

## オートファジー活性を発光プレートリーダーで高速測定!

オートファジーの分子メカニズムを解明した功績にて東京工業大学 大隅崇誉教授が2016年のノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しいところだと思います。オートファジーはがん、神経変性疾患、生活習慣病、感染、各種の炎症などの様々な疾患に関与し、また発生・免疫・寿命などにも関わりのある分解機構です<sup>1,2)</sup>。オートファジーフラックスの測定では全般的なマーカーであるLC3に対する発現・局在解析やLC3に蛍光タンパク質を付与してのイメージング解析が行われています。一方で従来法はスループットが低い事、蛍光イメージングの評価というデメリットがありました。これに対し、今回、プロメガではオートファジーフラックスを発光にて測定し、簡便に定量化する技術を確立しました。

### オートファジーとは

オートファジーは細胞質成分をリソソームにて分解する現象であり、酵母から高等動物・植物まで保存されている機構です。オートファジーには、シャペロン介在性オートファジー、マイクロオートファジー、マクロオートファジーの3つの形式が知られていますが、ここでのオートファジーはマクロオートファジーを指すものとしてご紹介します。オートファジーが誘導されると隔離膜が出現・伸長し、タンパク質やオルガネラなどを包み込みます。完全に包み込んだ状態をオートファゴソームと呼びます。続いてオートファゴソームがリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素により包み込まれた細胞質成分が分解されます(図1上参照)。この様な過程を経て、細胞質成分を分解するのがオートファジーです。

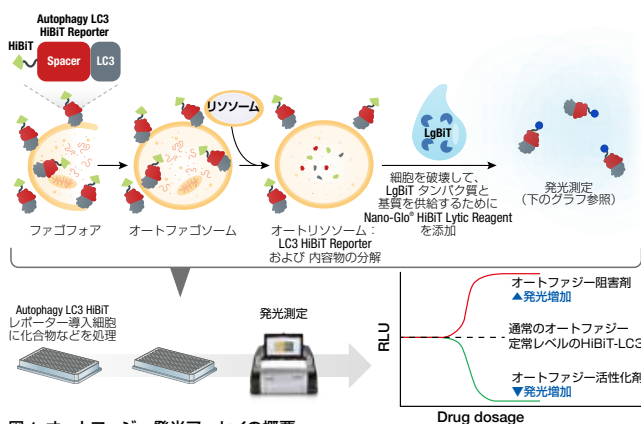


図1. オートファジー発光アッセイの概要

### 発光法を用いたオートファジーフラックスの検出

オートファジーの過程において多くの分子の関与が見出されていますが、LC3タンパク質はオートファジーのほぼすべての過程で存在する事からオートファジーの全般的マーカーとして広く利用されています。その利用方法としてはLC3の発現量をウエスタンブロットング(WB)にて定量したり、LC3にGFPやRFPなどの蛍光タンパク質を付加し、イメージングでの評価がなされてきました<sup>3)</sup>。一方で、WBではスループットが低い事や蛍光イメージングによる評価が難しく、定量的な比較には特殊な装置が必要になるなどのデメリットがありました。プロメガの新しいアッセイでは発光タグHiBiTを活用し、プレートリーダーを用いたオートファジーフラックス解析を可能にしました(図1参照。HiBiTについては2ページをご覧ください)。Autophagy LC3 HiBiT レポーター導入細胞にオートファジー活性に影響を与える化合物を添加し、発光基質とLgBiTタンパク質を検出試薬として加える事で検出を行います。オートファジーを誘導するとHiBiT-LC3レポーターの分解が促進され、発光シグナルが低下します(抑制されると発光シグナルが増加)。すなわち、本アッセイシステムは一般的なルミノメーターを用いて、オートファジーフラックスの変化を発光シグナルにて簡便に評価することができます。

### 3次元細胞モデルでもオートファジーを評価!

HiBiT-LC3レポーターを活用した例を図2に示しました。ここではPP242とBafA1\*を組み合わせ、HiBiTの発光値の変化からオートファジーフラックスを2次元培養と3次元培養のモデルで評価しています。

PP242処理によりオートファジーを誘導すると、HiBiT-LC3レポーターの分解が促進され発光値が低下します。それに対してPP242とBafA1処理を行うと、HiBiT-LC3レポーターの分解が抑制され、発光値が回復する結果が観察されました。2次元、3次元の培養形態に関わらず、発光法によりオートファジーフラックスを評価できることが示唆されます。

ある種のがん細胞においては、2次元培養、3次元培養、がん組織ではオートファジーに関する転写因子の発現パターンが異なるとの報告がなされています<sup>4)</sup>。従来法では難しかった3次元培養での評価も発光

法の活用で進展することが期待されます。3次元モデルを用いたその他の発光解析法については6ページを参照ください。

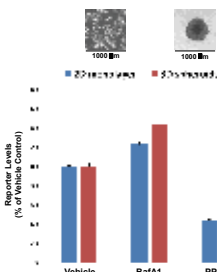


図2. 2次元細胞モデルと3次元細胞モデルでのオートファジー活性の評価  
Autophagy LC3 HiBiT レポーター導入 HEK293細胞を使用した。2次元細胞モデルでは10,000 cells/wellを96well plateに播種。3次元細胞モデルでは2,000 cells/wellにてCorning® 96-well Clear Round Bottom Ultra Low Attachment Microplateに播種した。各化合物を6時間処理し、発光測定を行った。

※ PP242 : mTOR 阻害剤 (オートファジー誘導剤)、BafA1 (Bafilomycin A1) : オートファゴソームとリソソームの融合阻害剤 (オートファジー阻害剤)

### オートファジーに関するスクリーニングへの展望

がんをはじめ、種々の疾患の発症などにオートファジーが関与する事から、オートファジーを制御する薬剤スクリーニングや創薬にも関心が高まっています。スクリーニングのモデル例として、図3に Autophagy LC3 HiBiTレポーターを用いた384wellプレートでのアッセイ例を示しました。

スクリーニングでは概ねCV値10%以内、Z'値が0.5以上であることが求められます<sup>5)</sup>。プロメガのアッセイ例ではCV値3~5%、Z'値0.6~0.7を示し、良好なアッセイ系が構築できる事が示されました。

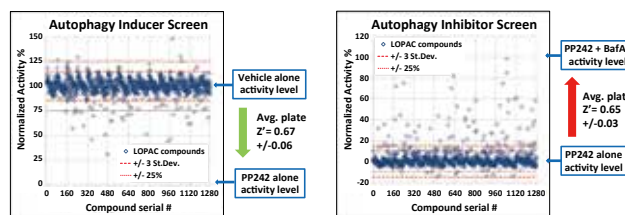


図3. LOPAC ライブラリーを用いたスクリーニングのモデル例

Autophagy LC3 HiBiTレポーター導入 HEK293細胞を1000 cells/wellで384well plateに播種した。(左) 種々の化合物にて6時間処理し、発光測定を行った。Vehicle controlを100、PP242のサンプルを0とし、オートファジーを誘導する化合物の探索を行った。(右) PP242と種々の化合物にて6時間処理し、発光測定を行った。PP242のみのサンプルを0、PP242 + BafA1のサンプルを100とし、オートファジーを阻害する化合物の探索を行った。

### 最後に

オートファジーは今や多くの人を知る機構となりましたが、オートファジーの分子機構にはまだまだ未解明な点があります。今回プロメガではオートファジーのメジャーマーカーであるLC3に着目し、HiBiTの技術を活用しました。発光技術がオートファジー研究の新しい発見の一助になれば幸いです。

### 参考文献

- 1) *N Engl J Med.* 2013 Feb 14;368(7):651-62.
- 2) *Nature Reviews Cancer* volume 17, pages 528–542 (2017)
- 3) Yoshii, S. R. & Mizushima, N. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–13 (2017).
- 4) Corinna Bingel *et al.* *Cell Death Dis.* 2017 Aug; 8(8): e3013
- 5) アッセイ系のバリデーションの手順 (東京大学 創薬機構)  
[http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/wp/wp-content/themes/ddi/doc/assay\\_validation\\_method.pdf](http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/wp/wp-content/themes/ddi/doc/assay_validation_method.pdf)

### 関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Autophagy LC3 HiBiT Reporter Vector and Detection System	1kit	GA2550	88,000
HEK293 Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1kit	GA1040	1,070,000
U2OS Autophagy LC3 HiBiT Reporter Cell Line and Detection System	1kit	GA1050	1,070,000