

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02844

研究課題名(和文) AUTAC法による疾患原因のオートファジー分解

研究課題名(英文) Autophagic degradation of pathogenic components by the AUTAC method

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの身体を構成する物質は適切に更新される必要がある。神経細胞のように細胞自体の寿命が長い場合には、有害物の蓄積が疾患につながると指摘されている。そこで、細胞内の主要分解機構であるオートファジーを利用して、細胞内に存在する疾患原因物質を取り除く手法について研究した。疾患原因物質を選択するため、標的化リガンドと称する適切な化合物を選び、別途見出した分解タグ構造を分子鎖(リンカー)で結合してキメラ分子とした。このキメラ分子：AUTACを用いて、種々のタンパク質やミトコンドリアの分解を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーの機構解明についてノーベル賞が与えられた現在でも理解が難しい問題が残されている。そのひとつは、分解する相手(基質)を選択する機構である。私たちは、分解選択性の目印として働くタンパク質修飾を自ら見出して、これを疾患原因となるタンパク質等に自在に導入する手法：AUTAC法を開発した。特定の基質を分解する医薬品につながると期待される。オートファジー機構を用いる基質選択的分解剤は、AUTACが世界初の例であり学術的な意義も高い。

研究成果の概要(英文)：The materials that make up our bodies need to be properly renewed. The accumulation of harmful substances has been pointed out to lead to disease when the life span of the cell itself is long, such as in the case of nerve cells. Therefore, we studied a method to remove disease-causing substances in cells by using autophagy, a major degradation mechanism in cells. To select disease-causing substances, appropriate compounds called targeting ligands were selected, and the degradation tag structure, which was found separately, was joined with a molecular chain (linker) to form a chimeric molecule. Using this chimeric molecule: AUTAC, we achieved degradation of various proteins and mitochondria.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

近接化を誘導する低分子: 細胞内のタンパク質は、互いの動的な結合 / 解離を介して生命機能を制御している。二種のタンパク質の近接化を人為的に制御するため、二種のリガンドをリンカーを使って結合させたキメラ分子が用いられている。

細胞内分解系とタンパク質の近接化を誘導するキメラ分子: 細胞内の物質と分解系を人為的に近接させると、その分解効率を人為的に促進することができる。創薬の分野で大きな注目を集めている新技术 PROTACs は、ユビキチン化酵素と標的タンパク質との近接化をもたらすキメラ分子である。ユビキチン化を受けた標的タンパク質は、プロテアソームにより選択的分解を受ける。PROTACs により特定の標的タンパク質の細胞内濃度を低下させることができるが、これは mRNA の分解を行う RNAi などタンパク質ノックダウン技術と類似の効果と言える。PROTACs のように化合物を使ってノックダウンを達成する医薬品の実用化が期待される。

オートファジーと疾患: オートファジーは物質分解を通じて細胞内恒常性の維持や疾患抑制を担う。プロテアソームが基本的にタンパク質専用、特に可溶性タンパク質を分解する機構であることと対照的に、オートファジーは広範な基質を分解できる。タンパク質凝集体、細胞小器官、病原体などが基質になる。従って、オートファジーを活用するキメラ分子を作成できれば、PROTACs の魅力をさらに拡大させることができる。

オートファジー誘導剤は、これまでに数多く知られている。これらは、細胞内の基質の非選択的分解を促進する。特定の基質だけを分解する化合物は、研究開始時点では知られていなかった。

オートファジーに関わる因子はユビキチン・プロテアソーム系よりも多く複雑である: ユビキチン・プロテアソーム系では、基質とユビキチン化酵素の近接化が基質分解に直結する。キメラ分子の設計は比較的容易である。これに対して、オートファジーによる基質分解では少なくとも 100 種類のタンパク質が同時に協調して働く必要がある。化合物による近接化誘導において、数多くのオートファジー関連分子群のいずれを狙うべきかという知見が乏しい。

タンパク質の S-グアニル化: 研究代表者は、共同研究によりタンパク質の新規翻訳後修飾である S-グアニル化を発見した (2007 年)。また、2013 年には、選択的オートファジーによる細胞内感染細菌の排除機構を研究し、細菌周囲のグアニル化が排除の初期段階に関与することを見出した。この修飾を抑制すると菌の排除が遅延することから、排除を促進する目印として機能すると考えられた。

選択的オートファジーの機構は基質ごとに異なる点を含む。したがって、やや大胆な仮説と言えるが、このグアニル化を利用して細菌以外の基質を分解する可能性に興味もたれる。

2. 研究の目的

オートファジー機構を用いて、細胞内の特定の基質 (標的) を選択的に分解する手法 : AUTAC の確立を目指した。

3. 研究の方法

分子デザイン: PROTACs の例を参考にして、標的化リガンド、リンカー、分解タグからなるキメラ分子構造を採用した。ここで、分解タグが本研究のユニークネスの中心となる。S-グアニル化を分解タグ設計の基礎にした。細胞内に存在するグアニル化は、cGMP 構造を含むため電荷をもち、細胞外から投与する医薬品としての利用を考えると膜透過性が低いと予想される。そこで、グアニン誘導体のなかから医薬にふさわしい物性を持つタグを選抜した。

標的化リガンドは、分解を狙う基質ごとに取得する必要があるが、本研究の実施期間や予算を鑑みて、できる限り既知の物質を活用することにした。PROTACs の標的化リガンドとして報告がある化合物も積極的に採用した。

ミトコンドリア関連疾患: ミトコンドリアは、ATP 産生にとどまらず、細胞死、炎症など様々な現象に関わる重要な細胞小器官である。ミトコンドリアは、マイトファジーと呼ばれる選択的オートファジーによって分解されることが知られているが、マイトファジーを誘導する化合物は見出されていなかった。グアニル化をミトコンドリア表面に導入する AUTAC を設計するため、ミトコンドリア外膜上のタンパク質 : TSPO に結合する標的化リガンドを用いることとした。

ミトコンドリア機能低下を示す疾患関連モデルとして、ダウン症由来線維芽細胞である Detroit 532, 539 細胞を用いた。

4. 研究成果

AUTAC 化合物の合成：

方法欄で述べた分子デザインに基づき各種の AUTAC 化合物の合成をおこなった。2019 年に論文発表を行った化合物を第一世代の AUTAC 化合物とすると、第二世代にあたる高活性な誘導体も得られてきている。

ミトコンドリア分解の研究

ミトコンドリア外膜表面に結合する AUTAC 化合物を用いて、マイトファジー誘導を評価した。マイトファジー（分解）と同時に、ミトコンドリア生合成が起きることから、単純にミトコンドリア局在タンパク質の減少をマイトファジー誘導と結論づけることができない。そこで、ミトコンドリアがオートファジーの結果として酸性環境（オートリソソーム）に移行するところを、pH 感受性蛍光タンパク質を使って可視化した。また、AUTAC を投与する前に存在していたミトコンドリアタンパク質を蛍光標識し、その減少量からミトコンドリアのターンオーバーを可視化できた。

ミトコンドリアは、多くの培養細胞において互いに融合して長く紐状の構造をとる。この状態では、AUTAC で処理した場合にもマイトファジーが観測されないという結果が得られた。紐状のミトコンドリアは、通常のオートファゴソームの径よりもかなり大きいためであると解釈した。実際、ミトコンドリア断片化を誘導する試薬（CCCP）や、遺伝子ノックダウン（OPA1 KD）を行うと、上述のようにマイトファジーが観測できた。

ミトコンドリア断片化は、疾患との関係が複数報告されている。本研究の試料としてとして用意したダウン症由来線維芽細胞においても断片化が見られる。AUTAC を投与してマイトファジーを促進すると、ミトコンドリア形態、膜電位、ATP 産生が改善した。

研究期間の後半では、期間前半で用いたダウン症由来線維芽細胞に加えて、別の疾患に関係するヒト線維芽細胞を取り寄せ、その特性を解析した。この疾患においても、ミトコンドリア機能が低下することが知られており、AUTAC 化合物を投与すると膜電位の改善が見られた。予期せぬことに、培養を継続している過程で、この線維芽細胞の性質が大きく変化して増殖速度が低下し、調査研究の継続が困難になったため、繰越を行なって新たな細胞試料の入手を行い、検討を続けた。

また、化合物の活性向上を目指して、AUTAC の標的化リガンドの構造改変を続けたところ、AUTAC4 よりも優れた特性を持つ新規 AUTAC を得ることできた。

AUTAC の作用機序解析研究

AUTAC の作用により、標的タンパク質はオートファゴソーム内部に隔離される。このとき、ユビキチン鎖との共局在が観測されることを、2019 年発表の論文で報告した。背景で紹介した別技術 PROTACs では、基質のユビキチン化が鍵となることが知られている。そこで、AUTAC 論文の発表後には、多くの研究者から機構的な類似性について質問を受けた。

この問題を理解するには、AUTAC の分解タグを認識する機構を理解すればよい。認識機構が判明すれば、タグと認識タンパク質とのドッキング解析などにより、合理的な構造改良も可能になるだろう。今回の研究期間内に最終的な結論を得ることはできなかったが、PROTACs のように「ユビキチン化酵素と基質の近接化」を介しているわけではないという示唆を得ている。研究期間終了後も解析を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Daiki Takahashi, Hirokazu Arimoto	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） 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 -
1. 著者名 高橋大輝、有本博一	4. 巻 38
2. 論文標題 オートファジー創薬の扉をひらくAUTACの開発と展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2331-2336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
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） 10.1016/j.molcel.2019.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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） 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 -

1. 著者名 高橋大輝、有本博一	4. 巻 272
2. 論文標題 マクロオートファジーの化合物による制御 - 創薬を目指して	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 958-963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hirokazu Arimoto
2. 発表標題 AUTACs: Autophagy-Mediated Degraders
3. 学会等名 3rd Annual Targeted Protein Degradation Summit 2020 (招待講演) (国際学会)
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 (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「AI型バイオエンジニアリング ~AIの関わる社会進化論~ 日本が世界で生き残るためのキーテクノロジーを考える」(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞内有害物質を取り除く創薬手法開発に成功
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2019/10/press20191011-01-autac.html>

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関