

選択的オートファジー アプタマー

—総説—

p62 body を介する選択的オートファジーの
分子機構と生理機能

順天堂大学 高田 周平、小松 雅明、九州大学 森下 英晃

次世代の分子認識素子「核酸アプタマー」の
開発と今後の展望

熊本大学 北村 裕介

—連載—

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～④

生命が体内エネルギーの恒常性を維持する
脳内メカニズム

熊本大学 戸田 知得

—注目の研究—

新しいタンパク質分解機構 GOMED

株式会社同仁化学研究所 平川 哲央

新製品 オートファジー経路測定キット P.5

関連製品 オートファジー検出試薬 P.7



CONTENTS

Review

p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構と生理機能

Mechanism and functions of p62 body-mediated selective autophagy

順天堂大学大学院 高田 周平 小松 雅明

九州大学大学院 森下 英晃

1

Topics on Chemistry

新しいタンパク質分解機構 GOMED

株式会社同仁化学研究所 平川 哲央

6

Review

次世代の分子認識素子「核酸アプタマー」の開発と今後の展望

Development and future prospects of nucleic acid aptamers, next generation elements for molecular recognition

熊本大学大学院 北村 裕介

8

連載

生命科学の最前線～熊本大学若手研究者の現場から～④

生命が体内エネルギーの恒常性を維持する脳内メカニズム

Brain mechanisms to maintain energy homeostasis

熊本大学大学院 戸田 知得

13

Commercial

新製品

オートファジー経路測定キット…………… 5

関連製品

オートファジー検出試薬…………… 7

解糖系/ミトコンドリア膜電位測定キット……………17

お役立ち

製品名称変更のご案内……………16

財団法人設立のお知らせ……………16

学会展示のご案内……………16

脂肪酸分析のご案内ー同仁グローバル……………18

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

※記載価格は本誌発行時における希望納入価格です。

予告なしに変更する場合がございますのでご注意ください。

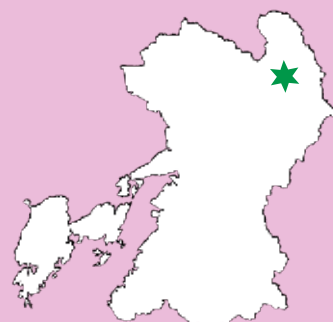
※掲載製品は試験・研究用のみに使用するものです。医療用その他の目的には使用できません。



表紙：阿蘇 烏帽子岳と噴煙

草千里から烏帽子岳へ登る途中、中岳の噴煙をバックにミヤマキリシマを撮影。ミヤマキリシマはツツジの一種であり、九州の韓国岳、九重、阿蘇、雲仙に咲く。

photo：永島俊介氏



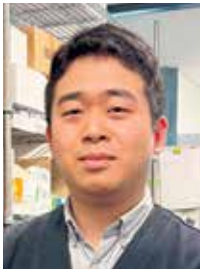
小社製品の最新情報や使用文献などを投稿しています。



フォロー
お願いします

@dojindoinfo

p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構と生理機能 Mechanism and functions of p62 body-mediated selective autophagy



高田 周平

順天堂大学大学院
医学研究科 器官・細胞生理学
博士課程 4年



小松 雅明

順天堂大学大学院
医学研究科 器官・細胞生理学
主任教授



森下 英晃

九州大学大学院
医学研究院 生体機能学分野
教授

Abstract

Selective autophagy can degrade not only membrane-bound organelles but also biomolecular condensates, including phase-separated p62/SQSTM1 body, but its molecular mechanisms and physiological relevance remain unclear. In this manuscript, we discuss the mechanism and role of p62 body-mediated selective autophagy. We further present our recent findings on the development of a purification method for phase-separated p62 bodies and the discovery of “vault-phagy”, a p62 body-mediated selective autophagy of the supramolecular vault complex.

1. はじめに

オートファジーはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ代表的な細胞内分解機構の一つであり、細胞内の成分をリソソームに輸送することでそれらを分解する仕組みである。オートファジーは基質の輸送経路の違いから、マクロオートファジー（オートファゴソームを介して基質をリソソーム内に輸送する）、ミクロオートファジー（リソソーム膜の陥入により基質をリソソーム内に輸送する）、シャペロン介在性オートファジー（リソソーム膜のトランスポーターを介して基質をリソソーム内に輸送する）の3タイプに分類され、これらのうちマクロオートファジー（以後、単にオートファジーと呼ぶ）は最も研究が進んでいる。オートファジーが発見されたのは1960年前後であるが¹⁾、その分子機構や生理機能は長らく不明であった。しかし、1990年代の大隅良典博士らによる出芽酵母を用いたオートファジー関連遺伝子群の発見を端緒として、2000年代にはオートファジー関連遺伝子欠損マウスを用いた生理機能解析が爆発的に進んだ結果、オートファジーは飢餓適応や細胞内品質管理に重要な役割を担うことが明らかになった²⁾。さらに、オートファジーは細胞内成分をランダムに分解するだけでなく、異常あるいは過剰な細胞内成分を選択的に分解する「選択的オートファジー」と呼ばれる重要な作用を有することも明らかになった。選択的オートファジーの基質選択性は、基質とオートファゴソーム関連因子の両者と結合するオートファジー受容体 (autophagy receptor) によって担保されており、ミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソーム、細胞内侵

入性細菌、凝集体等の選択的基質に対応する様々なオートファジー受容体が存在する³⁾。本稿では、代表的な選択的基質であるポリユビキチン化タンパク質を含む p62 body を介する選択的オートファジーに焦点を絞り、その分子機構、意義、関連疾患について概説するとともに、最近筆者らが見出した p62 body を介する新たな選択的オートファジーの経路「ヴォルトファジー」⁴⁾ についての知見も紹介する。

2. p62 body を介する選択的オートファジー

生理的条件下やストレス条件下では、液-液相分離 (LLPS) によって p62 body 等の様々な生体分子凝縮体 (biomolecular condensate) が形成され、それらの一部は選択的オートファジーによって分解される。以下では、p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構、意義、関連疾患について概説する。

2.1 p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構

p62 body はサイトゾルに形成されるユビキチン陽性の生体分子凝縮体であり、その形成には p62 とユビキチン化タンパク質が必要である^{5, 6)}。p62 はマルチドメインタンパク質であり、N末端の PB1 (Phox and Bem1p) ドメインで p62 の別の分子と結合し自己オリゴマー化する一方で、LC3 相互作用領域 (LIR) でオートファゴソーム上の Atg8 ファミリータンパク質と、LIR を含む天然変性領域でオートファゴソーム形成の最上流因子 FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa) と⁷⁾、

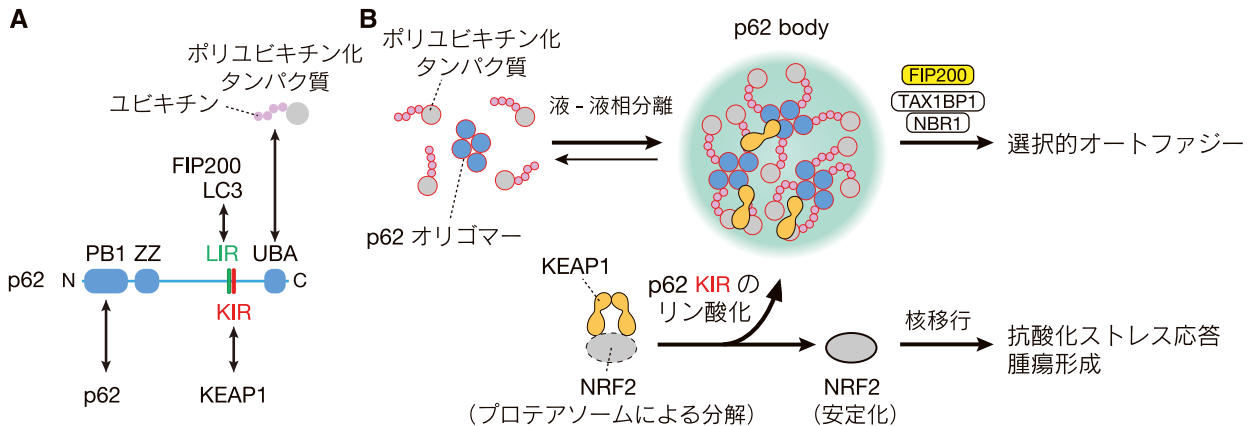


図1 p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構と生理的意義

A, p62 のドメイン構造とその主要な結合分子。PB1: Phox and Bem1p, ZZ: ZZ 型ジンクフィンガーモチーフ、UBA: ユビキチン関連 (UBA) ドメイン、LIR: LC3 相互作用領域、KIR: KEAP1 相互作用領域。
 B, ポリユビキチン化タンパク質と p62 オリゴマーが結合すると液-液相分離が起こり、p62 body が形成される。p62、NBR1、TAX1BP1 などのオートファジー受容体は、FIP200 等のオートファジー関連因子群を p62 body 上にリクルートし、p62 body 表面におけるオートファゴソームの形成を誘導する。p62 body は、KEAP1 などのクライアントタンパク質とともに選択的オートファジーにより分解される。KEAP1 は定常状態では NRF2 と相互作用し、NRF2 をユビキチン化することで、プロテアソームによる NRF2 の分解を誘導する。p62 body が形成され、p62 の KIR がリン酸化されると、p62 と KEAP1 の相互作用が強化され、p62 は KEAP1 と NRF2 の結合を競合的に阻害する。その結果、NRF2 のユビキチン化の阻害、NRF2 の安定化、核内移行、抗酸化ストレス応答遺伝子発現が誘導される。

C 末端のユビキチン関連 (UBA) ドメインでポリユビキチン化タンパク質と結合する (図 1A)。p62 は PB1-PB1 相互作用を通して p62 フィラメントと呼ばれるらせん構造を形成する⁶⁾。オリゴマー化した p62 はポリユビキチン化タンパク質と相互作用することで液-液相分離し、p62 body を形成する (図 1B)。p62 body の形成には PB1 と UBA ドメインが必須である⁵⁾。

p62 body にはさらに NBR1 (Next to BRCA1, gene 1)、TAX1BP1 (Tax1-binding protein 1) 等のオートファジー受容体が集積し、これらの受容体はさらに FIP200 等のオートファジー関連タンパク質をリクルートすることで⁸⁾、p62 body の表面においてオートファゴソーム形成を誘導する (図 1B)。p62 とオートファゴソーム膜上の Atg8 ファミリータンパク質 (LC3 や GABARAP ファミリー分子) との結合は、p62 body の表面とオートファゴソーム膜のウェットティング (wetting、濡れ現象) や膜伸長の方向の決定に必要である^{9, 10)}。

2.2 p62 body を介する選択的オートファジーの意義と関連疾患

p62 body を介する選択的オートファジーは、ポリユビキチン化タンパク質の効率的な分解だけでなく、p62 body を介するストレス応答の制御にも重要な役割を担っている¹¹⁻¹⁴⁾。例えば、Cullin 3 ユビキチン E3 リガーゼのアダプタータンパク質である KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) は、定常状態では抗酸化ストレス応答に重要な転写因子 NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) と相互作用し、NRF2 をユビキチン化することで、プロテアソームによる NRF2 の分解を誘導する (図 1B)。一方、p62 body が形成され、p62 の KEAP1 結合領域 (KIR) が p62 body の内部でリン酸化されると、p62 は KEAP1 と強く相互作用し、KEAP1 と NRF2 の結合を競合的に阻害する。その結果、KEAP1 による NRF2 のユビキチン化が阻害され、NRF2 の安定化、核内移行、抗酸化ストレス応答の活性化が引き起こされる¹¹⁾。肝臓特異的にオートファジーを欠損させたマウスでは肝細胞内にリン酸化 p62 を多量に含む p62 body が形成され、それらの p62 body に KEAP1 が隔離される。その結果、NRF2 依存的な抗酸化ストレス応答が過剰に活性化し、肝障害、肝腫大、肝腫瘍形成等を引き起こす¹¹⁻¹³⁾。

アルコール性脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、原発性胆汁性肝硬変、非アルコール性肝硬変、肝細胞がん等の患

者の肝細胞内では、しばしばリン酸化された p62 やユビキチン化タンパク質を含むマロリーデンク体 (Mallory-Denk body) と呼ばれる構造体が出現する¹⁵⁾。マロリーデンク体の形成、p62 のリン酸化は、NRF2 の活性化、肝細胞がんの増殖に寄与している¹²⁾。さらに肝細胞がん前駆細胞における p62 の蓄積は、NRF2 の活性化だけでなく mTORC1-c-Myc 経路も活性化することで、肝細胞がんへの進展を促進する¹⁶⁾。したがって、マロリーデンク体は、腫瘍形成とがん化の両方の作用を有すると考えられる。しかし、マロリーデンク体の構成成分やそれらの分解の意義については未だにほとんど不明である。

3. p62 body 精製法の開発

以上のように、近年、p62 body を介する選択的オートファジーの分子機構や意義についての理解は徐々に進んでいる一方で、p62 body の構成成分については未だにほとんど不明であり、p62 body の形成、分解の意義は分子レベルでは進んでいない。この原因として、相分離により形成された p62 body は構造的に脆弱であるため、従来の免疫沈降法等の方法では p62 body を単離しその構成成分を解析することは非常に困難であったことが挙げられる。そこで我々は最近、P-body (Processing body) の精製方法¹⁷⁾を改良することで、セルソーターを用いて p62 body を効率的に精製可能な方法を開発した⁴⁾ (図 2)。この方法では、まず p62 body を豊富に有している細胞 (例: ヒト肝細胞がん株 Huh-1) に GFP-p62 を低発現させ、p62 body を GFP 標識する (図 2)。次に p62 body の流動性を低下させる作用を有する NBR1¹⁸⁾ (p62 と結合するオートファジー受容体) をアデノウイルスを用いて細胞に高発現させ、p62 body の数を増加させる。これらの細胞を低濃度の界面活性剤存在下で破碎し、セルソーターを用いて細胞破碎液から GFP 標識 p62 body を精製する (図 2)。精製した p62 body は、蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロットティング、質量分析等の様々な解析に使用することができる⁴⁾。なお精製した p62 body の質量分析の結果、主要な p62 body 構成タンパク質 (ユビキチン、p62、NBR1、TAX1BP1、KEAP1 等) の種類は NBR1 の過剰発現によって変動しなかったため、NBR1 の過剰発現は p62 body の構成成分の種類には大きな影響を与えないと考えられる⁴⁾。今回我々が開発した p62 body 精製法は、各種ストレスや疾患における p62 body の構成因子の同定とそれらの分解の意義、関連疾患の病態の理解に貢献できるものと考えられる。

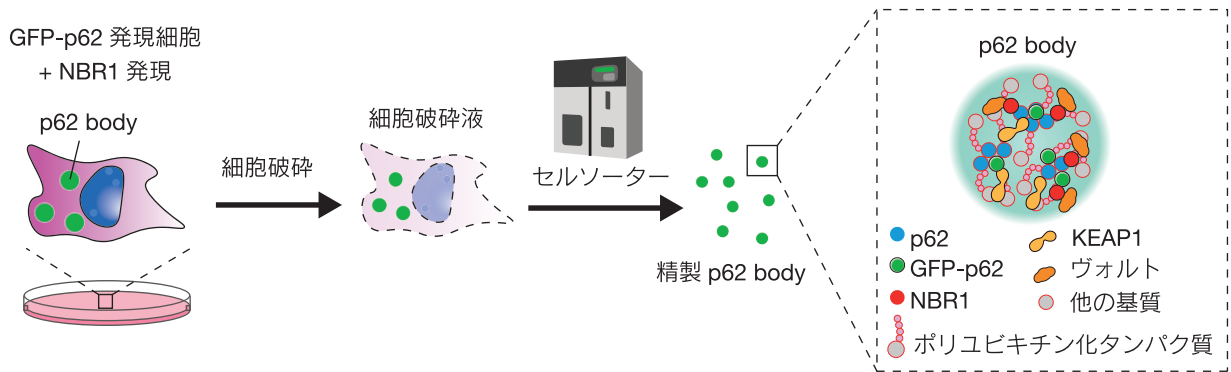


図2 セルソーターを用いた p62 body 精製法

まず GFP-p62 低発現細胞に p62 の結合パートナーである NBR1 を発現させることで、p62 body の流動性を低下させ、p62 body の数を増加させる。その後、細胞を破碎し、セルソーターを用いて細胞破碎液から GFP 標識された p62 body を精製する。精製した p62 body は蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロッティング、質量分析等に使用できる。

4. p62 body を介する新たな選択的オートファジー経路「ヴォルトファジー」の発見

我々は p62 body を介する選択的オートファジーで分解される新規基質を同定するため、Huh-1 細胞から精製した p62 body の質量分析と、肝臓特異的選択的オートファジー阻害マウス⁹⁾の肝臓の質量分析を組み合わせた⁴⁾。その結果、p62 body に含まれ、かつ p62 body を介する選択的オートファジーによって分解される新規基質として、細胞小器官ヴォルト (vault) を同定することに成功した (図3)⁴⁾。以下では、p62 body を介する選択的オートファジーによるヴォルトの分解 (「ヴォルトファジー」と命名⁴⁾) の分子機構、意義、関連疾患について概説する。

4.1 細胞小器官「ヴォルト」

ヴォルトは 1986 年に発見された細胞小器官であり¹⁹⁾、高等真核生物に保存されており、様々な組織に存在している。ヴォルトはリボソームの 3 倍の大きさを有する巨大なリボ核酸タンパク質複合体であり、ヴォルトの外殻は 78 分子の MVP (Major vault protein) から構成され、内部には PARP4 (Poly[ADP-Ribose] polymerase family member 4)、TEP1 (Telomerase associated protein 1)、およびノンコーディング RNA の vtRNA が存在している (図3A)。驚くべきことに発見から約 40 年経過した現在においても、ヴォルトの生理機能は未だにほとんど解明されていない。

4.2 ヴォルトは NBR1 依存的に p62 body に集積し、p62 body を介する選択的オートファジーより分解される

ヴォルトは Huh-1 細胞において恒常的に p62 body に局在しており、この局在は NBR1 を過剰発現した細胞で増強する一方で、NBR1 欠損細胞では消失し、ヴォルトの分解も阻害される⁴⁾。さらに肝臓特異的に NBR1 を欠損させたマウスの肝臓ではヴォルトの蓄積を認めることから、ヴォルトは NBR1 を介して p62 body に集積し分解されることが明らかになった⁴⁾ (図3B)。さらにオートファジーに必須な FIP200 あるいは p62 を欠損させた細胞では、ヴォルトの蓄積を認め、p62 欠損細胞で認められたヴォルトの蓄積は p62 body を形成することができない変異体 p62 K7A/D69A ではレスキューされることがわかった⁴⁾。したがって、ヴォルトは p62 body を介する選択的オートファジーによって恒常的に分解されていることが明らかになった。

4.3 ヴォルトは NBR1 の UBA ドメインと直接結合する

一般的にユビキチン結合ドメイン (UBA) を有する NBR1 等のオートファジー受容体は、その UBA ドメインを介してポリユビキチン化タンパク質と相互作用する。FLAG-NBR1 発現 Huh-1 細胞を用いて抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行なったところ、ヴォルトの構成要素である MVP、PARP4、TEP1 を検出でき、この相互作用には NBR1 の UBA ドメインが必要かつ十分であった⁴⁾。次にユビキチン化が起こらない大腸菌で作製した MVP と NBR1 UBA のリコンビナントタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行なったところ、MVP はユビキチン化されていないに関わらず予想外にも NBR1 UBA によってプルダウンされ、この相互作用

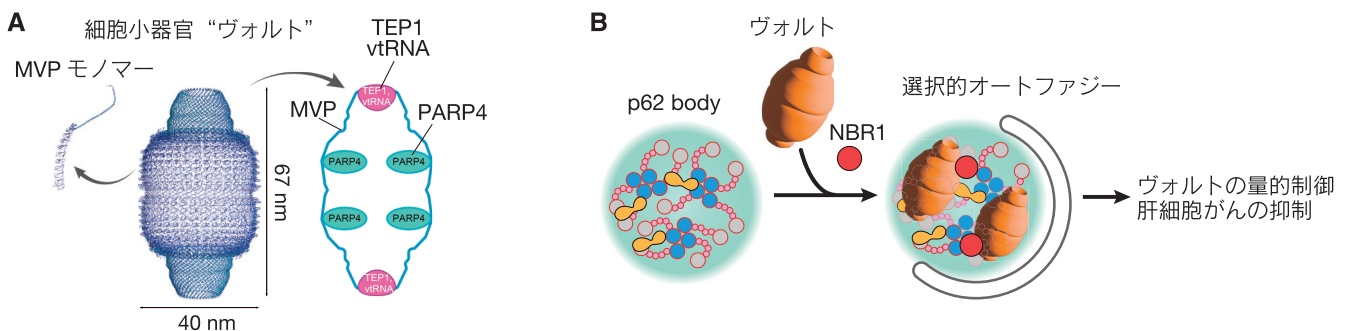


図3 p62 body を介する新たな選択的オートファジー「ヴォルトファジー」

A, 細胞小器官「ヴォルト」の構造 (PDB6BP8) と構成因子の模式図。ヴォルトの外殻は MVP (major vault protein) モノマーが 78 分子集積することで構成されており、内部には PARP4、TEP1、vtRNA が存在する。
B, ヴォルトは NBR1 の UBA ドメインと相互作用することで p62 body に集積し、p62 body とともに選択的オートファジーで分解される。ヴォルトファジーは恒常レベルでのヴォルトの量的制御に貢献するとともに、NASH 由来肝細胞がんの発症の抑制に寄与していると考えられる。

用はユビキチンによって競合阻害された⁴⁾。したがって、MVPはNBR1のUBAドメインのユビキチン相互作用部位近傍とユビキチン化非依存的に相互作用できることが強く示唆された⁴⁾。さらに高速原子間力顕微鏡を用いた解析の結果、NBR1のUBAドメインはヴォルト粒子のショルダー領域と結合することが示唆された(図3)。さらに変異体解析の結果、ヴォルトのショルダー領域に相当するMVPのループ構造(607-623aa)がNBR1のUBAドメインとの相互作用することが、ヴォルトの分解に必要であることがわかった⁴⁾。

4.4 ヴォルトファジーの障害は非アルコール性脂肪肝炎由来肝細胞がんに関連する

我々はヴォルトファジーの意義を解析するため、p62 bodyのオートファジー分解が抑制されていることが複数のマウスモデルにおいて報告されているNASH由来肝細胞がん¹⁶⁾に注目した。NASH由来肝細胞がん患者の臨床検体(腫瘍部と非腫瘍部を採取)におけるMVP、p62、NBR1をウェスタンブロッティング解析した結果、いずれのタンパク質も非腫瘍部と比べて腫瘍部において蓄積を認め、MVPの増加はp62やNBR1の増加と相関していた⁴⁾。さらに、NASH由来肝細胞がんの腫瘍部において、MVPとNBR1はp62陽性マロリーデンク体と共局在することが明らかになった⁴⁾。これまでに、マウスモデルを用いた解析からMVPの増加は肝細胞がんを促進すること、ヒト肝細胞がん患者ではMVPの量は肝細胞がんの悪性度、生存率低下と相関することが報告されている²⁰⁾。したがって、p62 bodyの分解低下によるヴォルトファジーの障害が、ヒトNASH由来肝細胞がんの発症に寄与している可能性が強く示唆された。

5. おわりに

本稿では、p62 bodyを介する選択的オートファジーの分子機構や意義に焦点を絞り、最近我々が発見したヴォルトファジーに関する知見も交えながら概説した。しかし、p62 bodyを介する選択的オートファジーには未だに多くの謎が残されている。例えば、p62 body上に形成されるオートファゴソームの膜供給源は何か？ p62 bodyの性状(リン酸化状態、流動性、表面張力等)はオートファゴソームの形成に影響するのか？ p62 body内部に存在するユビキチン化タンパク質の種類およびそれらのユビキチン化のメカニズム・意義は？ 各種ストレスや加齢に応じてp62 bodyの構成成分はどのように変動するのか？ ヴォルト以外の巨大超分子複合体や他の生体分子凝集体もp62 bodyに集積し分解されるのか？ p62 body分解の障害はどのような疾患と関連しているのか？ 各臓器におけるヴォルトファジーの生理機能は何か？ ヴォルトファジーの障害はどのようなメカニズムで肝細胞がんを促進するのか？ といった多くの問いが未解決のまま残されている。また、p62自身やp62とユビキチン化タンパク質との相互作用を正に制御するTBK1(TANK-binding kinase 1)をコードする遺伝子への変異が筋萎縮性側索硬化症(ALS)において同定されており²¹⁾、p62 bodyとALSとの関連の理解も大きな課題である。今後これらの課題が解決されることで、選択的オートファジーについての包括的理解が進むことが期待される。

[参考文献]

- 1) D. J. Klionsky. *Autophagy*, **2008**, 4(6), 740-743.
- 2) N. Mizushima and M. Komatsu. *Cell*, **2011**, 147(4), 728-741.
- 3) J. Vargas et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2023**, 24(3), 167-185.
- 4) R. Kurusu et al., *Dev. Cell*, **2023**, 58(13), 1189-1205.
- 5) D. Sun et al., *Cell Res.*, **2018**, 28(4), 405-415.
- 6) G. Zaffagnini et al., *EMBO J.*, **2018**, 37(5), e98308.
- 7) E. Turco et al., *Mol. Cell*, **2019**, 74(2), 330-346.
- 8) E. Turco et al., *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 5212.
- 9) S. Kageyama et al., *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 16.
- 10) J. Agudo-Canalejo et al., *Nature*, **2021**, 591(7848), 142-146.
- 11) M. Komatsu, *Nat. Cell Biol.*, **2010**, 12(3), 213-223.
- 12) M. Komatsu, *IUBMB Life*, **2022**, 74(12), 1200-1208.
- 13) M. Komatsu et al., *J. Cell Biol.*, **2005**, 169(3), 425-434.
- 14) G. Bjørkøy et al., *J. Cell Biol.*, **2005**, 171(4), 603-614.
- 15) H. Denk et al., *Expert Opin. Ther. Targets*, **2019**, 23(5), 393-406.
- 16) A. Uemura et al., *Cancer Cell*, **2016**, 29(6), 935-948.
- 17) A. Hubstenberger et al., *Mol. Cell*, **2017**, 68(1), 144-157.
- 18) P. Sánchez-Martín et al., *EMBO Rep.*, **2020**, 21(3), e48902.
- 19) N. L. Kedersha and L. H. Rome, *J. Cell Biol.*, **1986**, 103(3), 699-709.
- 20) H. Yu et al., *Hepatology*, **2020**, 72(2), 518-534.
- 21) E. Cirulli et al., *Science*, **2015**, 347(6229), 1436-1441.

[著者プロフィール]

氏名：高田 周平 (Shuhei Takada)

所属：順天堂大学大学院医学研究科 器官・細胞生理学 博士課程
4年

〒113-8421 東京都文京区本郷2丁目1番1号A棟8階

TEL 03-5802-1029

E-mail : s.takada.zc@juntendo.ac.jp

出身学校：東京理科大学

学位：博士課程(医学)在学中

専門分野：細胞生物学、分子生物学

現在の研究テーマ：選択的オートファジー

氏名：小松 雅明 (Masaaki Komatsu)

所属：順天堂大学大学院医学研究科 器官・細胞生理学 主任教授

〒113-8421 東京都文京区本郷2丁目1番1号A棟8階

TEL 03-5802-1029

E-mail : mkomatsu@juntendo.ac.jp

出身学校：明治大学、順天堂大学

学位：博士(医学)

専門分野：病態医化学、細胞生物学、分子生物学

現在の研究テーマ：選択的オートファジー、UFM1 システム

氏名：森下 英晃 (Hideaki Morishita)

所属：九州大学大学院医学研究院 生体機能学分野 教授

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 生体機能学分野

TEL 092-642-6053

E-mail : morishita.hideaki.769@m.kyushu-u.ac.jp

出身学校：九州大学、東京医科歯科大学

学位：博士(医学)

専門分野：細胞生物学、発生生物学、医化学、分子生物学

現在の研究テーマ：選択的オートファジー、大規模細胞内分解

新製品

オートファジー経路測定キット

Autophagic Flux Assay Kit

<特長>

- ・オートファジーの誘導もしくはオートリソソームの阻害を解析できる
- ・誘導評価、阻害評価それぞれのプロトコルを準備
- ・リソソーム酸性化阻害剤同梱のオールインワンキット

オートファジーは細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官の再利用や代謝分解過程の現象ですが、パーキンソン病などの神経変性疾患や老化にも関わりがあることが分かってきており盛んに研究されています。近年では、オートファゴソームが増えた要因がオートファジー誘導によるものなのか、それともオートリソソーム阻害によるものなのかを区別することが求められてきており、オートファジー過程の流れ (Flux) を理解することが重視されています。

本キットは、オートファゴソームの形成からオートリソソームの分解までをモニタリングし、オートファジーの活性を正しく評価するために、オートファゴソームおよびオートリソソームを検出する DAPRed とオートリソソームを検出する DALGreen、さらにリソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1 を同梱しています¹⁾。

1) H. T. Sakurai *et al.*, *iScience*, **2023**, 26, 107218.

<原理>

本キットに同梱される DAPRed はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。一方、DALGreen は凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム段階で蛍光を発します。このように DAPRed と DALGreen は、オートファゴソーム形成およびリソソームとの融合・内容物の分解の過程を試薬の添加だけでモニタリングすることができます^{2, 3)}。

2) X. Chen *et al.*, *Am. J. Transl. Res.*, **2020**, 12(9): 4902-4922.

3) C. Oh *et al.*, *J. Neurosci.*, **2022**, 42(14), 3011-3024.

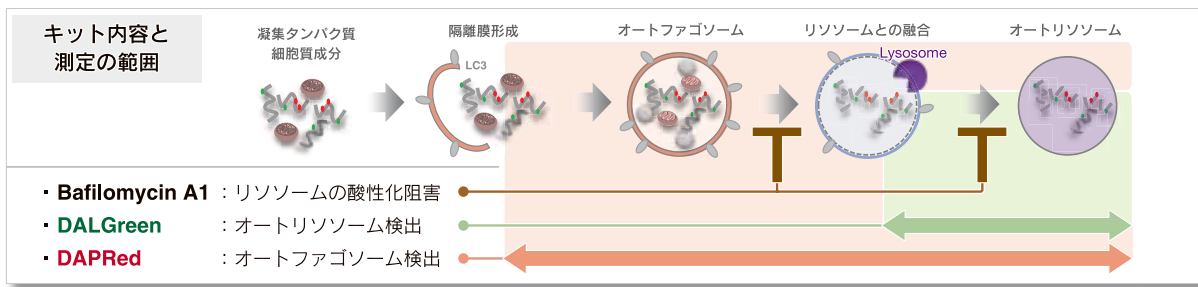


図1 DAPRed と DALGreen の同時測定によるオートファジー経路解析

<オートファジー経路を解析する>

本キットを用いて、リソソーム酸性化阻害剤 Bafilomycin A1 (Baf. A1) を用いたオートファジー経路の解析を行いました。コントロール実験として HeLa 細胞をアミノ酸不含培地で培養し、飢餓培養によるオートファジーの誘導が DAPRed と DALGreen の蛍光増加により確認できました。一方で、Baf. A1 を添加した場合には、DAPRed の蛍光は増加しましたが、DALGreen の蛍光は低下することが観察されました。この結果から、オートファジー経路はオートリソソームの形成が阻害されたことでオートファゴソームが増加したということがわかります。

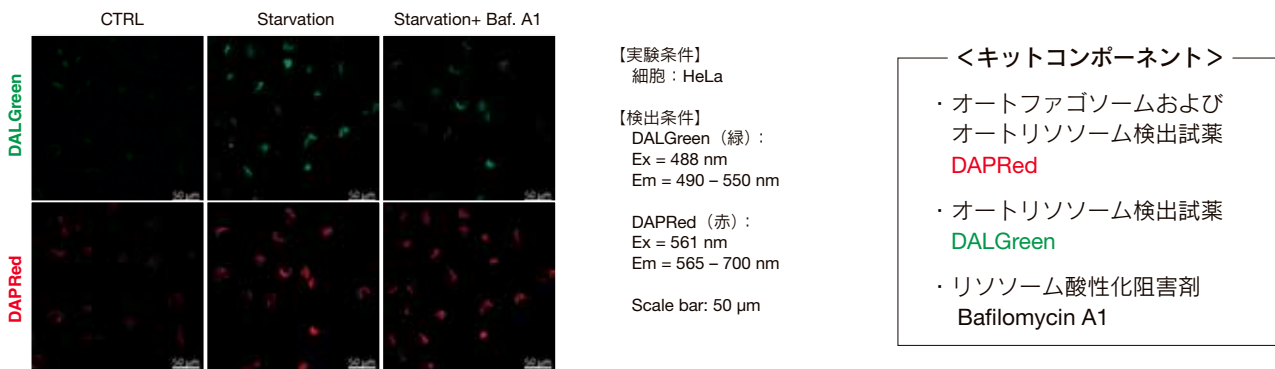


図2 リソソーム酸性化阻害剤 A1 (Baf. A1) を用いたオートファジー経路の解析

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Autophagic Flux Assay Kit	1 set	39,000	A562

Topics on Chemistry

新しいタンパク質分解機構 GOMED

株式会社同仁化学研究所 平川 哲史

ゴルジ体は小胞体から送られてくる様々なタンパク質を修飾し、適切な場所へ輸送するオルガネラであることから細胞の郵便局と呼ばれ、重要な役割を担っている¹⁾。近年、このゴルジ体に関して新しいタンパク質分解機構が発見された。オートファジーと似ているものの、機能面や、関与するタンパク質などが異なることから、この機構は Golgi membrane-associated degradation (GOMED) pathway と名付けられ現在盛んに研究が行われている。本稿ではこの GOMED と、小社試薬を用いた新しい解析法について紹介したい²⁾。

オートファジーは主にマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーと3つに分けられる。その中のマクロオートファジー（以降、オートファジーと呼ぶ）は、隔離膜が出現して伸びていき、不要物が袋状の二重膜（オートファゴソーム）に包まれ、その後リソソームと融合（オートリソソーム）し分解、といった流れをとる。GOMED も同様の機構を辿るが、隔離膜の起源が異なり、オートファジーは小胞体膜、GOMED はゴルジ体膜から隔離膜が形成される。

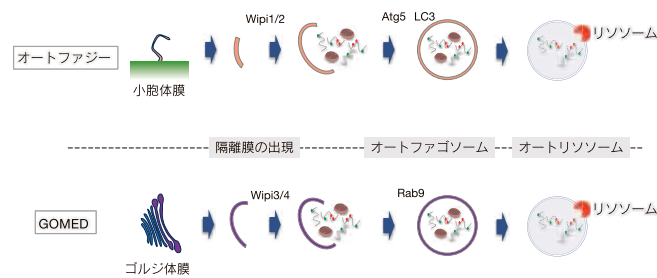


図1 オートファジーと GOMED

GOMED の生体内の機能については様々な報告がなされており、オートファジーとは異なる役割で生体の恒常性維持に役立っている。例えば、低血糖時、更なる血糖の分解を防ぐために GOMED が誘導され過剰なインスリンを分解する³⁾。また、脳においては鉄の蓄積を防ぎ、オートファジーとは異なった機構で神経細胞の状態を維持している²⁾。他にも、虚血性心疾患や心不全から心臓を保護する役割を担っていたり^{4) 5)}、赤血球成熟過程におけるミトコンドリア除去に関与したりしている⁶⁾。

もともと、オートファジーは電子顕微鏡により初めて発見され、その構造体の観察には透過型電子顕微鏡 (TEM) や走査電子顕微鏡 (SEM) などが使用されている。現在、GOMED のみを特異的に検出する方法はまだ開発されていないが、既知の検出方法などを組み合わせることによりオートファジーとの区別が可能である。例えば光学顕微鏡による蛍光像と電子顕微鏡像を相関させ、画像を重ね合わせる光 - 電子相関顕微鏡法 (CLEM) を用い、オートファジー構造にのみ局在する LC3 タンパク質を赤色蛍光タンパク質 mCherry で標識し発現させると、電子顕微鏡で観察された構造が、オートファジーであるか、GOMED であるか見分けることが可能となる。

また、オートファジーを観察する別の手法としてリソソームに局在する Lamp1 タンパク質に緑色蛍光タンパク質 GFP を標識し発現させる方法がある。リソソームは直径 100-500 nm の小さな構造体だが、オートリソソームを形成する際は直径 300-1000 nm 程の大きさとなり、この大きさの違いによりオートファジーが起きているかどうかを判断できる。ここに Lamp1-GFP と mCherry-LC3 を組み合わせることで、オートファジーは緑色と

赤色の混色、GOMED は緑色の単色として観察できる。他にもまた、GOMED のみを確認したい場合にはオートファジーに必要な Atg5 タンパク質をノックアウト (KO) した細胞を用いる手法も有効である。

小社から販売しているオートファゴソーム検出蛍光色素 DAPGreen 及び DAPRed と、オートリソソーム検出蛍光色素 DALGreen を組み合わせた解析も報告されている。DAPGreen はオートファジーや GOMED の初期段階から緑色の蛍光で検出されるのに対し、DAPRed は中間段階（オートファゴソーム生成の少し前）の構造を赤色の蛍光で検出することができる。つまり DAPGreen と DAPRed を併用すれば、初期段階の構造は緑色として、中間段階以降の構造は赤色と緑色の混色にて検出可能となっている。さらに、DALGreen はオートリソソームのみを緑色蛍光で検出できるので DAPRed と組み合わせると、中間段階は赤色、後期段階は赤色と緑色の混色で検出できる。このように、これら3種類の蛍光プローブを用いることで、オートファジーの詳細や、Atg5 KO 細胞を用いることにより GOMED の動態を解析することが可能となった^{2) 7)}。

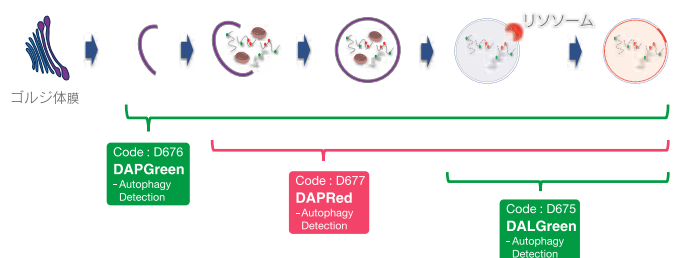


図2 DAPGreen、DAPRed、DALGreen を用いた検出

今回 GOMED の役割や検出方法に関して紹介したが、まだその内容は明らかになっていない。将来さらに研究が進み、多くの疾患治療へ繋がることを期待するとともに、小社試薬が少しでも研究の一助となるよう、今後も製品開発を進めていく。

[謝辞]

DAPGreen、DAPRed、DALGreen を開発するにあたり甚大なるご協力を賜りました東京医科歯科大学の清水重臣教授（執筆時）、鳥居暁准教授、兵庫県立大学 桜井一助教に深く感謝致します。

[参考文献]

- 1) A. Doerr, "Microscopy matures, and so does the Golgi", *Nat. Methods*, **2006**, 3, 496.
- 2) H. Tajima-Sakurai et al., "An Overview of Golgi Membrane-Associated Degradation (GOMED) and Its Detection Methods", *Cells*, **2023**, 12, 2817.
- 3) H. Yamaguchi et al., "Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals", *EMBO J.*, **2016**, 35, 1991-2007.
- 4) T. Saito et al., "An alternative mitophagy pathway mediated by Rab9 protects the heart against ischemia", *J. Clin. Investig.*, **2019**, 129(2), 802-819.
- 5) M. Tong et al., "Alternative Mitophagy Protects the Heart Against Obesity-Associated Cardiomyopathy", *Circ. Res.*, **2021**, 129, 1105-1121.
- 6) S. Honda et al., "Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes", *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 4004.
- 7) H. Tajima-Sakurai et al., "Development of small fluorescent probes for the analysis of autophagy kinetics", *iScience*, **2023**, 26, 107218.

関連製品

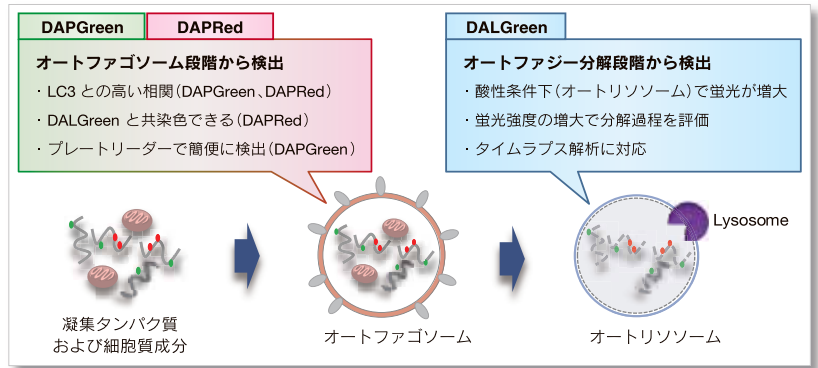
オートファジー検出試薬

DAPRed - Autophagy Detection
DAPGreen - Autophagy Detection
DALGreen - Autophagy Detection

オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質・細胞内小器官等の再利用や代謝のための分解機構としての様々な疾患への関与が示唆されています。DAPRed, DAPGreen, DALGreen は培養細胞に添加するだけで簡単にオートファジーを検出できる蛍光試薬です。

<原理>

DAPRed, DAPGreen はオートファゴソーム膜に取り込まれ蛍光を発します。一方、DALGreen も同様にオートファゴソーム形成時に取り込まれますが、凝集タンパク質等が分解されるオートリソソーム内で蛍光を発します。DAPRed, DAPGreen, DALGreen は試薬を添加するだけで、オートファゴソーム形成およびリソソームとの融合・内容物の分解の過程をモニタリングすることができます。



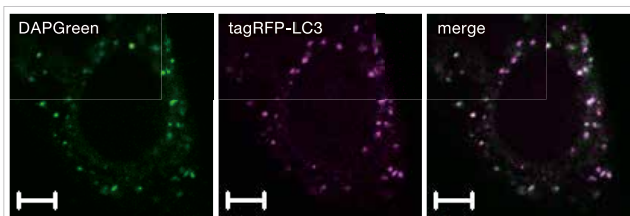
■ 特性比較

	対応装置			蛍光特性	使用回数の目安	既存検出法
	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター	プレートリーダー			
DAPGreen	○	○	○	$\lambda_{ex} = 425-475 \text{ nm}^*$ $\lambda_{em} = 500-560 \text{ nm}$	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	LC3-GFP MDC Cyto-ID など
DAPRed	○	×	×	$\lambda_{ex} = 500-560 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 690-750 \text{ nm}$	35 mm dish: 25 枚分 (0.1 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	LC3-GFP-RFP など
DALGreen	○	○	×	$\lambda_{ex} = 350-450 \text{ nm}^*$ $\lambda_{em} = 500-560 \text{ nm}$	35 mm dish: 10 枚分 (1.0 $\mu\text{mol/l}$ で使用時)	LC3-GFP-RFP など

*共焦点顕微鏡では 488 nm にて励起可能

■ **LC3との高い相関** **DAPGreen**

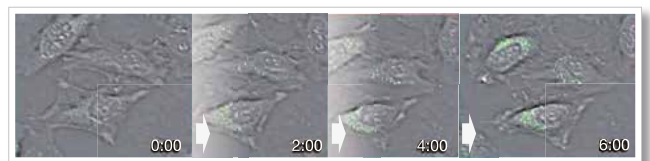
RFP-LC3 発現 HeLa 細胞に DAPGreen を添加後、Rapamycin によりオートファジーを誘導しました。その結果、DAPGreen と、LC3 が共局在する結果が得られました。



検出条件
 Ex = 488 nm, Em = 500-563 nm
 スケールバー: 10 μm

■ **タイムラプスで検出** **DALGreen**

DALGreen で染色後の HeLa 細胞をアミノ酸不含培地にて培養を開始し、6 時間までの細胞および蛍光像の変化を観察しました。その結果、オートファジーを誘導した細胞において、DALGreen の蛍光の増大が確認されました。



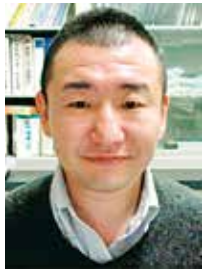
タイムラプス動画を小社 HP で公開中!

検出条件
 Ex = 405 nm, Em = 500-550 nm
 共焦点イメージングサイトメーター (横河電機株式会社: CQ1)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
DAPRed - Autophagy Detection	5 nmol	42,600	D677
DAPGreen - Autophagy Detection	5 nmol	43,800	D676
DALGreen - Autophagy Detection	20 nmol	34,100	D675

次世代の分子認識素子「核酸アプタマー」の開発と今後の展望

Development and future prospects of nucleic acid aptamers, next generation elements for molecular recognition



北村 裕介

熊本大学
大学院先端科学研究部
助教

Abstract

Overall, this review provides an introduction to nucleic acid aptamers for beginners interested in the fields of nucleic acid science and nucleic acid medicine. Although you can study the outlines for the selection and application of nucleic acid aptamers, for more further understanding, I recommend you to read other excellent reviews.

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより mRNA ワクチンがスポットライトを浴びたことをきっかけとし、核酸科学、核酸医薬に対する関心が急速に高まっている。本総説は、これらの研究分野に対して新しく興味を持った初学者に対して、次世代の分子認識素子ともいわれる核酸アプタマーを紹介する入門書のようなものである。ここでは核酸アプタマーの取得法、応用例のアウトラインを述べるが、さらに詳しい知識を身につけるためには、他の多くの優れた総説などをお読み頂きたい¹⁻⁴⁾。

2. 核酸アプタマーとは

かつての有名なチャールズ・ダーウィンは、生物の進化に関して、環境により適合した形質を有する個体が優位に子孫を増やしてきたという自然選択理論を提唱した。時を経て現代、同理論は、試験管内の分子群から任意の機能を有する分子を進化的に取得する戦略 (*in vitro* selection 法、もしくは試験管内分子進化法) の概念モデルとなっている。試験管内環境を一定の方向に変化させながら、適合する分子を淘汰的に選択するプロセスを繰り返すことで、分子群の中から特定の分子を見出す仕組みであり、基礎バイオ、臨床、創薬の領域で重宝される高機能性分子が次々と創出されている。

核酸アプタマーもまた、分子進化工学的に取得された分子認識素子である。一本鎖核酸 (DNA および RNA) がフォールディングし、高次構造 (ヘアピンループ、シュードノット、バルジ、グアニン四本鎖など) を形成することで、緻密な分子認識面を構築しており、標的 (タンパク質、ペプチド、糖、脂質、小分子、金属イオンなど) と水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用、 π - π スタッキングおよびファンデルワールス力を介して特異的に結合する。一般的に核酸アプタマーは、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment)⁵⁻⁷⁾ と呼ばれる手法を用い、ランダム配列領域を有するオリゴ核酸の大規模集団 (ライブラリー) の中から、標的分子に対する結合親和性に基づき選択取得される。従って得られたアプタマーは標的に対して非常に高い親和性を有する (一般的に解離定数は nM から pM の範囲)。メチル基一つの違い⁸⁾ や、アミノ酸の鏡像異性体⁹⁾ も容易に識別可能なことが知られており、高い結合特異性を有している分子認識素子とも言えよう。これらの特性からモノクローナル抗体と比較されることが多い。抗体の製造には、細胞中における発現系を利用した複雑なプロセスを必要とする。対照的に、核酸アプタマーは化学合成による単純なプロセスで製造可能であり、バッチ間の変動が少なく、HPLC を用いることで、高純度で精製することも可能である。また、蛍光色素や反応性基の導入、非天然構造との置換も容易であり、機能の付与、機能の向上が可能な「化学抗体」とも呼ばれている。一度変性してもアニーリングに

より容易に再生することは大きな利点であろう。また、サイズの抗体 (10-15 nm) より小さい (~ 3 nm) こともあり、抗体がアクセスできないような込み入ったサイトを標的化できると考えられている。結合したアプタマーは、生理的条件下にて相補鎖を添加するだけでマイルドに解離可能な点もユニークである。免疫原性が最小限であり、臨床応用への期待値も高い。DNA アプタマーと RNA アプタマー間で特に強調して差別化されることはないが、RNA の方が分解されやすい点を考慮すると、細胞外から作用させる際には DNA アプタマーが有利な場合もあるかもしれない。一方、RNA アプタマーの場合、アプタマー配列をコードした発現プラスミドをトランスフェクションすることで、細胞内にて RNA アプタマーを生産可能な点が大きな強みであろう。

3. SELEX 法の概要

SELEX 法の概略図を図 1 に示す。ライブラリー核酸を標的分子とインキュベートし、結合した核酸のみを分離回収する。続いてこれを PCR で指数関数的に増幅させることで次世代のライブラリー核酸を作成することができる。RNA アプタマー取得時には、標的に結合した RNA を用いて逆転写反応を行った後、PCR を実施することで次世代のライブラリー核酸を得ることができる。一般的な手法ではアプタマー取得までに、この一連のプロセスを 10 ~ 15 回繰り返す必要がある。以下にて留意点等を詳細に説明したい。

3.1 ライブラリー核酸の設計

良質なアプタマーが得られるかどうかは、ライブラリー核酸の設計時に決まってしまうと言っても過言ではない。通常、ライブラリー核酸はランダム配列領域の両端がそれぞれ定常配列領域 (プライマー結合領域) で挟まれた構造を有している。ランダム配列は核酸合成時に A、G、C、T/U のアミダイト試薬を混合し、合成することで得られる。ライブラリー核酸の多様性は、このランダム配列の長さに依存する。例えば、30 塩基長の場合、 4^{30} (約 10^{18}) 種類の配列が含まれることとなるが、実験上現実的な物質質量ではないため、 10^{15} 未満のスケールで実施されることが多い。

多様性の確保や複雑な分子認識面の担保のために、一様にランダム配列領域を長く設定すれば良いという話でもない。核酸合成時における 1 塩基のカップリング効率が約 99.5% の場合、全長 70 塩基長の核酸で合成収率が約 70%、100 塩基長の核酸で約 61% であり、長いアプタマーは製造コストにおける負担が大きくなる。抗体では標的化できない狭い空間を認識できるといふ長所も失われるかもしれない。また、ランダム配列領域が長くなる程プライマーが非特異的に同領域に結合するリスクを高めるため、結果として SELEX の失敗リスクを高めてしまう。一方、ラ

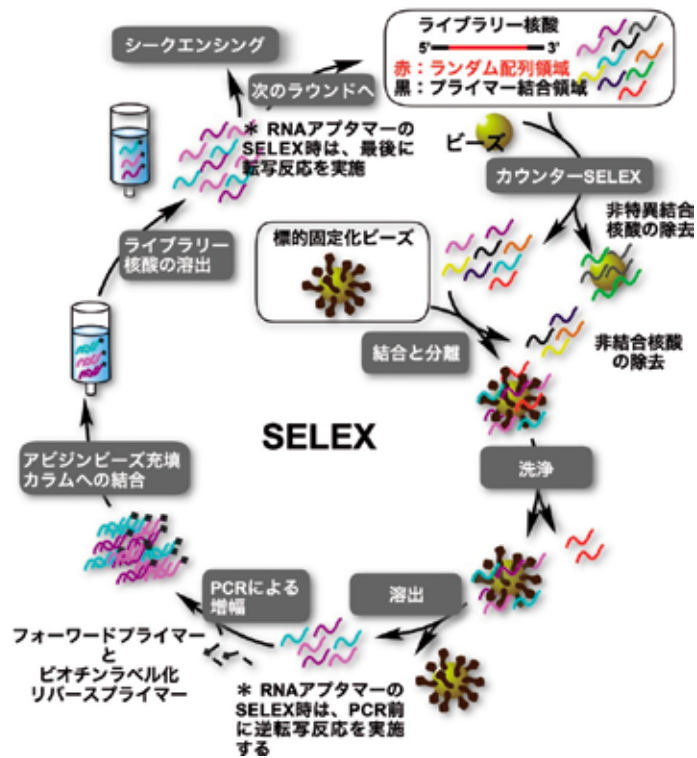


図1 SELEX法の概要図

ランダム配列領域を短くすれば良いという訳でもない。Szostakらは、高親和的に結合するアプタマーとは自身で安定な分子内構造を形成するアプタマーであると結論づけている¹⁰⁾。ランダム配列領域が短すぎる場合、安定な構造を形成するとすれば、シングルヘアピンループ構造、バルジ構造、グアニン四本鎖構造等に限定されてくるため、構造の多様性を失っている可能性が高い。ランダム配列領域の長さは自由に選択可能であるが、様々な事情を考慮して30塩基長から60塩基長程度に設定されているケースが最も多い印象である。

3.2 非結合核酸の分離除去

SELEXにおいて非常に重要な工程として挙げられるのが、非結合核酸の除去工程である。これが十分に除去されていないと、続く増幅過程にてライブラリー核酸中におけるアプタマー成分比を効果的に増加させることはできない(進化させることができない)。取得に要するSELEXのラウンド数(一連のプロセスの反復数)の増加に繋がるだけでなく、残存した非結合核酸によって、PCR増幅時にアプタマーの存在比を指数関数的に減少させ、最悪の場合、枯渇させてしまう恐れがある。手軽で最もポピュラーな非結合核酸の分離除去法は、標的を基体に固定化した状態でライブラリーの選択を実施した後、洗浄分離する方法であろう。標的がタンパク質であれば、タグ(HisタグやFcタグなど)を介して磁気ビーズやゲルビーズに固定化させる事例を見かけることが多い。メンブレンに物理吸着させている例もある。

ここで、いくつかの問題点や考慮点がある。洗浄時のデッドボリュームや基体への非特異吸着による非アプタマー核酸の残存もその一つである。標的の基体への最適な固定化密度も考慮される必要があるだろう。また、いわゆる「固定化タンパク結合性」アプタマーの取得が懸念されている。それらの解決法となるのがキャピラリー電気泳動法の利用である(CE-SELEX)¹¹⁻¹⁴⁾。泳動度の違いを利用し、非結合核酸、タンパク質、およびアプタマーとタンパク質の複合体を分離することが可能であるが、処理量が

少ないためライブラリー核酸の多様性が制限される。また、分離するためには、アプタマー、標的、およびそれらの複合体間で、十分なサイズと電荷の違いも必要であるため、小分子などを標的とするには困難な場合がある。近年では、これらの問題点を解決するMACE®-SELEX法と呼ばれる手法も開発されている¹⁵⁾。

3.3 カウンター SELEX

非標的を提示し、その結合成分を除去する操作はカウンターSELEX(もしくはネガティブセレクション)と呼ばれ、標的とライブラリーのインキュベーション前後のいずれかで実施される。固定化のために基体を用いる際には、その基体に対する結合成分を必ず除去しなければならない。また類似構造を有する非標的分子や結合競合が予想される非標的分子に対する結合を回避するために同操作は非常に効果的である。

3.4 次世代ライブラリー核酸の生成と淘汰圧の調整

標的に結合するライブラリー核酸を回収し、PCRにて増幅した後、ライブラリー核酸の相補鎖側は不要であるため除去する必要がある。ビオチンで標識された相補鎖(リバープライマーとして5'位ビオチン修飾物を用いれば、PCR産物中のライブラリー核酸の相補鎖は全てビオチンで標識される)を介し、PCR産物をストレプトアビジン修飾アガロースビーズ充填カラムにトラップした後、水酸化ナトリウム溶液を負荷することで二本鎖を変性させてライブラリー鎖のみを溶出し、最後に脱塩すれば、簡便迅速かつ高収率でライブラリー核酸を回収できる。

次のラウンドでは更なる進化を促すために選択時の淘汰圧を高める必要がある。一般的には標的濃度の減少や標的とのインキュベーション時間の短縮、洗浄強度や洗浄回数の増加、カウンターセレクションの追加などで達成される。当然、淘汰圧が厳しすぎると、アプタマー候補が絶滅してしまうが、弱すぎると進化が遅れるか進化に失敗するため、適度な塩梅が求められる。淘汰圧はラウンドを重ねるごとに徐々に強くしていくと良い。

3.5 配列解析と構造予測

最終的に得られたライブラリー核酸の配列は、(i) インサートとしてライブラリー配列が組み込まれたプラスミドベクターを大腸菌に形質転換し、クローニングした後、各コロニーの培養抽出液から回収したプラスミド DNA をサンガーシーケンシングする手法、もしくは (ii) 次世代シーケンサーにて網羅的に解析する手法によって解読される。後者に関しては、費用面での負担が大きいのが、候補配列の解読漏れを防止できる上、ラウンド毎に解析すれば、配列の進化の過程も詳細に追跡可能である。

配列の解読が終わった後は、存在割合から優位な配列の調査、配列のグループ化 (ファミリー化)、コンセンサス配列の調査が行われる。その後、NUPACK や Mfold などのツールを用い、アプタマーの高次構造が予測される。場合によっては、その予測構造から、不要と想定されるドメインの削除 (ダウンサイジング) を試みることがある。特に両末端のプライマー結合領域は、進化の過程で選ばれた配列ではなく、実験者が任意に設定した配列であるため、アプタマーの構造形成に関与していない場合もあり、その場合は無駄に分子サイズを大きくしているだけである。ダウンサイジング前後での結合挙動の変化を確認し、最適なアプタマー配列が決定される。プライマー結合領域がアプタマーのコア構造に極力含まれないように、プライマー結合領域とランダム配列領域の間にリンカーとして T の連続配列を配置する工夫が施されることもある¹⁶⁾。標的との結合構造はドッキングシミュレーションなどで推定することはあるが、正確な構造の予測は未だ困難である。低分子リガンドとの結合構造に関しては X 線結晶構造解析や NMR などが利用されてきたが、クライオ電子顕微鏡の登場により、タンパク質との結合構造解析も可能となってきた^{17, 18)}。

3.6 Cell-SELEX とハイブリッド SELEX

細胞を直接標的化し、SELEX を行うこともできる (Cell-SELEX)¹⁹⁾。その際、非標的細胞を用いたカウンター SELEX は必須となる。Cell-SELEX の特徴として、標的化したい細胞表面と区別化したい細胞 (非標的細胞) 表面に関する知見を十分に持ち合わせていない状況であっても、標的細胞に特異的に結合し得るアプタマーの取得が可能が挙げられる。得られたアプタマーと細胞表面の未知な結合対象とを化学連結した後、ブルダウンされた成分を解析することによって、後から結合対象を知ることが可能であり、未知のバイオマーカーの発見にも期待が寄せられている。

標的とすべき膜タンパクが明確に判っている場合であっても Cell-SELEX を介してアプタマーを取得した方が良い可能性もある。発現タンパクを対象とした SELEX の場合、細胞環境下における実際のタンパク質構造を正確に提示できる保証がないためである。例えば、膜タンパク質は多様な糖鎖修飾を受けることが知られているが、発現タンパクでその多様性や存在比が再現されているかは不明である。したがって、発現膜タンパクを用いた SELEX と同膜タンパクを高発現する細胞を用いた Cell-SELEX によって優先的に取得されてくるアプタマー配列が異なってもおかしくはない。

発現膜タンパクを用いた SELEX と同膜タンパクを発現する細胞を用いた Cell-SELEX を組み合わせる (ハイブリッド SELEX)^{20, 21)} ことで、細胞表面の任意の膜タンパクに結合するアプタマーを安定して取得できる。標的膜タンパク非発現細胞から安定発現株を樹立し、Cell-SELEX を行っても良いだろう。元の非発現細胞に対するカウンター SELEX との併用で目的のアプタマーが取得できる。

近年、生体中での SELEX も報告されている。修飾 RNA のライブラリーを腫瘍担持マウスに静脈注射し、腫瘍に局在するアプ

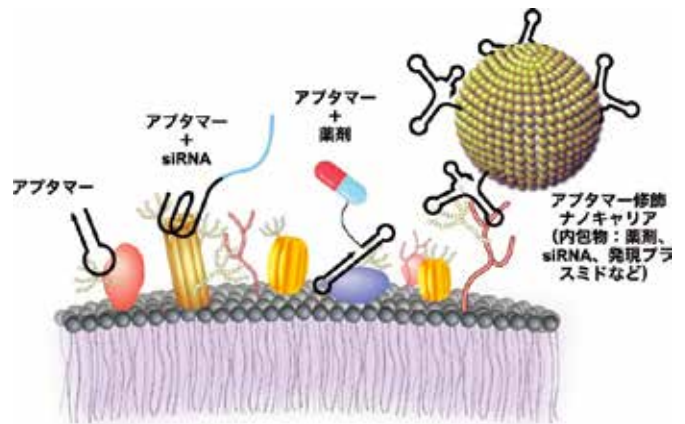


図2 核酸アプタマーを介した様々な薬剤の送達

タマーを抽出し増幅した結果、選択された 2 つのアプタマーが、腫瘍内で高発現しているバイオマーカー (P68) を標的としていることが判明し、注目を集めている²²⁾。

3.7 結合親和性の評価

得られたアプタマーの標的に対する解離定数 K_d や見かけの K_d は、ドットプロットアッセイ、直接 ELISA、フローサイトメトリー、等温滴定型カロリメトリー (ITC)、マイクロスケール熱泳動 (MTS) などの測定から算出できる。また、結合・解離の速度定数まで知りたい場合は、表面プラズモン共鳴 (SPR) を原理とする分子間相互作用解析を行うと良い。

4. 標的化のスペシャリスト

本項では 4.1. ドラッグデリバリー、4.2. 生体分子反応の制御、4.3. 分離・分析、などの分野における応用例を紹介したい。

4.1 細胞標的化モジュールとしてのアプタマー

がん細胞標的化モジュールとして、抗ヌクレオリンアプタマー (AS1411)²³⁾、抗 PTK7 アプタマー (Sgc8c)²⁴⁾、抗 SDF-1 アプタマー (NOX-A12)²⁵⁾、抗ビメンチンアプタマー (NAS-24)²⁶⁾、抗 PSMA アプタマー (A10)²⁷⁾、抗 CD44 アプタマー (Apt1)²⁸⁾、抗 EpCAM アプタマー (SYL3C)²⁹⁾、抗 PD-L1 アプタマー (aptPD-L1)³⁰⁾、抗 MUC-1 アプタマー³¹⁾、抗 EGFR アプタマー³²⁾、抗 HER2 アプタマー (E6 および E7)³³⁾ などが既に開発されている。図 2 に示すようにドラッグ (Dox などの薬剤小分子や siRNA など) もしくはドラッグキャリア (リポソームや 2 型アデノ随伴ウイルスなど) 表面にこれらのアプタマーを修飾することで、細胞・組織・臓器特異的な送達を試みられている。AS1411 に代表されるように一部のアプタマーは、細胞表面の標的タンパクとの結合をきっかけとして内在化することが知られており、高い関心を集めている⁴⁾。

4.2 生体分子反応を制御するアプタマー

生命活動の基盤となる複雑な生物学的プロセスは、生理活性物質とタンパク質間の相互作用、タンパク質-タンパク質間相互作用などによって緻密に制御されている。ペガプタニブナトリウム (Macugen®) は、FDA によって承認された最初の治療用アプタマーである。血管内皮増殖因子 VEGF₁₆₅ に結合することで Fit-1、KDR、NP-1 受容体への結合を阻害し、結果として血管新生の阻害と血管透過性の亢進を引き起こす³⁴⁾。CD28³⁵⁾、OX40³⁶⁾、4-1BB³⁷⁾、CD30³⁸⁾ などの免疫関連受容体に結合するアプタマーは、同受容体を遮断または活性化することによって、



図3 二価性アプタマーによる高機能化

アゴニスティックに免疫反応を調節できることがわかった。免疫チェックポイント阻害の機構に関与しているPD-L1に結合するアプタマーは、T細胞の腫瘍への浸潤度とIL-2、TNF- α 、IFN- γ などのサイトカインの分泌量を上昇させることがわかった³⁹⁾。また、Gタンパク質共役受容体の活性をアロステリックに制御するアプタマーも報告されている。E3リガーゼリガンドをアプタマーとコンジュゲーションすることでPROTACシステムを利用可能である⁴⁰⁾。近年、血管脳関門の障壁を突破する興味深いアプタマーも報告されている⁴¹⁾。

ここ最近のトレンドとして、図3に示すようにアプタマーの多価化戦略が目まぐるしく注目されている。トロンビンのエクソサイト1および2に結合する2つのアプタマー（それぞれTBA15およびTBA29）を連結することで、単独時より50倍程、抗凝固能が向上することがわかった⁴²⁾。SARS-CoV-2スパイクタンパク質を標的とする2つのアプタマー、MSA1TおよびMSA5Tを連結した結果、それぞれ単独時より約100倍および30倍高い結合親和性を示すことがわかった⁴³⁾。また、T細胞特異的なLD2011アプタマーと標的細胞を認識するアプタマーを連結して用いれば、T細胞による標的がん細胞の殺傷効果を促進できることが見出された⁴⁴⁾。二価性アプタマーによるサイトカイン受容体の二量化を介して受容体の活性制御も達成されている⁴⁵⁾。

4.3 分離・分析用ツールとしてのアプタマー

アプタマーを利用した分離・分析例は非常に多く、ここではエッセンスの紹介だけに留め、詳しくは他の総説^{46, 47)}などを参考にしたい。基本的に、化学修飾によりプローブ化したアプタマーが、標的との結合時（解離時）に起こす構造変化を利用して多くの事例が多い。その際、任意のシグナルアウトプットが可能であり、FRETシグナルや電気化学的シグナルを変化させたり、呈色させたり、アプタザイムを動作させたりとその選択肢は様々である。また、アプタマーを修飾したセンサーチップ等は、同様な抗体修飾品と比較すると一般的に変性に強い。仮に変性した場合でも、適切な条件でアニーリングすれば活性な構造が再生することは特筆すべき点であろう。

筆者もまた、アプタマーを用いたがん患者の血中からの腫瘍細胞の選択的捕捉（図4）⁴⁸⁾、均一系におけるATPの選択的センシング⁴⁹⁾、ELONA法もしくはリアルタイムPCR法を用いた体液検査法⁵⁰⁾に関する報告を行っており、参考として紹介したい。

生体分子の細胞内における機能を正確に知るためには、生細胞におけるイメージング技術が必要であり、それを目的としたアプタマーの開発も進んでいる。なかでも緑色蛍光タンパク質GFPの発色団である3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン（DFHBI）類似体である非蛍光性分子に対する

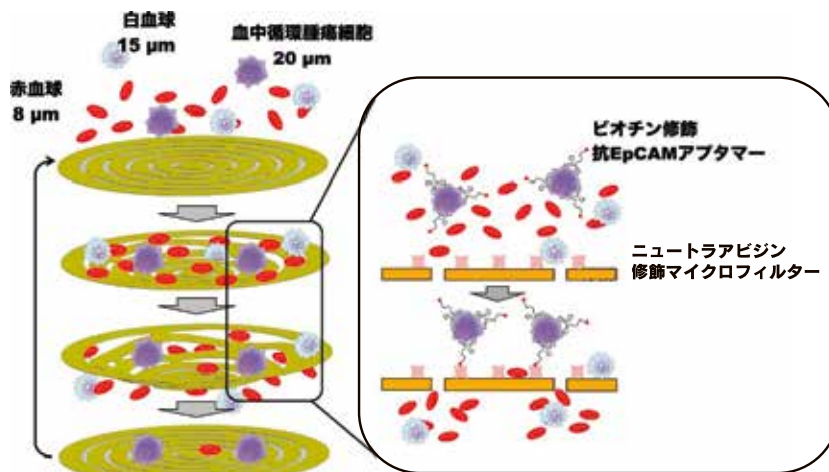


図4 抗EpCAMアプタマーを用いた血中循環腫瘍細胞の選択的捕捉

RNA アプタマーが最も有名である。同分子は単独では発光を与えないが、アプタマーと結合すると蛍光を発する^{51, 52)}。現在は、熱安定性や光安定性が向上した派生種⁵³⁻⁵⁵⁾や消光剤 BHQ⁵⁶⁾に対するアプタマーも出現しており、その質や種類も充実してきている。これらの蛍光性 RNA アプタマーはタグとして標的 RNA に連結付与することで、標的 RNA の細胞内における局在や輸送のダイナミクスの検証に利用することができる。また、標的分子に対する RNA アプタマーと連結して用いれば、RNA 以外の分子に対するイメージングにも応用可能である。これらの蛍光性アプタマーラベル化 RNA は *in vitro* で発現させた後、トランスフェクションすることもできるが、発現プラスミドとして細胞内に導入しておけば、*in situ* で発現させることもできる。

アプタマーの分子認識機構とトランス切断活性を有する CRISPR-Cas を利用したバイオセンシングシステム⁵⁷⁾との組み合わせも盛んに検討されてきており、バイオ分析分野におけるアプタマーの重要性は今後一層高まっていくものと予想される。

5. おわりに

核酸科学における様々な技術的進歩、知見の集積、および新たな SELEX 法の開発等により、実験工程が合理化され、新たな参入者への障壁も低くなった。その結果、1990 年ではわずか 20 件程度であった核酸アプタマーに関する文献数は、30 年後の 2020 年には 14,000 件を超える数となっている。市場調査の結果 (www.marketdataforecast.com) によると、世界のアプタマー市場の規模は、年平均成長率 23.5% で、2023 年に 2 億 8,260 万米ドル、2028 年までに 6 億 1,070 万米ドルに達すると推定されている⁵⁸⁾。アプタマーを利用した多くの分析法や治療法において、基礎研究、概念実証、臨床評価のステージからの脱却と医療現場での活用ステージへの飛躍が強く期待されていることであろう。

一方で、その実現には解決すべき課題もいくつか残っている。一つは、核酸の分解に関するものである。やはり、核酸は生体環境下ではヌクレアーゼによって容易に分解されてしまう。RNA に至っては、糖鎖 2' 位の OH 基の存在によって化学的にも DNA より不安定である。そこで、2' 位の OH 基から非天然構造である OMe 基や F 基への置換が検討されている。また、40 kDa の PEG を末端に導入することで、エキソヌクレアーゼから受ける分解の影響を低減でき、半減期が大きく伸びることもわかった⁵⁹⁾ (因みに Macugen[®] の 5' 末端は 40 kDa の PEG で、3' 末端は inverted dT で修飾されている)。天然構造の核酸から取得されたアプタマーを、後から非天然構造に置換しようとする、場合によっては結合活性を失ってしまう可能性があるだけでなく、強い免疫応答を誘起する可能性もあり、試行錯誤が続いている。もう一つの課題点は、エンドソームからの脱出効率があまり高くない点にある。これに関しては、脱出効率を改善する分子の修飾が検討されている⁶⁰⁾。以上の問題点・課題点は、アプタマー固有のものという訳ではなく、核酸医薬品全般に渡っての共通問題である。時勢もあり、核酸や核酸医薬品の研究開発に大きな注目が集まる世界的潮流の中、これらの共通問題も加速的に解決に向かっていくものと考えている。将来的には、名実と共に次世代の分子認識素子としてアプタマーが広く利用される時代の到来を期待するところである。

[参考文献]

- 1) C. Ji et al., *Chem. Rev.*, **2023**, 123, 12471-12506.
- 2) S. Xie et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145, 7677-7691.
- 3) A. D. Keefe et al., *Nat. Rev.*, **2010**, 9, 537-550.
- 4) S. Yoon et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, 22-35.
- 5) D. L. Robertson et al., *Nature*, **1990**, 344, 467-468.
- 6) G. Tuerk et al., *Science*, **1990**, 249, 505-510.

- 7) R. Green et al., *Nature*, **1990**, 347, 406-408.
- 8) R. D. Jenison et al., *Science*, **1994**, 263, 1425-1429.
- 9) A. Geiger et al., *Nucl. Acids Res.*, **1996**, 24, 1029-1036.
- 10) J. M. Carothers, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 7929-7937.
- 11) M. Berezovski et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13674-13675.
- 12) S. D. Mendonsa et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 126, 20-21.
- 13) Y. Kasahara et al., *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 4961-4967.
- 14) S. Saito, *Anal. Sci.*, **2021**, 37, 17-26.
- 15) K. Wakui et al., *Mol. Ther.-Nucleic Acids*, **2019**, 16, 348-359.
- 16) N. Savory et al., *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 26, 1386-1391.
- 17) E. L. Cheng et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, 144, 13851-13864.
- 18) N. Kacherovsky et al., *Angw. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, 21211-21215.
- 19) K. Sefah et al., *Nat. Protoc.*, **2010**, 5, 1169-1185.
- 20) B. J. Hicke et al., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 48644-48654.
- 21) S. E. Wilner et al., *Mol. Ther.-Nucleic Acids*, **2012**, 1, e21.
- 22) J. Mi et al., *Nature Chem. Biol.*, **2010**, 6, 22-24.
- 23) P. J. Bates et al., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 26369-26377.
- 24) D. Shangguan et al., *J. Proteome Res.*, **2008**, 7, 2133-2139.
- 25) S. G. Sayyed et al., *Diabetologia*, **2009**, 52, 2445-2454.
- 26) T. N. Zmay et al., *Nucleic Acid Ther.*, **2014**, 24, 160-170.
- 27) S. E. Lupold et al., *Cancer Res.*, **2002**, 62, 4029-4033.
- 28) N. Ababneh et al., *Nucleic Acid Ther.*, **2013**, 23, 401-407.
- 29) Y. Song et al., *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 4141-4149.
- 30) W.-Y. Lai et al., *Mol. Ther.-Nucleic Acids*, **2016**, 5, e397.
- 31) C. S. M. Ferreira et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390, 1039-1050.
- 32) N. Li et al., *PLoS One*, **2011**, 6, e20299.
- 33) G. Mahlkecht et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2013**, 110, 8170-8175.
- 34) J. Ruckman et al., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 20556-20567.
- 35) F. Pastor et al., *Mol. Ther.-Nucleic Acids*, **2013**, 2, e98.
- 36) C. M. Dollins et al., *Chem. Biol.*, **2008**, 15, 675-682.
- 37) J. O. McNamara II et al., *J. Clin. Invest.*, **2008**, 118, 376-386.
- 38) P. Zhang et al., *Lab. Invest.*, **2009**, 89, 1423-1432.
- 39) L. Tian et al., *Sci. China Chem.*, **2022**, 65, 574-583.
- 40) L. Zhang et al., *Mol. Ther.-Nucleic Acids*, **2022**, 30, 66-79.
- 41) J. Macdonald et al., *ACS Chem. Neurosci.*, **2017**, 8, 777-784.
- 42) Y.-C. Shiang et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 7660-7665.
- 43) Z. Zhang et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, 24266-24274.
- 44) Y. Yang et al., *ACS Nano*, **2020**, 14, 9562-9571.
- 45) M. Akiyama et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, 22745-22752.
- 46) J. Liu et al., *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 1948-1998.
- 47) L. F. Yang et al., *Chem. Sci.*, **2023**, 14, 4961-4978.
- 48) S. Fukuyama et al., *Talanta*, **2021**, 228, 122239.
- 49) Y. Kitamura et al., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 285-287.
- 50) T. Satoh et al., *Anal. Methods*, **2020**, 12, 2703-2709.
- 51) J. S. Paige et al., *Science*, **2011**, 333, 642-646.
- 52) G. S. Filonov et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 16299-16308.
- 53) E. V. Dolgosheina et al., *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 2412-2420.
- 54) W. Song et al., *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, 13, 1187-1194.
- 55) A. Autour et al., *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 656.
- 56) S. Sato et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 1855-1858.
- 57) U. S. Kadam et al., *Appl. Biol. Chem.*, **2023**, 66, 13.
- 58) N. J. Singhai et al., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2023**, 87, 104880.
- 59) P. E. Burmeister et al., *Chem. Biol.*, **2005**, 12, 25-33.
- 60) S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.*, **2017**, 35, 222-229.

[著者プロフィール]

氏名：北村 裕介 (Yusuke Kitamura)

所属：熊本大学大学院先端科学研究部

〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2-39-1

TEL 096-342-3872

E-mail: ykita@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：熊本大学

学位：博士 (工学)

専門分野：核酸科学、分析化学

現在の研究テーマ：核酸を基体としたバイオセンサーの開発

連載

生命科学の最前線

～熊本大学若手研究者の現場から～ ④

小社が立地する熊本県の生命科学研究最前線を、熊本大学の若手研究者が連載（8回）でお届けします。

生命が体内エネルギーの恒常性を維持する脳内メカニズム

Brain mechanisms to maintain energy homeostasis



戸田 知得

熊本大学大学院
生命科学研究部
中枢性代謝制御学講座
特任助教

Abstract

After sensing the systemic energy information, the hypothalamus regulates appetite and metabolism in peripheral tissues to maintain homeostasis of body weight and blood glucose levels. Hormones such as leptin secreted by peripheral tissues and blood nutrient concentrations activate or inhibit various neurons in the hypothalamus, allowing energy sensing by the brain. Glucose-sensing neurons are the neurons whose electrical activity is altered by changes in glucose concentration. There are two types: glucose-excited and glucose-inhibited neurons. We have elucidated the molecular mechanisms necessary for regulating leptin signaling and glucose sensing in the hypothalamus. We started our laboratory, named the Department of Neuroscience for Metabolic Control in the Faculty of Life Science, Kumamoto University, in December 2022. We would like to continue to elucidate the brain mechanism of energy sensing. At the same time, we are interested in the mechanisms by which memory and prediction alter systemic metabolism.

1. はじめに

多くの方が経験するように、お腹が空きすぎるとご飯のことがかり考えて仕事にならない。また、風邪などで長期間食べることができなかつたときには体調が回復してからも身体が思うように動かない。これは体内エネルギーが不足していて、栄養摂取に対する願望が増えることと、筋肉などの代謝および機能が低下していることが原因の1つである。自然界では身体が動かないと外敵から逃げたり反撃することができない。したがって、体内に十分なエネルギーをためて維持していることが生命の維持に必須であり、日々、元気澆刺と生活するためにも必要である。

脳は体内エネルギーの蓄積量を、末梢ホルモンや上行性神経などの情報によってモニターしている。体内エネルギーが不足してくると食欲を上げ、代謝を低下させてエネルギー不足から回復させる。そして食事のチャンスが来るまで待てる体内環境を作り出す。古くから糖質、脂質、アミノ酸が全身エネルギーの恒常性維持のトリガーとなると考えられ、それぞれ glucostatic、lipostatic、aminostatic theory と呼ばれた。実際に、食事の中のこれらの栄養成分を減らすとその成分を十分量摂取できるまで食べて過食になる¹⁾。

2. 脳による体内エネルギーのセンシングと代謝調節

このような代謝研究の中でレプチンの発見は研究分野の大きな発展につながった。脂肪細胞から分泌されるレプチンは体重調節

に必須の役割を果たす。そのためレプチン欠損マウスは過食とエネルギー消費の低下によって重度の肥満になる。その後、視床下部の pro-opiomelanocortin (POMC)、Neuropeptide Y (NPY)、Agouti-related protein (AgRP)、Melanocortin receptor 4 (MC4R) などについて様々な遺伝子欠損マウスが作られて、レプチンを含めた多くの末梢ホルモンが視床下部の POMC、NPY/AgRP 神経に作用し、POMC は食欲抑制、NPY/AgRP 神経は食欲亢進を起こすこと、POMC の神経終末から α -MSH、NPY/AgRP 神経から NPY/AgRP が放出され、室傍核のメラノコルチン 4 受容体を介して体重調節を起こすことが明らかにされてきた (図 1)²⁾。詳しくは実験医学などの総説にまとめてあるのでそちらを読んでいただきたい^{3, 4)}。これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠損および多型が肥満や糖尿病に関わっており、遺伝子欠損の場合は組み換えタンパク質やメラノコルチン受容体アゴニストを投与することで重度肥満症を改善することができる⁵⁾。

逆に脂肪組織で脂肪滴を形成するタンパク質の異常などでおこる脂肪萎縮症では、やせているにもかかわらず糖尿病になる。脂肪萎縮症では脂肪組織が形成されないことでレプチン生成も無くなる。この患者さんにレプチンの組み換えタンパク質を投与することで糖尿病が改善することから、人においてもレプチンが糖代謝に重要であることが分かっている⁶⁾。私もレプチンが血糖値を変える脳内メカニズムを研究しており、その脳内メカニズムの一部を解明した^{7, 8)}。簡単にまとめると、視床下部の中でも腹内側核のレプチン受容体が全身糖代謝を増加させるレプチンの効果に最も重要な部位であり、腹内側核の中に骨格筋と肝臓のインスリ

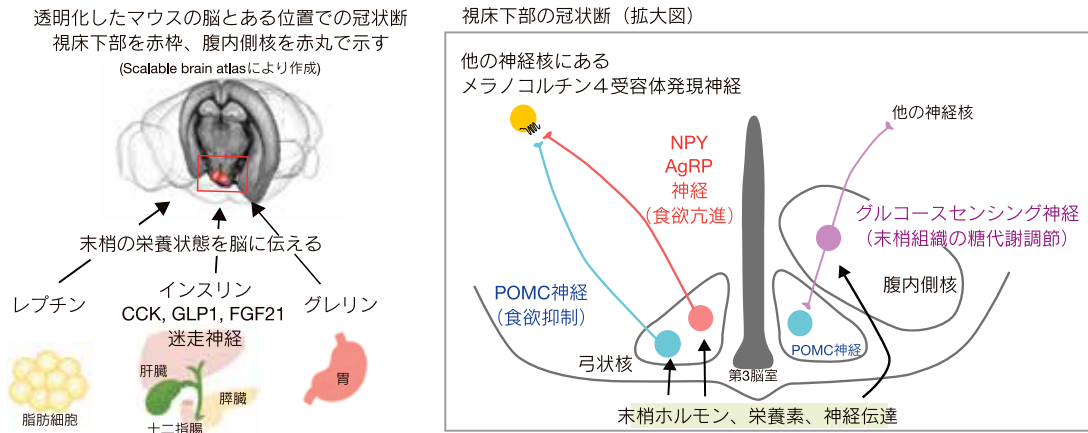


図1 末梢からの情報（レプチン、インスリン、コレシストキニン、GLP1、FGF21、迷走神経、グレリンなど）が視床下部の神経細胞の活動を变化させて食欲および末梢組織の代謝を調節する。

視床下部には弓状核や腹内側核と呼ばれる神経核があり、POMC 神経、NPY/AgRP 神経、グルコースセンシング神経などが全身エネルギー代謝の調節に重要である。我々は腹内側核の神経細胞がグルコースセンシングおよびレプチンの末梢組織での糖代謝亢進作用に重要であること報告した。

ン感受性を調節する別々の神経細胞および細胞内シグナル伝達機構があること、そして腹内側核の神経が活性化した後、弓状核の POMC 神経およびそのさらに下流の MC4R を介して末梢組織の糖代謝を調節することを明らかにした (図 1)。

3. グルコースセンシング神経の発見は九州から

グルコースは脳の主なエネルギー基質であり、極度の低血糖になると意識がなくなり、血糖値を回復させないと死亡する。逆に高血糖が持続すると血管障害が起こり、網膜、腎臓、脳などで糖尿病合併症が起こる。したがって、脳は常に血糖値の変化をモニターしており、低血糖になった場合は食欲の増加および肝臓などからの糖産生を増加させ血糖値を回復させる。高血糖でも食欲低下および骨格筋や肝臓のインスリン感受性増加によって正常の血糖値に戻す。脳にはグルコースセンシング神経があり、これらの調節を行っている。グルコースセンシング神経にはグルコース興奮性神経とグルコース抑制性神経の 2 種類がある。グルコース興奮性神経は高血糖時、グルコース抑制性神経は低血糖時に活性化して、血糖値の増加または低下から正常値に戻そうと働く。グルコース興奮性神経は 1969 年に大村裕先生 (九州大学) が Nature 誌に発表した⁹⁾。余談であるが大村先生は 90 歳を超えた今でも肥満学会などで一般演題の口頭発表を続けておられ、私は勝手に人生の師匠として尊敬、目標、憧れなどの感情を持っている。グルコース濃度が低下するとグルコース抑制性神経内で AMP/ATP 比が増加し、AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化する。AMPK は NO および Cl⁻ チャンネルを介して神経細胞を脱分極する。グルコース興奮性神経ではグルコース濃度の増加が細胞内 ATP 濃度を増加し、ATP 依存性カリウムチャンネル (K_{ATP} チャンネル) を閉じて脱分極させる (図 2A)⁴⁾。

4. ミトコンドリア分裂がグルコースセンシング神経の活性化に必須

私が Yale 大学に留学した時に与えられたテーマは視床下部腹内側核のミトコンドリア脱共役タンパク質 2 (UCP2) 欠損マウスの解析だった。このマウスは体重、食事量、熱産生などは野生型と変わらなかったが、糖代謝が悪化していた。特にグルコースを投与したときに高血糖が続ぎ、視床下部の神経活動も高血糖時に活性化しなかった。そこからグルコース興奮性神経の調節に UCP2 が関わっている可能性を調べ、UCP2 がグルコース興奮性

神経の中で活性酸素およびミトコンドリアの分裂に必須であり、ミトコンドリアのサイズが小さくなるのが高血糖のセンシングに必要であることを発見した (図 2A)¹⁰⁾。その際、K_{ATP} チャンネルを介した神経活動の増加であったことから、ミトコンドリアが小さくなると細胞内 ATP が増加すると考えられるが、他の細胞では小さいミトコンドリアは ATP 産生能力が低く、むしろ古くなったミトコンドリアの一部を切り離してオートファジー (マイトファジー) によって分解させるために小さくすると報告されているため、詳細は未だに不明である¹¹⁾。

5. 脳内プロスタグランジン生成が視床下部のグルコースセンシングには重要

帰国して学部時代の出身ラボである北海道大学獣医学部生化学教室の助教になった。北大の他学部にて生理学研究所時代のソフトボール大会で同じチームだった早坂孝宏さんがいることを知り (ただし私の趣味は剣道です。先日、左ふくらはぎの肉離れを起こし、42 才はもう若くないことを実感しました。)、挨拶に行くといメージング質量分析機で組織内の分子の分布を測定していた。当時は視床下部の研究でこの技術を誰も使っておらず、これは新しい発見につながると思いイメージング質量分析を視床下部のグルコースセンシング研究に利用した。

マウス腹腔内にグルコースを投与すると、視床下部でアラキドン酸を含むリン脂質が減少してプロスタグランジンが増加した。これは、高血糖時に視床下部の細胞膜リン脂質からアラキドン酸が遊離して代謝されていることを示唆する。実際にグルコースを投与すると視床下部でプロスタグランジン生成が増加していた。アラキドン酸の遊離は、細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) によって調節されている。通常食を与えたマウスの腹内側核で cPLA2 の発現をノックダウンしたところ、筋肉のインスリン感受性が低下した。この時、腹内側核でグルコース投与によって増加する神経活動が、cPLA2 ノックダウンマウスで抑制された¹²⁾。つまり、高血糖が cPLA2 を介したプロスタグランジン生成によって腹内側核の神経活動を増加して、骨格筋のインスリン感受性を亢進させると考えられる (図 2B)。

一方、高脂肪食により肥満したマウスでは、腹内側核の cPLA2 ノックダウンにより耐糖能異常が改善した¹²⁾。高脂肪食飼育マウスでは常に cPLA2 が活性化されてプロスタグランジンを産生し、視床下部の炎症が肝臓のインスリン感受性が低下させ

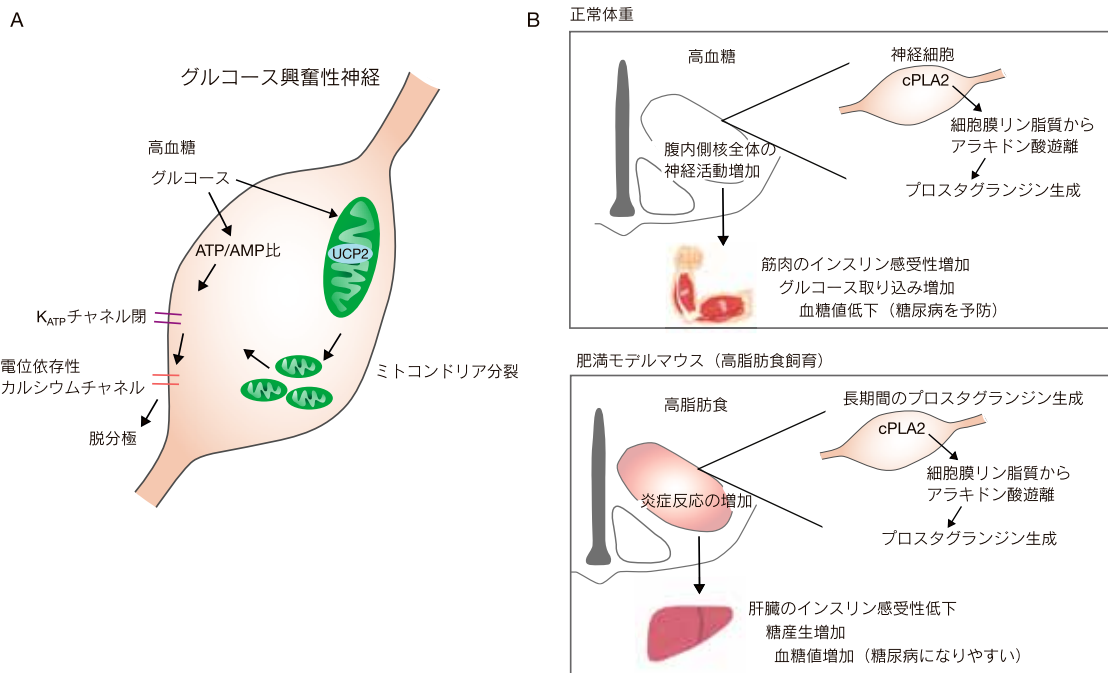


図2 我々の研究成果

- A. 腹内側核のグルコース興奮性神経において、高血糖時にミトコンドリア内膜にある脱共役タンパク質2（UCP2）の作用によりミトコンドリアが分裂し神経活動の増加に必須に役割を果たす。
- B. 腹内側核では高血糖時に cytosolic Phospholipase A2（cPLA2）がプロスタグランジン生成を増加させ、腹内側核全体の神経活動亢進および骨格筋の糖代謝増加によって血糖値を低下させる。しかし、肥満モデルマウスでは長期間のプロスタグランジン生成によって視床下部でミクログリアの活性化などの炎症反応が増加し、肝臓に作用して血糖値を増加させる。

てグルコース恒常性を破綻させていると考えられた（図2B）。つまり、視床下部の cPLA2 を起点とするリン脂質代謝は、やせ型では生理的な血糖値調節に機能しており、肥満では糖尿病を悪化させる、という異なる結果となっていた。

6. 今後の展開

このように、長期間のエネルギー状態（脂肪組織の重量）を反映するレプチンや食後に上昇する血糖値等が視床下部に作用して血糖値を下げる方向に動くネガティブフィードバック機構として存在する。しかし実は食事を見た瞬間に、これまでの経験から食べ物にどれぐらいのエネルギー量が含まれているかを予測して、食べ物が胃の中に入る前に消化、吸収そして代謝されやすいように体が準備し始める（図3）。例えば、夜中に美味しいような食事の映像がテレビに流れると、お腹が空いて唾液が出るような現象である。これは頭相反応と呼ばれ、パブロフの犬の条件付けのようによく知られた応答であるが、その脳内メカニズムは十分にわかっていない。我々はグルコースセンシングを主な研究対象としているが、頭相反応のように記憶による代謝調節がどのような神

経回路で行われているかについて非常に興味を持っており、現在研究を進めている。また、グルコースセンシングに関わる細胞内シグナル分子では ATP が重要であるが、視床下部で ATP や解糖系の中間代謝物を測定するためには Focused Microwave によってマウスの脳をミリ秒単位で熱処理する必要がある。熊本大学の動物施設には Focused Microwave があり、質量分析の共通機器もそろっている。高血糖、低血糖、肥満などの状態で視床下部の中でグルコースがどのように代謝されてグルコースセンシングにつながり、その悪化が糖尿病に関わるかを明らかにしたい。

7. おわりに

九州において発見されたグルコースセンシング神経ではあるが、最近ではこれを研究する日本人が少なくなり、退官された先生方からもっとグルコースセンシング神経を研究しなさいと言われる。幸運にも熊本大学において自分の研究室を立ち上げることができて運命的なものを感じている。研究室の名前も中枢代謝制御学講座にした。これからもグルコースセンシングについて研究を進めるとともに、これまで脳内メカニズムについて全く研究



図3 今後の研究目標

食事を見ただけでお腹が空いて糖代謝も良くなる（頭相反応）。これは食べたことがあり、美味しかったことを思い出さないと起こらない。しかし、記憶を含めた脳内メカニズムは全く不明であり、今後の研究で明らかにしていきたい。また、グルコースセンシングについての研究も行い、九州で生まれたグルコースセンシング神経を発展させたい。これまでは視床下部を中心に研究してきたが、脳全体に視野を広げ、全身代謝を調節する脳内メカニズムの全体像を理解したい。

が進んでいない頭相反応についても研究を進め、熊本からグルコースセンシングのような大きな発見をしたい。はじめにお腹が空くと仕事ができないと書いたが、軽い空腹感はむしろ集中力を上げると私は思う。また、糖尿病の患者さんが低血糖になった時に血糖値の低下を感じることは意外と難しく、グルコースセンシング神経では説明できない。このように脳と血糖値の研究にはまだ未解明な研究領域が多く残されており、今後どのような研究成果が出て来るか楽しみな分野である。この研究分野の発展に貢献していきたい。

[参考文献]

- 1) M. López, S. Tovar, M. J. Vázquez, L. M. Williams and C. Diéguez, "Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake", *Proc. Nutr. Soc.*, **2007**, 66, 131-155.
- 2) C. Toda, A. Santoro, J. D. Kim and S. Diano, "POMC Neurons: From Birth to Death", *Annu. Rev. Physiol.*, **2017**, 79, 209-236.
- 3) 岡勇輝, "個体生存に不可欠な本能行動のサイエンス", 実験医学, **2022**, 40.
- 4) 箕越靖彦, 近藤邦生, 中島健一朗, "神経が司る代謝・炎症制御と生体恒常性 臓器ネットワークを理解し、疾患予防・治療へ繋ぐ", 実験医学増刊, **2023**, 41.
- 5) Y. Yang and Y. Xu, "The central melanocortin system and human obesity", *J. Mol. Cell Biol.*, **2020**, 12, 785-797.
- 6) D. Araújo-Vilar and F. Santini, "Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach", *J. Endocrinol. Invest.*, **2019**, 42, 61-73.
- 7) C. Toda et al., "Extracellular Signal-Regulated Kinase in the Ventromedial Hypothalamus Mediates Leptin-Induced Glucose Uptake in Red-Type Skeletal Muscle", *Diabetes*, **2013**, 62, 2295-2307.
- 8) C. Toda et al., "Distinct Effects of Leptin and a Melanocortin Receptor Agonist Injected Into Medial Hypothalamic Nuclei on Glucose Uptake in Peripheral Tissues", *Diabetes*, **2009**, 58, 2757-2765.
- 9) Y. Oomura, T. Ono, H. Ooyama and M. J. Wayner, "Glucose and Osmosensitive Neurons of the Rat Hypothalamus", *Nature*, **1969**, 222, 282-284.
- 10) C. Toda et al., "UCP2 Regulates Mitochondrial Fission and Ventromedial Nucleus Control of Glucose Responsiveness", *Cell*, **2016**, 164, 872-883.
- 11) R. Sabouny and T. E. Shutt, "Reciprocal Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion", *Trends Biochem. Sci.*, **2020**, 45, 564-577.
- 12) M.-L. Lee et al., "Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism", *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 2330.

[著者プロフィール]

氏名：戸田 知得 (Chitoku Toda)

所属：熊本大学大学院生命科学研究部 中枢性代謝制御学講座

〒860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1

基礎医学研究棟 8階西側

X (旧ツイッター) @kuma_neurometab

ホームページ：https://chitokutoda2.wixsite.com/kumadai-teamtoda

TEL 096-373-5082

E-mail：toda-c@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：北海道大学獣医学部

学位：博士(学術) @ 総合研究大学院大学・生理学研究所

専門分野：代謝学、神経科学、生理学

現在の研究テーマ：脳によるエネルギーセンシングと全身代謝調節機構の解明

製品名称変更のご案内

2024年6月より、下記の製品に関しまして製品の名称とメーカーコードの変更をお知らせいたします。

製品仕様や品質に関わる変更はございません。

今後とも引き続き小社製品をご愛顧賜りますようお願い申し上げます。

変更前

メーカーコード	MT14
製品名	mtSOX Deep Red - Mitochondrial Superoxide Detection
容量	100 nmol

変更後

メーカーコード	MT16
製品名	MitoBright ROS Deep Red- Mitochondrial Superoxide Detection
容量	100 nmol

財団法人設立のお知らせ

この度、小社では若手研究者の研究開発を支援する一般財団法人「同仁化学学術振興財団」を設立いたしました。ライフサイエンスや有機化学分野の科学技術分野で活躍する若手研究者に対して研究開発の助成事業を開始します。財団の概要ならびに事業詳細につきましては、下記財団のページで適時ご案内をいたします。

同仁化学学術振興財団ホームページ

https://www.dojindo-f.or.jp

学会展示のご案内

第48回日本鉄バイオサイエンス学会

会期：2024年8月30日(金)～31日(土)

会場：京都大学医学部 芝蘭会館

●ランチョンセミナー

演題：「鉄研究に貢献する蛍光プローブの開発・応用」

演者：平山 祐先生 (岐阜薬科大学 准教授)

座長：豊國 伸哉先生 (名古屋大学 教授)

製品紹介：小社担当者

ランチョンセミナー及び展示ブース出展小社技術部門のポスター発表がございます。

展示ブースにて小社担当者がお待ちしております。

ぜひお立ち寄りください。

解糖系 / ミトコンドリア膜電位測定キット

Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit

<特長>

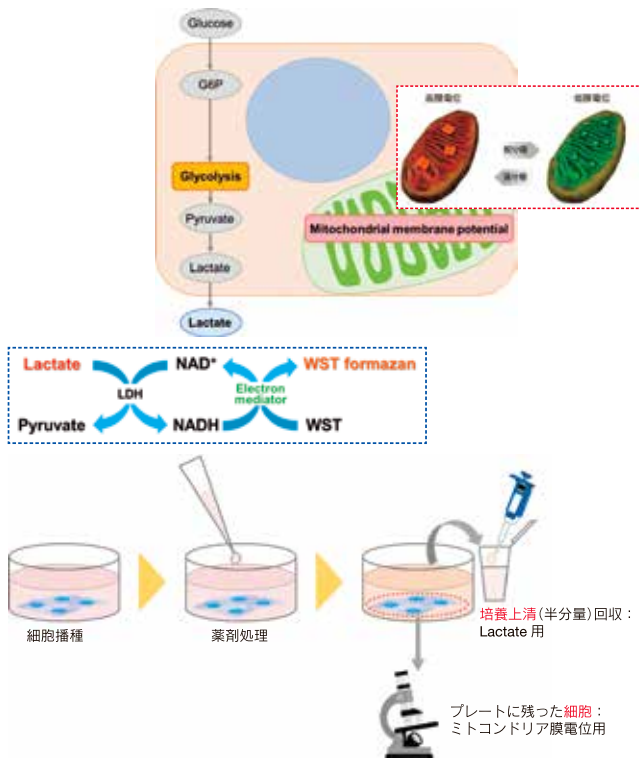
- ・誰でも簡単に実験ができるプロトコルを同梱
- ・実験に必要な試薬が全て同梱されたオールインワンのキット
- ・キット1つで2つの指標（乳酸産生量とミトコンドリア膜電位）を評価可能

解糖系は細胞の主要な代謝経路の1つであり、その代謝産物である乳酸は解糖系の機能をモニタリングするための指標として利用されています。また、ミトコンドリアは細胞が生きていくためのエネルギーを産生する重要なオルガネラであり、ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア機能の指標の1つとしてよく用いられています。ミトコンドリア機能が低下した老化細胞では解糖系を亢進させることや、解糖系に強く依存するがん細胞においては、解糖系が抑制されてもミトコンドリア機能を活性化することで生存を維持することが報告されています。このように、解糖系とミトコンドリアの機能を併せて見ることは、老化やがんなどの様々な疾患における治療戦略の開発に繋がることが期待されています。

Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit は、乳酸産生量の測定（Lactate Assay）とミトコンドリア膜電位の測定（JC-1 Assay）ができるキットです。本キットには、これらの評価に必要な試薬が全て同梱されています。

<原理>

本製品では、細胞外へ排出された乳酸量を WST ホルマザンを用いた吸光度法で測定し、ミトコンドリア膜電位を低分子蛍光色素 JC-1 を用いて蛍光法で測定します。



- ① ティッシュまたはマイクロプレートに細胞を準備する
- ② 必要に応じて薬剤刺激を行う
- ③ 細胞培養上清を半分量回収する
- ④ ③のサンプルを用いて Lactate Assay を行う
- ⑤ ティッシュまたはマイクロプレートに残った細胞を用いて JC-1 Assay を行う

<キット内容>

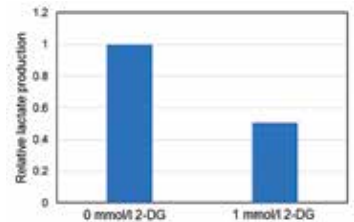
Dye Mixture	Lactate Assay 用
Lactate Standard (10 mmol/l)	
LDH Solution	
Lactate Assay Buffer	
Reconstitution Buffer	
JC-1 Dye	JC-1 Assay 用
Imaging Buffer (10 ×)	

<実験例>

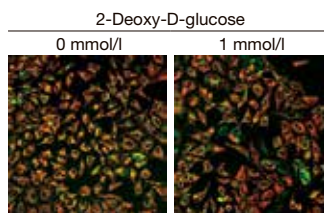
2-Deoxy-D-glucose 処理した細胞を用いた評価

2-Deoxy-D-glucose (2-DG) で処理した HeLa 細胞の乳酸産生量およびミトコンドリア膜電位を測定しました。結果、2-DG 処理により HeLa 細胞の乳酸産生量は減少し解糖系が阻害された一方で、ミトコンドリア膜電位の上昇が確認されました。

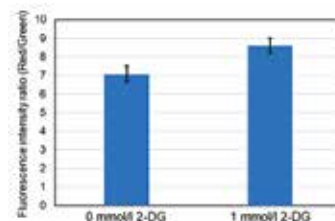
乳酸産生量の変化測定：
プレートリーダー 450 nm



ミトコンドリア膜電位の変化：



共焦点レーザー蛍光顕微鏡
(緑)
Ex = 488 nm, Em = 500-550 nm
(赤)
Ex = 561 nm, Em = 560-600 nm



プレートリーダー
(緑)
Ex = 485 nm, Em = 535 nm
(赤)
Ex = 535 nm, Em = 595 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Glycolysis/JC-1 MitoMP Assay Kit	50 test	51,400	G272

脂肪酸分析のご案内ー同仁グローバル

目的に沿った脂肪酸分析をご提案します

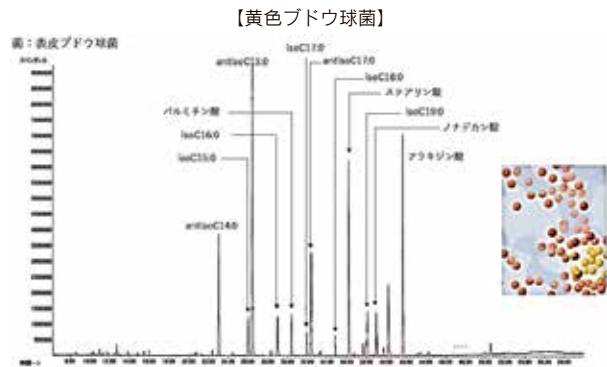
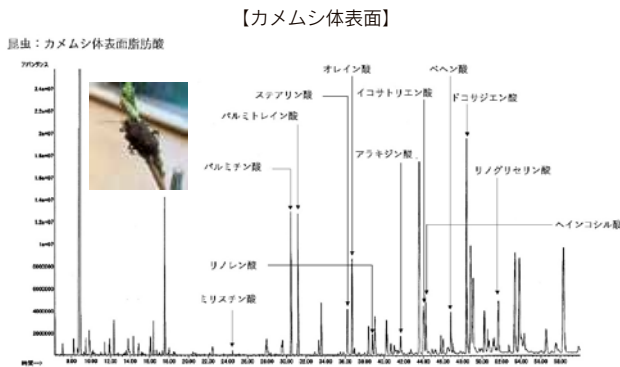
<脂肪酸分析の委託をご検討の皆様へ>

- ・ サンプルの前処理方法や脂肪酸分析のやり方が分からない
- ・ 研究や製品開発、品質管理において脂肪酸分析を行いたい
- ・ サンプル中の微量の脂肪酸を分析したい
- ・ 脂肪酸組成の変化を測定したい
- ・ 脂肪酸分析が必要だが、前処理や分析が面倒だ
- ・ 短鎖脂肪酸（ギ酸、酢酸、酪酸など）の分析

各種サンプルに含まれる脂肪酸分析は、数が多く構造が類似している、構造異性体が多い、サンプルが微量であるなどの理由で、通常 GC/MS によって行われます。GC/MS による脂肪酸分析は、技術の習得に加え、機器の手配や管理、妥当な前処理、測定条件の設定など、サンプル調製からデータ取得・解析に至るまでに相応の期間を要します。同仁グローバルでは様々なサンプルの脂肪酸分析に関する豊富な実績がありますので、是非ご相談ください。

<分析事例>

昆虫の体表面の脂肪酸成分、微生物に含まれる脂肪酸成分について分析を行いました。



【分析方法】

抽出：クロロホルム/メタノール混液抽出，誘導体化：メチルエステル化，分析装置：GC/MS(アジレント・テクノロジー)

対象サンプル	試験事例	
動物組織	培養細胞、血液細胞、組織（筋肉・脂肪・器官）、卵など	培養細胞・血液細胞の脂肪酸組織分析
植物組織	種子、植物油、組織（根、葉、花卉、成長端）など	脂肪酸定性分析、定量分析
微生物	バクテリア、プランクトンなど	ヒドロキシ脂肪酸の定性・定量
溶液等	細胞培養培地、抽出物、残渣、排液など	培地溶液の変化、排液の短鎖脂肪酸の定量分析
脂質分画	遊離脂肪酸、リン脂質、トリグリセリド、コレステロールエステル	TLCによる脂質構成、トリグリセリド・コレステロールエステルの分析
食品 化粧品	製品、原料	植物油の組成・定量分析、原料の確認試験、不良原因調査

株式会社同仁グローバル
<お問合せ>
 Tel 096-286-1311
 Fax 096-286-1312
 glocal@dojindo.co.jp

同仁グローバル 検索

www.dojin-glocal.com

脂肪酸分析

小社へのお問い合わせ等は下記 HP よりお願いします
 URL : <https://www.dojindo.co.jp/>

次号テーマ

神経変性疾患