

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09577

研究課題名（和文）タンパク質分解を標的としたATP産生増強による新規虚血性心疾患治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategy for ischemic heart diseases through targeting protein degradation

研究代表者

加藤 久和 (Kato, Hisakazu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30589312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、直接的にミトコンドリアATP産生を増強させる新たな虚血性心疾患の治療法開発を目指し、独自に構築したスクリーニング系から、ATP産生制御因子GOS2の分解を阻害する化合物を同定した。これらの化合物は心筋細胞でのATP産生の増強と、著明な細胞保護効果を示した。さらに本スクリーニング系を発展させ、GOS2タンパク質分解に関わる新規E3リガーゼを同定し、GOS2分解メカニズムの一端を明らかにした。今後ヒット化合物による分解阻害メカニズムの解明を進めるとともに、既に構築済みの心不全モデルマウスへの投与も進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は持続的な収縮弛緩の繰り返しによって莫大なエネルギー（ATP）を消費する。そのため狭心症などで、ATPの需要と供給のバランスが崩れると、容易に心不全となりうる。循環器領域で幾つかの分子標的治療が進められているが、虚血性疾患を標的としたものは未だ開発されておらず、直接的にATP産生を増強させる治療法の開発が望まれている。本研究で明らかにしたATP産生制御因子GOS2の分解を阻害する化合物は、直接的に心筋細胞のATPを増産できる点において、画期的な虚血性心疾患の治療法につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, with the aim of developing a novel therapeutic strategy for ischemic heart disease that directly enhances mitochondrial ATP production, we identified compounds that inhibit the degradation of the ATP-synthesis regulator GOS2 using originally constructed screening system. These compounds enhanced ATP production in cardiomyocytes and showed a remarkable cytoprotective effect. By further utilizing this screening system, we identified a novel E3 ligase involved in GOS2 degradation and clarified a novel mechanism of GOS2 degradation. In the future, we plan to address the mechanism of inhibiting GOS2 degradation by these compounds and to administer it to the heart failure model mice.

研究分野：分子心臓学

キーワード：虚血性心疾患 ATP ミトコンドリア タンパク質分解 薬剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

- (1) 虚血性心疾患におけるエネルギー代謝と心不全
心臓は持続的な収縮弛緩の繰り返しによって莫大なエネルギーを消費する。そのため虚血状態になると、ATP の需要と供給のバランスが崩れ、心不全発症の大きな要因となりうる。虚血状態において、絶え間ない自律拍動を行う心筋細胞は、ATP 産生効率の悪い解糖系へのシフトではなく、その機能維持のためにミトコンドリア ATP 産生機構を調節していることが近年明らかになってきた。そこで直接的にミトコンドリア ATP 産生を増強させることができる新たな虚血性心疾患の治療法の開発が期待される。
- (2) 心筋細胞におけるミトコンドリア ATP 産生測定系の開発
研究代表者らは、エネルギー代謝調節メカニズムを解明する上で、細胞内 ATP 濃度を鋭敏に測定する実験系が必須であると考え、近年開発された ATP 感受性 FRET プローブを応用して、心筋細胞ならびにゼブラフィッシュ心臓におけるミトコンドリア ATP 濃度をリアルタイムで測定できる実験系を確立した。
- (3) ATP 産生増強因子 G0S2 の同定とそのタンパク質分解制御
研究代表者らは、培養心筋細胞において低酸素刺激により誘導される遺伝子として G0S2 (G0/G1 switch gene 2) を同定した。生化学的機能解析により、G0S2 は呼吸鎖において ATP 合成を担う FoF1-ATP 合成酵素との相互作用を介して、低酸素下における ATP 産生を正に制御することを報告した (Kato H. et al., PNAS 2014; 111, 273-278)。また、G0S2 は非常に半減期の短いタンパク質であることを見出し、プロテアソーム阻害剤によりその量が増加すること、細胞内でポリユビキチン化されることからユビキチン・プロテアソームを介したタンパク質分解の制御されていることが明らかとなった。
- (4) G0S2 タンパク質分解を標的とした化合物スクリーニング系の確立
G0S2 が低酸素下におけるミトコンドリア ATP 産生を調節すること、および G0S2 は半減期の短いタンパク質であることから、心筋での G0S2 タンパク質量を増加させる薬剤はミトコンドリア ATP 産生の増強を促し虚血性心疾患の新たな治療戦略となりうると思われる。そこで G0S2 タンパク質分解を阻害する創薬候補化合物の探索を目的とし、EGFP-G0S2 を安定に発現する細胞株 (C2C12/EGFP-G0S2 細胞) を樹立し、ハイコンテントイメージング装置 IN Cell Analyzer による高速画像撮影技術により高精度かつ高感度に生細胞内蛍光強度を定量評価できるスクリーニング系を構築した (図 1)。

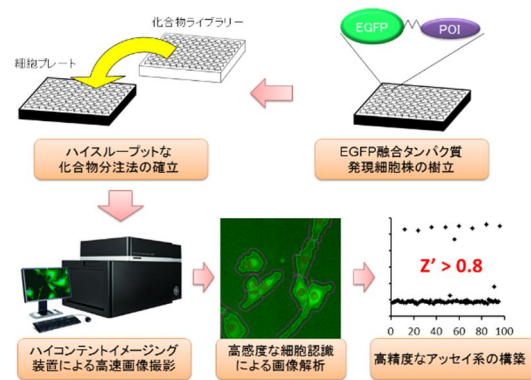


図 1 タンパク質量の変化を指標とした
ハイスループットスクリーニング系の構築

2. 研究の目的

本研究では、ATP 産生制御因子 G0S2 タンパク質量の蓄積を介して ATP 産生を増強させることができる創薬候補化合物の探索・同定を目的とする。生化学的手法から G0S2 分解制御機構を明らかにし新規化合物の標的分子を同定するとともに、研究代表者らがこれまでに確立したミトコンドリア ATP 動態の可視化技術を用いて創薬候補化合物の効果を検証し、ATP 産生増強を介した新規虚血性心疾患治療法の開発に向けた POC 獲得を目指す。

3. 研究の方法

- (1) G0S2 タンパク質分解を阻害する化合物スクリーニング
これまでに構築したスクリーニング系を用いて、大阪大学産学連携本部(現・産学共創本部、創薬推進拠点化合物ライブラリースクリーニングセンター)から提供された 55,000 化合物について、G0S2 タンパク質の分解が阻害される(すなわち EGFP-G0S2 量が増加する)化合物のハイスループットスクリーニングを実施した。そこで得られたヒットについて、偽陽性および非特異的なプロテアソーム阻害剤を排除する目的で、非特異的デグロン CL1 を応用した EGFP-CL1 発現 C2C12 細胞株を用いてカウンターアッセイを行い、さらに G0S2 特異的なヒット化合物を絞り込んだ。絞り込まれたヒット化合物について、実際に G0S2 タンパク質分解を阻害するか Western blot 法にて検証した。また項目(3)の検証により、ヒット化合物と類縁構造を有する化合物群を入手し G0S2 タンパク質の分解阻害活性および G0S2 タンパク質に対する特異性を評価した。

- (2) G0S2 タンパク質分解機構の解明
 これまで G0S2 タンパク質の分解に寄与する因子の探索をタンパク質相互作用のアッセイから進めてきたが同定に至らず、背景(4)で述べた化合物スクリーニング系を応用して、化合物の代わりに siRNA library を使用することを発案した。そこで G0S2 タンパク質の分解を担う E3 リガーゼを同定する目的で、ユビキチン関連遺伝子 523 個を標的とした siRNA library を用いて、ノックダウンすることによって G0S2 タンパク質の分解が阻害される(すなわち EGFP-G0S2 量が増加する) 遺伝子の探索を行った。候補遺伝子について siRNA ノックダウンおよび CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて検証し、G0S2 タンパク質分解の生化学的メカニズムを解析し、G0S2 が制御する ATP 産生にどのように影響を及ぼすかについて検討した。
- (3) G0S2 タンパク質分解阻害化合物の心筋細胞における効果検証
 項目(1)において選別した化合物群について、ラット新生仔心筋細胞を用いて、G0S2 が制御する ATP 産生に対して及ぼす影響を検討した。具体的にはこれまで G0S2 の機能解析に用いてきた独自の ATP 産生評価系(セミンタクト細胞を用いた ATP 合成能の評価 (MASC アッセイ)、ATP 感受性 FRET プローブを用いた生細胞での ATP 濃度測定) を実施し、低酸素下における ATP 濃度の変化を検討した。また低酸素下における細胞生存率についても検討した。

4. 研究成果

(1) G0S2 タンパク質分解を阻害する化合物の同定

化合物ライブラリーのスクリーニング： 構築した EGFP-G0S2 恒常発現細胞株を用いる Cell-based スクリーニングアッセイ系を用いて、約 55,000 種類の化合物ライブラリーについて G0S2 タンパク質分解阻害の 1 次スクリーニングを行った結果、387 化合物のヒットを得た。このうち再現性を得た化合物について、EGFP-CL1 発現 C2C12 細胞株を用いてカウンターアッセイを行い、17 化合物に絞り込んだ。次に、心筋細胞やその他の G0S2 発現細胞にこれらの化合物を作用させ G0S2 タンパク質が増加するかを Western Blot 法にて検討し、5 化合物についてタンパク質の蓄積を認めた。

類縁化合物の探索・同定： ヒット候補化合物は強い細胞毒性のために ATP 合成活性が評価できなかった。そこで、スクリーニングでヒットした 5 化合物のうち 2 化合物 (X, Y) について(株)ナミキ商事が有する化合物ライブラリーからヒット化合物 X, Y の類縁構造を持つ化合物を探索し約 100 化合物を入手した。これらの類縁化合物に対して、(A) G0S2 タンパク質の安定化(薬理活性の評価 1)、(B)心筋細胞を用いた Cell Viability アッセイ(細胞毒性の評価)、および (C) MASC アッセイでの ATP 合成速度の測定(薬理活性の評価 2) の 3 項目を検討した。これらの検討から、G0S2 タンパク質の安定化を促し、特異的にミトコンドリア ATP 産生を促進する一方、低毒性であるヒット化合物 2 種を同定した(図 2, unpublished data)。

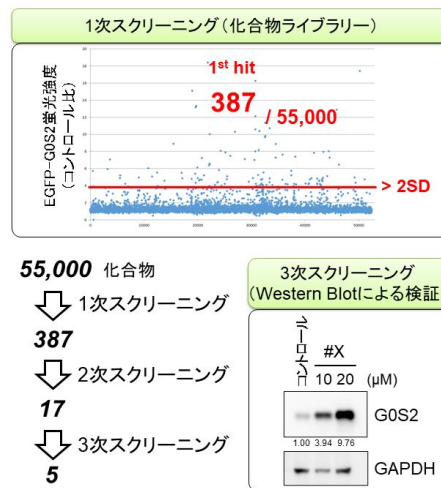


図 2 G0S2 タンパク質分解阻害剤のスクリーニング

(2) G0S2 タンパク質分解機構の解明

G0S2 タンパク質はユビキチン・プロテアソーム系で分解制御を受けることが明らかになっていたが、その分解を特異的に制御するメカニズムは不明のままであった。そこで化合物スクリーニング系を応用して、ユビキチンリガーゼ E3 を標的とした siRNA library を C2C12/EGFP-G0S2 細胞に作用させ、遺伝子がノックダウンされることによって G0S2 タンパク質分解が阻害される siRNA をスクリーニングした。また化合物スクリーニングと同様のカウンターアッセイを行い、G0S2 分解を制御する新規特異的 E3 リガーゼとして RNF126 を同定した。RNF126 は BAG6 という scaffold protein と協調して G0S2 のユビキチン化および分解に関わっていることを明らかにした

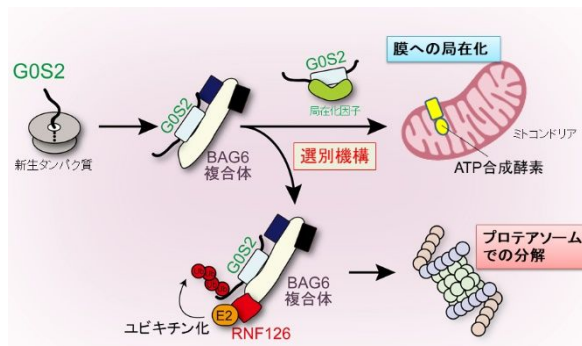


図 3 G0S2 タンパク質分解メカニズム

(Kamikubo K, Kato H (Corresponding author), et al., J Biol Chem 2019; 294,14562-14573.)。GOS2 は、リボソームで新生タンパク質として合成されたのち、BAG6 複合体による、膜への局在化かまたはプロテアソームによる分解かの選別機構により制御され、分解に方向づけられた基質 GOS2 は、BAG6 ヘリクルートされた RNF126 によりユビキチン化され分解されるという新規メカニズムを提唱した。(Kamikubo K, Kato H, et al., J Biol Chem 2019; 294,14562-14573., Science 2017; 355, 298-302, Curr Biol 2018; 28, R498-R511)(図 3)。

(3) GOS2 タンパク質分解阻害化合物の心筋細胞における効果

項目(1)で同定したヒット化合物 2 種について、GOS2 タンパク質の安定化が実際に生細胞においてミトコンドリア ATP 産生を上昇させるかについて検討した。ラット新生仔心筋細胞に、ATP 感受性 FRET プローブを発現させたのち、化合物を添加し、顕微鏡下で低酸素 (1%O₂) 環境を作り、経時的に Dual CCD カメラを用いて CFP および YFP 画像を取得した。取得した画像から FRET 比を算出し、低酸素下におけるミトコンドリア ATP 濃度の変化を計測した。その結果、ヒット化合物 2 種の処理細胞では、コントロール処理細胞に比して、低酸素下でのミトコンドリア ATP の減少が、化合物濃度依存的に抑制された。また、同様の低酸素環境を 48 時間続けたときの細胞生存率においても、化合物処理群で 2 倍程度の改善を認めた。

以上の結果から、独自に構築したタンパク質分解を標的としたスクリーニング系を用いることによって、GOS2 特異的な分解阻害剤開発に向けたヒット化合物を同定し、GOS2 分解メカニズムの一端を明らかにした。GOS2 分解阻害剤は未だ drug-like compound ではないため、今後 AMED-BINDS の協力のもと構造展開を進め、さらなるリード候補化合物の取得を目指す。さらに既に構築されているミトコンドリア病モデルマウスへの投与準備も進めていく。新規 E3 リガーゼ RNF126 による GOS2 タンパク質分解機構の解明については、J.Biol.Chem 誌にその成果を発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S, Inanobe A, Matsuura N, Kobayashi H, Ohno S, Ebana Y, Tsukamoto O, Ishino S, Takuwa A, Kioka H, Yamashita T, Hashimoto N, Zankov DP, Shimizu A, Asakura M, Asanuma H, Kato H, Takashima S. et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2157 ~ 2169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761.	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 Kamikubo Kenta, Kato Hisakazu, Kioka Hidetaka, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Nishida Yuya, Asano Yoshihiro, Imamura Hiromi, Kawahara Hiroyuki, Shintani Yasunori, Takashima Seiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14562 ~ 14573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008544	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 Nagao Takemasa, Shintani Yasunori, Hayashi Takaharu, Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Nishida Yuya, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Yashirogi Shohei, Yazawa Issei, Asano Yoshihiro, Shinzawa Itoh Kyoko, Imamura Hiromi, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Goto Yu ichi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	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 Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Fujita Takeshi, Asano Yoshihiro, Shintani Yasunori, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Imamura Hiromi, Kogo Mikihiro, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 In vivo real time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901686R	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 神窪謙太、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 ミトコンドリアATP産生制御因子G0s2を特異的に分解する新規E3 Ligaseの同定と機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神窪謙太、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 ミトコンドリアATP産生制御因子G0s2を特異的に分解するE3複合体の同定と機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神窪謙太、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 ミトコンドリアATP産生を制御因子G0s2の量的制御に関する機能解析
3. 学会等名 第64回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神窪謙太、加藤久和、高島成二
2. 発表標題 ミトコンドリアATP産生制御因子G0s2タンパク質を特異的に分解する新規ユビキチンリガーゼの探索
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 久和
2. 発表標題 G0S2を分子標的とした新規ATP合成酵素活性化剤の開発
3. 学会等名 創薬シーズ事業化コンペティション（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Kamikubo, Hisakazu Kato, Seiji Takashima
2. 発表標題 G0s2 is degraded by RNF126 through the interaction with BAG6-mediated molecular triage process.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting-Ubiquitin, Autophagy&Disease（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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