

Gloestremum incarnatum 由来の Hirsutanol A および Hirsutanol C のオートファジー調節機構

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 木質生命化学 土井 督史

1. はじめに オートファジーとは細胞質のオルガネラや可溶性タンパクをリソソーム経路で分解する機構であり、飢餓対応や細胞内環境維持のほか、ガンや神経疾患などに関わりのある重要な生理機能である。しかし、オートファジーには不明な点が多く残っており、オートファジー誘導物質および阻害物質は、細胞機能の解明への利用が期待できる。当研究室ではニカワウロコタケ (*Gloestremum incarnatum*) 培養菌糸体から hirsutanol A(1)および hirsutanol C (2) を単離し、その絶対配置を決定した¹⁾。化合物 1 は細胞死誘導活性を有し、また、オートファジーを誘導することが報告されている²⁾。化合物 2 は 1 と類似した構造を有しているが、細胞死誘導活性はなく¹⁾、オートファジー誘導に関する報告はない。本研究では、これらの性質の違いを利用してがん細胞に対する 1 と 2 のオートファジー調節機構の解析を行った。

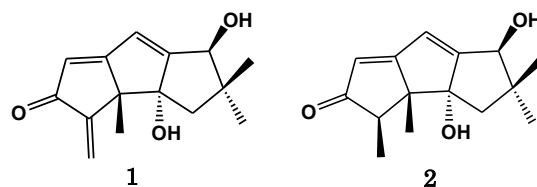


図 1. Hirsutanol A(1)と Hirsutanol C(2)の構造

2. 方法 ① 化合物 1 および 2 の作用機構解明に向け、HeLa 細胞溶解液における標的分子の探索を行った。探索には光親和型アフィニティ樹脂を用いた。精製された分子は LC-MS/MS によるショットガン解析による解析を行った。② ウェスタンブロット法によるオートファジー誘導評価試験を行った。化合物 1 および 2 を HeLa 細胞に最終濃度 100 μ M で与え、4 時間または 12 時間後に細胞を回収し、オートファジーマーカータンパク質量(LC3-II: オートファジー誘導に伴い増加, p62: オートファジー進行に伴い減少)の変化を観察した。ネガティブコントロールとして DMSO(最終濃度 0.2%), ポジティブコントロールとして rapamycin(最終濃度 10 μ M)を用いた。③ SYBR[®] GreenI によるリアルタイム qPCR を用い、オートファジーマーカータンパク質 (LC3B, p62) の mRNA の発現量を観察した。HeLa 細胞に 1 および 2 を最終濃度 100 μ M で与え、2, 4, 8 時間後に細胞を回収し、オートファジーマーカー の mRNA の増減を観察した。

3. 結果と考察 ① 化合物 1 に特異的な標的分子は検出されなかったが、2 に特異的な分子として 14-3-3 σ が検出された。14-3-3 ファミリータンパクはアポトーシスやオートファジーといった多くの生理機能に関与することが知られている。② 化合物 1 を与えた HeLa 細胞では LC3-II の増加および p62 の減少が観察された。化合物 2 では LC3-II のタンパク質量に大きな変化は無かったが p62 の増加が観察された。③ 化合物 1 では LC3B mRNA の発現量の増加および p62 mRNA の減少が観察された。化合物 2 では p62mRNA の顕著な増加が観察されたが、LC3B mRNA において大きな変化は観察されなかった。

4. まとめ 本研究では 2 による HeLa 細胞での p62 の増加を確認したが、その増加がオートファジー阻害に限定されるものではなく、mRNA の増加も関与していることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) R. Asai, *et al.*, *Journal of Antibiotics*, 2011. **64**, 693-696
- 2) F. Yang, *et al.*, *Chinese Journal of Cancer*, 2010. **29**, 655-660