

論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 283 号	氏名	坂井 麻衣子
題 目	<p>Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner. (イソラムネチンはJ774.1マウスマクロファージ様細胞株においてTFEB非依存的にリソソームのタンパク質分解を促進する)</p>		
<p>リソソームは、内部に多種類の加水分解酵素を含む酸性の細胞小器官であり、細胞内外の幅広い生体分子（タンパク質、脂質、糖）に対する分解を担っている。食作用や飲作用を介して細胞外から取り込まれた死細胞や異常分子、また、オートファジーにより細胞質から隔離された損傷ミトコンドリアなどは、いずれも小胞輸送により最終的にリソソームへと運ばれることで分解除去される。</p> <p>近年、加齢や慢性的な高脂肪食の摂取により、各種細胞のリソソーム機能が低下することがわかってきている。特に貪食細胞であるマクロファージにおいてリソソーム機能は重要であり、その機能低下は動脈硬化症の発症リスクを高めること、逆にリソソーム活性を向上させたトランスジェニックマウスでは動脈硬化症の進展が抑制されることが報告されている。このような背景から、本研究では、マクロファージのリソソーム機能を向上させる食品成分を、日常的な食事から摂取しやすいポリフェノールの中から探索した。また、活性化化合物の分子メカニズムについても検討した。</p> <p>J774.1 マウスマクロファージ様細胞株に対して計 56 種類のポリフェノール化合物をそれぞれ処理し、DQ™ Green BSA タンパク質 (DQ-BSA) の分解量を指標としてリソソーム活性を評価した。スクリーニングの結果、タマネギ等に含まれるイソラムネチンに最も強い活性を認めた。また、イソラムネチンの構造類縁体 (4種類) の活性を評価し、構造活性相関を検討したところ、B環 3' 位のメトキシ基がイソラムネチンの活性発現に必要な構造要因であることが示された。さらに、イソラムネチンがリソソーム自体に影響を及ぼしているか直接的に検証するため、細胞内の酸性領域を染色するライソトラッカー試薬を用いてリソソームを蛍光標識した。その結果、イソラムネチンを処理した細胞において酸性小胞の有意な増加が認められた。</p> <p>続いて、イソラムネチンが DQ-BSA の分解を亢進する分子メカニズムを検討した。近年、リソソームの生合成や酵素活性を制御する転写因子として transcription factor EB (TFEB) が注目されている。TFEB は、富栄養条件では mTORC1 によりリン酸化を受けることで不活性化されているが、アミノ酸が枯渇すると mTORC1 活性の低下を介して核内へ移行し、リソソーム活性に関連する一連の遺伝子群を誘導する。そこで、mTORC1-TFEB 経路がイソラムネチンの作用機序に関与する可能性を想定し、検証を行った。まず、イソラムネチンが mTORC1 活性を抑制する可能性について検証したが、mTORC1 活性の変化は認められなかった。また、TFEB の活性化を評価するため、その局在変化を検討したが、イソラムネチンによる TFEB の核内移行は認められなかった。さらに、TFEB の標的遺伝子群 (<i>Atp6v0d2</i>, <i>Ctsd</i>, <i>Lamp2a</i>) の mRNA 発現量を評価したところ、イソラムネチン処理による発現量の増加は見られなかった。これらの結果より、イソラムネチンは mTORC1-TFEB 経路に作用しないことが強く示唆された。</p> <p>本研究では、食品由来ポリフェノール化合物であるイソラムネチンがマクロファージのリソソーム分解活性を顕著に亢進すること、また、その分子メカニズムが mTORC1-TFEB 経路に依存しないことを明らかにした。イソラムネチンは、mTORC1-TFEB とは独立した未知の機構に作用することで、マクロファージの分解能力を向上させていることが予想される。</p>			

報告番号	甲 栄 第 283 号	氏名	坂井 麻衣子
審査委員	主査 阪上 浩 副査 酒井 徹 副査 瀬川 博子		
題目	Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner. (イソラムネチンは J774.1 マウスマクロファージ様細胞株において TFEB 非依存的にリソソームのタンパク質分解を促進する)		
著者	Maiko Sakai, Kohta Ohnishi, Masashi Masuda, Hirokazu Ohminami, Hisami Yamanaka-Okumura, Taichi Hara & Yutaka Taketani		
	令和 2年 6月発行 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 誌 第84巻 第6号 1221-1231ページに発表済		
要旨	<p>本研究は、マクロファージのリソソーム活性を亢進する食品由来ポリフェノール化合物を探索し、同定された化合物の作用機序について検討したものである。</p> <p>リソソームは、内部に多種類の加水分解酵素を含む酸性の細胞小器官であり、細胞内外の幅広い生体分子に対する分解を担っている。食作用や飲作用を介して細胞外から取り込まれた死細胞や異常分子、オートファジーにより細胞質から隔離された損傷ミトコンドリアなどは、いずれも最終的にリソソームへと運ばれることで分解除去される。近年、加齢や慢性的な高脂肪食の摂取により、各種細胞のリソソーム機能が低下することがわかってきている。特に、貪食細胞であるマクロファージにおいてリソソーム機能は重要であり、その機能低下は動脈硬化症の発症リスクを高めること、逆にリソソーム活性を向上させることで動脈硬化症の進展が抑制されることが報告されている。本研究では、マクロファージのリソソーム機能を向上させる食品成分を、日常的な食事から摂取しやすいポリフェノールの中から探索した。</p> <p>J774.1 マウスマクロファージ様細胞株に対して計 56 種類のポリフェノール化合物をそれぞれ処理し、蛍光標識タンパク質の分解量を指標としてリソソーム活性を評価した。スクリーニングの結果、タマネギ等に含まれるイソラムネチンに最も強い活性を認めた。続いて、イソラムネチンがリソソーム機能を亢進する分子メカニズムを検討した。近年、リソソームの生合成や酵素活性を制御する転写因子として transcription factor EB (TFEB) が注目されており、その制御因子として mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) が知られている。まず、イソラムネチンが mTORC1 活性に対して影響を与える可能性を検証したが、mTORC1 活性の変化は認められなかった。また、TFEB の活性化を評価するため、その局在変化および標的遺伝子群の発現量を検討したが、イソラムネチンによる TFEB の核内移行および下流遺伝子の発現誘導は見られなかった。以上より、食品由来ポリフェノール化合物であるイソラムネチンがマクロファージのリソソーム活性を顕著に亢進すること、また、その分子メカニズムが mTORC1-TFEB 経路に依存しないことを明らかにした。</p> <p>本研究は、マクロファージの機能を調節する食品成分を新たに同定したものであり、食による疾病予防に貢献することが期待されることから、博士(栄養学)の学位授与に値すると判定した。</p>		