

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03289

研究課題名(和文) 分解タグの発見にもとづくタンパク質の自在分解法

研究課題名(英文) Controllable degradation method for proteins using a novel degradation tag

研究代表者

有本 博一 (Arimoto, Hirokazu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：60262789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、細胞内に侵入したある種の細菌の周囲に特異な翻訳後修飾をうけたタンパク質が蓄積し、これが分解と密接に関連することを見出した。そこで、この翻訳後修飾が細菌以外の対象についても一般性をもった分解誘導タグとして機能すると仮定し研究を進めた。細菌の周囲に見られた修飾はグアニンの誘導体であったので、種々のグアニン誘導体を合成してタンパク質に導入して、タンパク質寿命に与える影響を調べたところ、予期した通り、タンパク質寿命を短縮する誘導体が発見された。オートファジーに関わる各種の変異細胞株も駆使して作用機序の解析を進めた。また、分解を受けるタンパク質の実施例を増やして効果の一般性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内のタンパク質レベルを低下させる分子技術は、生命科学研究において多用される遺伝学的手法と類似の効果をもたらすため、基礎医学研究の成果を創薬に結びつける手法として注目されています。特定タンパク質の分解を誘導することが主なアプローチになります。細胞内の分解機構であるUPSを使う応用は進んでいますが、オートファジーの利用は十分に進んでいませんでした。本研究は、オートファジーを細胞内の局所にリクルートする初めての分子技術を可能にしました。

研究成果の概要(英文)：I previously reported that a post-translational modification of a protein is closely related to degradation of intracellular bacteria. Here, I hypothesized that this modification could work as a degradation-inducing tag also for non-bacterial targets. Various guanine derivatives were synthesized and when we introduced it into the protein and examined its effect on the protein lifespan, we found that, as expected we have discovered a derivative that shortens the protein lifetime. The mechanism of action was analyzed using various mutant cell lines related to autophagy. In addition, the generalizability of the effect was verified by increasing the number of examples of proteins subjected to degradation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学遺伝学は、1990年代に登場したケミカルバイオロジーの基本概念のひとつである。20,000あまりの遺伝子によってコードされるヒトのタンパク質に対して、それぞれ固有の制御化合物を割り当て、ちょうど RNAi など遺伝学的手法と同様の表現型制御を実現するという考え方である。天然物などの低分子化合物は、それまでも医薬品として優れた実績があり、これをより組織だった生命科学の研究分野として発展させたいという意図にもとづいている。

しかしながら、化学遺伝学の実現には、多数の制御化合物の調製法やスクリーニング効率化など技術的課題が多く存在していた。前者について例えば多様性志向有機合成(DOS)という新たな発想が導入され、後者では DNA-encoded library (DEL) のような方法が一般的になりつつある。これらの努力の結果、ケミカルバイオロジーは大きく進歩したが、その主たる応用分野である創薬の効率は当初期待されたほどの向上に至っていないという見方が一般的である。

当初の化学遺伝学では、低分子によるタンパク質機能の特異的阻害が主に想定されていた。確かに、既存の低分子医薬品には酵素や受容体を標的とするものが多い。酵素の場合は活性ポケットと呼ばれる小さなくぼみを持ち、ここに低分子化合物がフタをする形で結合することによって酵素としての機能は失われる。一方で、ヒトプロテオームのうち酵素活性を有するものは2割ほどと考えられており、大部分のタンパク質は「くぼみにフタ」をするようなやり方では機能を妨害できないことがハイライトされるようになってきた。低分子が小さな分子サイズであることは、その本質的特徴であるため、従来の発想は大きな壁にあたったことになる。

イェール大学のクルーズ教授ら複数の研究者は、このフタをするという考えに代わる新たな低分子の利用法を研究している。つまり、化合物を使って特定のタンパク質の細胞内寿命を短縮し、その結果として薬効を導くという考え方である。この方法では特定タンパク質の細胞内濃度が低下する。化学遺伝学が当初モデルとした遺伝学的手法が結果的に特定タンパク質の細胞内濃度を低下させることと高い類似性がある。

クルーズ教授の手法は現在 PROTACs として著名であり、企業化され、臨床試験が進められている。これらの手法は、ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)によるタンパク質分解を基盤としている。PROTACs のようなデグレダー分子は、分解を誘導する基質に結合する warhead と分解系に結合する分解タグを持つキメラ型の分子が中心である。PROTACs の分解タグはユビキチン化酵素に結合する役割をになっており、基質のユビキチン化を促進する。

2. 研究の目的

化学遺伝学の夢を実現するためには、PROTACs のようなタンパク質自在分解法の発展が欠かせないと考えられる。一方で、細胞内の分解機構は UPS だけではなく、オートファジーの役割も大きい。そこで、本研究では、オートファジーに注目して標的選択的な分解を誘導する分子の設計・実現を目指した。

3. 研究の方法

選択的オートファジーを誘導する化合物は従来まったく知られておらず、また選択的オートファジーに関わるユビキチン化酵素も同定されていない。個別的な選択的オートファジーの実例に学んで研究を進めることにした。

2013年に研究代表者は、A群連鎖球菌感染細胞における選択的オートファジー機構を研究したが、この際に排除に先立って細菌周囲に S-グアニル化修飾が蓄積することを見出していた。この事実注目して、本研究では S-グアニル化を分解タグの候補として検討することにした。

4. 研究成果

S-グアニル化修飾は、内因性の 8-ニトロ cGMP とシステイン残基の反応によって生じる。この修飾は少なくとも試験管内では非酵素的に進行する。このため、8-ニトロ cGMP を用いると多数の細胞内タンパク質が同時に修飾を受ける可能性があり、解析を著しく複雑にする。また、本研究が目指している特定タンパク質の選択的分解に照らせば、8-ニトロ cGMP の利用は課題が多かった。

そこで、蛍光タンパク質などをモデル分解基質として細胞内に発現させ、細菌感染がない単純な条件下において、ケミカルバイオロジーのタグ化技術を利用して S-グアニル化を導入した。その結果、モデル分解基質あたり一つの修飾導入が細胞内局在をドット状に変化させた。オートファジーのマーカーとして多用される LC3 タンパク質と共局在することなどから、モデル基質はオートファジー分解を受けることが示唆された。

一方で、この初期の実験から、S-グアニル化構造を用いる欠点も明らかになった。この構造には、cGMP に由来する環状リン酸の負電荷が存在している。このため、細胞外から化合物を投与する実験においては細胞膜透過性が低いのである。そこで、グアニン環とタンパク質をつなぐ結合部位、グアニン環、環状リン酸を含むリボースの 3 つの部位に分けて、それぞれ網羅的な合成展開を実施した。その結果、リボース部分はアルキル基で完全に置換できることが判明した。以下の研究には *p*-フルオロベンジル基を持つ改変 S-グアニル化タグを用いた。

このタグをモデル基質に導入すると細胞内のタンパク質レベルを約 3 割にまで抑制することができた。このことから本研究課題が目指す化合物によるタンパク質ノックダウンが実現できたと言える。この分解がオートファジー機構に基づくことは、リソソーム阻害剤や、オートファジー不全の Atg5^{-/-} マウス線維芽細胞を用いる実験でも支持された。

選択的オートファジーでは一般に、分解基質と隔離膜とをなかだちするオートファジー受容体が関与する。主要な受容体として知られる p62/sqstm-1 を欠く線維芽細胞では、S-グアニル化に伴うドット状の構造が形成されなかった。このことから、p62 がこの場合の受容体であると想像される。

続いて、ユビキチン構造との関係を調べた。先行研究と位置付けた A 群連鎖球菌のオートファジーでは、免疫細胞化学によって Lys63 型のユビキチン鎖の集積が確認されている。あるモデル分解基質を使って、プルダウン実験を実施し、同時に沈降するユビキチン鎖の種類を免疫細胞化学によって調べたところ、同様に Lys63 型ユビキチン鎖が確認された。しかしながら、ユビキチン鎖を認識する抗体の特異性は完全ではなく、抗体が存在したいタイプの連結様式もあることから、今後は質量分析による解析を進める必要がある。対比される PROTACs では、ユビキチン化と標的基質の分解が明確に結びついているが、本研究の場合はユビキチンがどのようにオートファジーを結びついているかは不明な点が多く残った状態にある。

上記の検討結果によって、低分子（合成改変した S-グアニル化）が単独でオートファジーをリクルートするということが明らかになった。本研究では、複数の細胞内タンパク質の分解に取り組んだが、今後はさらに実例を増やすとともに、創薬技術として実用性を向上させる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Daiki, Moriyama Jun, Nakamura Tomoe, Miki Erika, Takahashi Eriko, Sato Ayami, Akaike Takaaki, Itto-Nakama Kaori, Arimoto Hirokazu	4. 巻 76
2. 論文標題 AUTACs: Cargo-Specific Degradable Using Selective Autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 797 ~ 810.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Daiki, Arimoto Hirokazu	4. 巻 16
2. 論文標題 Targeting selective autophagy by AUTAC degraders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 765 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1718362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 16件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 選択的オートファジー分解の低分子化合物による制御
3. 学会等名 第44回 日本毒性学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 有本博一、高橋大輝、一刀かおり
2. 発表標題 選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 オートファジーの自在制御に向けて
3. 学会等名 第25回 内毒素・LPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 内因性小分子が制御する選択的オートファジーの機構
3. 学会等名 第43回 日本毒性学会 シンポジウム：オルガネラトキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 オルガネラ分解の自在制御に向けて
3. 学会等名 生理学研究所 研究会「オルガネラネットワークの制御機構とその生理的意義」（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 S-グアニル化を起点とする細胞内分解経路
3. 学会等名 第69回 日本酸化ストレス学会学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 抗菌オートファジーにおける分解標的認識の分子基盤
3. 学会等名 第90回 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 A role of nitrative stress in selective autophagy
3. 学会等名 第90回 日本細菌学会総会 国際シンポジウム Redox signaling in host defense and oxidative stress (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 選択的オートファジー分解を可能にする低分子化合物
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有本博一、高橋大輝
2. 発表標題 Protein S-guanylation is a standalone tag for selective autophagy
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Middle Molecular Strategy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 Designed small molecules for target-specific autophagic clearance
3. 学会等名 Keystone Symposia: Autophagy: From Model Systems to Therapeutic Opportunities (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 オートファジーに基づく創薬の可能性
3. 学会等名 日本薬学会医薬化学部会 創薬懇話会2019 in 秋保 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirokazu Arimoto
2. 発表標題 Autophagy-based targeted degradation
3. 学会等名 Targeted Protein Degradation Forum in Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 選択的オートファジーを利用する創薬手法
3. 学会等名 千葉県がんセンター研究所 集談会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 選択的オートファジーを自在に制御できる分子AUTACの発明と応用可能性
3. 学会等名 JBAバイオエンジニアリング研究会公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有本博一
2. 発表標題 オートファジーに基づく標的選択的分解技術：AUTAC
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 有本博一、一乃かおり	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 188
3. 書名 生命機能に迫る分子化学：生命分子を真似る、飾る、超える（日本化学会編）	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 傷害を受けたミトコンドリアのオートファジー機構による分解剤	発明者 有本博一、一乃かおり、高橋大輝、森山順	権利者 国立大学法人 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、W02019/013181	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 複素環化合物	発明者 有本博一、一乃かお り他7名	権利者 国立大学法人 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、W0/2018/143403	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考