

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19190

研究課題名(和文)細胞小器官の選択的分解に基づく神経変性疾患の治療戦略

研究課題名(英文)Therapeutic strategies for neurodegenerative diseases mediated by selective degradation of organelles

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患全般にみられる特徴として、タンパク質凝集体や機能不全ミトコンドリアの蓄積がある。本研究では、選択的オートファジーによる、機能不全ミトコンドリアの選択除去を可能にする化合物の開発を目指した。選択的オートファジーを局所にリクルートする未発表の低分子化合物を起点として、これをミトコンドリア外膜に選択的に到達させる条件を確立した。培養細胞を用いて化合物の評価を進めたところ、機能不全ミトコンドリアの分解が進行し、ミトコンドリア形態、膜電位、ATP産生が改善することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
疾患の原因となる物質を取り除く手法ができれば、直裁的な分子治療戦略になります。神経変性疾患では、根本的な治療法が存在しないことも多いため、今回の研究を企画しました。昨日が低下したミトコンドリアにオートファジーを呼び寄せることによって分解除去する可能性が示されました。今回の実験は、培養細胞を用いた基礎研究であり、疾患モデル動物など、より高次の評価系で検討を継続する必要があります。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of protein aggregates and dysfunctional mitochondria is a common feature of neurodegenerative diseases. The present study aimed to enable selective removal of dysfunctional mitochondria by selective autophagy.

Using an unpublished small molecule that locally recruits selective autophagy, I developed conditions to deliver this molecule to the outer mitochondrial membrane. Degradation of the dysfunctional mitochondria was observed and mitochondrial morphology, its membrane potential, and ATP production were found to be improved.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

私たちが健康に生活するためには、身体を絶えず新鮮に保つ必要がある。生体内の物質は日々新たに合成されるが、これと同時に古くなった物質を取り除くことになる。このため、細胞内分解機構は合成機構に劣らず重要である。

細胞内分解機構として、主にユビキチン-プロテアソーム系(UPS)による分解とオートファジーが存在している。前者はタンパク質に特化された機構で、分解に先立って基質にはユビキチン修飾が導入される。修飾に関わるユビキチン化関連酵素群はヒトのゲノムの大きな割合を占めており、分解基質の選択に関わっているものと考えられている。後者のオートファジーは、細胞内の自己成分をリソソーム分解する機構の総称である。当初、マクロオートファジーは分解対象を選ばない非選択的分解とされていたが、有害物質を選ぶ選択的オートファジーの存在が明らかになっている。オートファジーにおける基質選択性発現の機構は、UPS に比べて理解が遅れており、研究の進展が期待されている。

身体を構成する物質の入れ替えには、細胞単位で全体を置き換える方法と、細胞内における物質分解が併用されている。このため、組織における細胞の寿命が分解機構の相対的な重要性に関わる。神経細胞は、ほぼ一生にわたって使用されるため、他の細胞に比べてとりわけ細胞内分解の役割が大きいと考えられる。

神経変性疾患には、主要なものとしてアルツハイマー病やパーキンソン病などがあるが、細胞内にタンパク質の凝集体や機能不全ミトコンドリアの蓄積が見られることが多い。これらは、細胞にとって有害である。蓄積が見られるタンパク質は多くが同定されているので、これをユビキチンプロテアソーム系に基づいて除去する試みが盛んに実施されている。しかし、この場合は対象がタンパク質に限られ、すでに生成した凝集体やミトコンドリア全体の除去は原理的に期待できない。そこで、選択的オートファジーによる分解の利用が期待される。

生体防御に関わる一部のオートファジーには、病原体など分解対象を見分ける能力が備わっている。分解の目印となるタグの存在が予想されてきたが、その実体は長く不明のままであった。研究代表者は、細菌排除のオートファジー(抗菌オートファジー)を研究する途上で、待望の「分解タグ」を突き止めた(2013年)。

## 2. 研究の目的

オートファジーの自在な制御を可能にする化合物は、神経変性疾患の治療に有用と考えられる。特に、機能不全ミトコンドリアの選択的除去は他の手法では難しいため、本挑戦的研究(萌芽)の中心的な課題として設定した。ミトコンドリアは、かつては独立して生活していた古細菌に由来するとも言われる。研究代表者が抗菌オートファジーにおいて見出したタンパク質 *S*-グアニル化がミトコンドリアの分解にも機能しうるかを明らかにすることにした。

## 3. 研究の方法

これまでに実施した他の科研費課題などによって、タンパク質 *S*-グアニル化の構造改変が実施されてきた。優れた特性を持つ *S*-グアニル化類似化合物として、9-*p*-フルオロベンジルグアニン(FBnG)を分解タグとして使用した。

ミトコンドリア特異的に FBnG を導入する手法として Halo-Tag タンパク質を活用した。ミトコンドリア外膜タンパク質である Omp-25 と Halo-tag を融合し Hela 細胞に発現させ、ここに FBnG 構造を含む Halo-tag リガンドを投与した。

また、ミトコンドリア外膜の TSPO タンパク質に結合が期待されるキメラ型の化合物 AUTAC4

を設計した。

#### 4 . 研究成果

FBnG 構造を部分構造としてポリエチレングリコールを含むリンカーで 6-Cl-ヘキシル基と連結して Halo-tag 実験用のリガンドを調製した。続いて、TSPO リガンドであるフェニリンドール誘導体と FBnG 構造とをポリエチレングリコールを部分構造とするリンカーを介して連結した AUTAC4 を化学合成した。

まず、Omp25-Halo-tag 融合タンパク質を発現した HeLa 細胞に FBnG を導入したところ、期待するようなミトコンドリアタンパク質の減少は観察されなかった。この原因を種々検討したところ、ミトコンドリアの形態が因子としてなっていた。健全なミトコンドリアは互いに結合した長くひも状の構造をとっている。疾患などによるミトコンドリアの機能不全は、ミトコンドリアの断片化を促進することが一般的に知られている。そこで、遺伝学的手法やミトコンドリア毒性化合物を用いて断片化を誘導し、疾患を模擬的に再現することにした。この条件下では、明確にミトコンドリアタンパク質の減少が見られた。このことは機能不全ミトコンドリアと健全なミトコンドリアを形態によって区別して分解できることを示唆している。

この初期検討結果を受けて、研究計画にもとづき培養細胞を用いて化合物の評価を進めた。まず、FBnG 構造の導入によって、細胞死が抑制されることがわかった。ミトコンドリアの膜電位が低下するとミトコンドリア内部からチトクローム c が細胞質に放出され、これがカスパーゼ経路を活性化してアポトーシスが起きることが知られている。そこで、化合物存在下で細胞質のチトクローム c 濃度、ならびにプロカスパーゼの切断を調べたところ、両方とも抑制されていた。これらの細胞死抑制効果は、機能不全ミトコンドリアをオートファジーが速やかに隔離したことによってもたらされたと考えている。

ミトコンドリアの選択的オートファジー（ミトファジー）は、その分解を正確に観察することが難しい。ミトコンドリアは互いに融合や分裂を繰り返すことによって数が変化すること、ミトコンドリアに近接する隔離膜の数はオートファジー分解の効率を必ずしも正確に反映しないことが知られている。さらに、ミトコンドリア生合成が促進されると、見かけ上は分解がないように観察される課題があった。そこで、これまでの研究で用いてきた、ミトコンドリア形態、膜電位、ATP 産生に加えて、新たに Rosella 色素を利用した。Rosella は、赤い蛍光を発するタンパク質と、pH 感受性の緑色蛍光タンパク質を融合させたものである。これをミトコンドリア内部のマトリックスに発現させた。オートファジーによって、ミトコンドリアが細胞質からリソソーム内に移動すると、pH 変化によって緑色蛍光が消失する。この方法によって、正確にミトファジーの進行を検出できるようになった。この結果、AUTAC4 を代表とする化合物は、断片化したミトコンドリアを速やかにオートファジー分解に導くことが示された。

ミトファジーの機構として、Parkin-PINK1 経路が最もよく研究されている。これらタンパク質の変異は、神経変性疾患のひとつパーキンソン病の原因となる。逆にいえば、Parkin を欠くパーキンソン病患者においては、オートファジーを用いる戦略が適用できない懸念があった。そこで、FBnG タグを用いる本研究の手法が、Parkin や PINK1 欠損繊維芽細胞でも適用できるか確認したところ、Parkin と PINK1 のいずれも必要としないことが判明した。このことは、Parkin を欠くパーキンソン病においても、本研究の成果を適用できる可能性を示している。

本研究を実施する前には、機能不全ミトコンドリアを狙ってオートファジー分解する手法は存在していなかった。機能不全ミトコンドリアはパーキンソン病を始めとして神経変性疾患に共通するので、当初の期待に沿った成果をあげることができたと考えている。機能不全の有無

を見分けて分解できることや、細胞死の抑制効果が確認されたことも重要な知見である。

今回の研究の一部には、神経系細胞様の性質を示す Neuro2a 細胞を用いたが、大部分では扱いやすい HeLa 細胞や疾患患者由来線維芽細胞を用いたことから、今後はより神経系に特化した検討を継続する必要があると考えている。

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<br>Takahashi Daiki, Moriyama Jun, Nakamura Tomoe, Miki Erika, Takahashi Eriko, Sato Ayami, Akaike Takaaki, Itto-Nakama Kaori, Arimoto Hirokazu | 4. 巻<br>76                  |
| 2. 論文標題<br>AUTACs: Cargo-Specific Degradable Using Selective Autophagy  | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Cell  | 6. 最初と最後の頁<br>797 ~ 810.e10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009">https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009</a>                   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi Daiki, Arimoto Hirokazu   | 4. 巻<br>16              |
| 2. 論文標題<br>Targeting selective autophagy by AUTAC degraders   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Autophagy   | 6. 最初と最後の頁<br>765 ~ 766 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br><a href="https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1718362">https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1718362</a> | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>有本博一                         |
| 2. 発表標題<br>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<br>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<br>2018年                         |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>有本博一                     |
| 2. 発表標題<br>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<br>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<br>2018年                     |

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

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

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>有本博一                     |
| 2. 発表標題<br>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<br>第44回 日本毒性学会学術集会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2017年                     |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>有本博一、高橋大輝、一刀かおり          |
| 2. 発表標題<br>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<br>日本農芸化学会 2018年度 大会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>有本博一                               |
| 2. 発表標題<br>オートファジーに基づく創薬の可能性                  |
| 3. 学会等名<br>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<br>2019年                               |

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

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

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>有本博一                                |
| 2. 発表標題<br>選択的オートファジーを自在に制御できるAUTAC分子の発明と応用可能性 |
| 3. 学会等名<br>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<br>2020年                                |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>有本博一                       |
| 2. 発表標題<br>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<br>日本化学会第100春季年会              |
| 4. 発表年<br>2020年                       |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>有本博一、一刀かおり                         | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>化学同人                               | 5. 総ページ数<br>188 |
| 3. 書名<br>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1件

|   |                            |                   |
|---|----------------------------|-------------------|
| 産業財産権の名称<br>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<br>有本博一、一刀かおり、高橋大輝、森山純 | 権利者<br>国立大学法人東北大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、W02019/013181 A1        | 出願年<br>2018年               | 国内・外国の別<br>外国     |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

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