric1 をノックアウトした J774.1 細胞株を作出した。重要なことに、ric1-KO 細胞においては、イソラムネチンによる DQ-BSA 分解の亢進作用がほぼ完全にキャンセルされた。最後に、野生型、もしくは ric1 欠損細胞から回収した RNA サンプルを RNA-seq 解析に供したところ、イソラムネチンの処理により発現変動する 2333 遺伝子のうち、約 95%にあたる 2231 遺伝子の発現変動が、ric1 の発現、つまり、mTORC2 シグナルに依存することが明らかとなった。以上の結果から、イソラムネチンは mTORC2 シグナルを抑制することで培養細胞のトランスクリプトームに影響を与えること、また、本作用を通して、異常タンパク質分解活性を亢進することが明らかとなった。現在、本共同研究成果をまとめた学術論文の投稿準備中である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
該当無し。

② この共同研究に基づくとの記載のある論文
該当無し。

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)
日本農芸化学会 2020 年度 中四国支部大会(第 57 回講演会)、2020 年 9 月 18 日、Mφにおける異常タンパク質分解を促進するイソラムネチンの作用機序解析

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)
・メールにて実験結果の共有
・月に1度ほど、電話にて実験結果についてのディスカッションと、研究推進方針についての打ち合わせ
・論文投稿に際して原稿の確認と修正