

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05839

研究課題名（和文）オートファジー抑制因子Rubiconとその阻害剤の機能発現機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanisms of Action of Rubicon, an Autophagy Inhibitor, and Its Inhibitor

研究代表者

上西 達也（Kaminishi, Tatsuya）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10391921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Rubicon相同ドメインに直接結合してオートファジー活性を上昇させる小分子化合物を同定し、両者の共結晶構造を解明したところ、化合物に帰属できる電子密度がRubicon表面のポケット内に認められた。現在は、当該のポケットを形成するRubiconのアミノ酸残基に変異を導入した細胞を用い、化合物の存在下におけるオートファジー活性を検証している。また、インタラクトーム解析で得られたCa²⁺結合膜タンパク質とRubiconが実際に共沈することを確認した。この相互作用には、RubiconのC末端の比較的広い領域、Ca²⁺結合膜タンパク質の細胞質領域のC末端ドメインが重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の疾患に対抗する手段としてオートファジー活性の増進が期待される中で、Rubiconは哺乳類のオートファジーを負に制御する数少ない因子であり、その機能を阻害する薬剤開発の絶好のターゲットである。実際に、Rubiconの発現上昇によるオートファジー機能の低下が肝障害を引き起こすことや、加齢に伴い増加するRubiconを抑えるとオートファジーが活発化し、モデル生物の老化現象が改善するだけでなく寿命が伸びることが明らかになってきている。したがって、本研究で得られたRubiconを標的としてオートファジー促進効果を持つ小分子化合物は、世界に先駆けた薬剤の開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：A small molecule compound has been identified that directly binds to the Rubicon homology domain and increases autophagy activity. The mode of binding and mechanism of action are currently being investigated. Furthermore, it has been confirmed that Rubicon co-immunoprecipitates with a Ca²⁺-binding membrane protein that was obtained by interactome analysis. Our findings indicate that a relatively broad region at the C-terminus of Rubicon and the C-terminal domain of the Ca²⁺-binding membrane protein's cytoplasmic region are crucial for this interaction.

研究分野：構造生物学

キーワード：オートファジー Rubicon 小分子化合物 X線結晶構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物に共通して見られるオートファジーは、細胞が飢餓時にエネルギー源確保のために行う自己消化作用だけでなく、通常時に不要物を分解する自己浄化作用としても働く。近年の研究で、高等生物の数少ないオートファジー抑制因子である Rubicon の働きを抑えると、肝障害や老化現象を軽減できる可能性が示されている。我々は Rubicon と相互作用する化合物を理化学研究所の長田研究室との共同研究で同定し、この小分子がオートファジーを促進することを見出した。ただしこの化合物がどのようにしてその効力を発揮しているかは不明であった。また、Rubicon がオートファジーを負に制御しているメカニズムや、その立体構造も殆ど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

そこで Rubicon の機能発現機構ならびにその阻害剤の作用機序を、X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡法により明らかにすることを目指して本研究を開始した。

3. 研究の方法

< 化合物架橋ビーズを用いた共沈実験 >

ヒト Rubicon は全長で 972 のアミノ酸残基からなり、N 末端の RUN ドメインとそれに続く Ser-rich 領域、coiled-coil 領域、さらに C 末端の Cys-rich 領域を含む Rubicon 相同ドメインなどを有する (Nat Cell Biol. 2009, 11, 385-96)。しかし構造予測プログラムによると、N 末端と C 末端を除く部分はほとんど一定の構造を取らないことが強く示唆されている。Rubicon のどの領域がこの小分子化合物との相互作用に必要なのかを明らかにするために、全長の Rubicon の他にも一部を欠損させた複数の変異体にエピトプタグを導入し、それぞれが化合物を架橋したセファロースビーズと結合するかどうかを調べた。具体的には、作製したコンストラクトをヒト培養細胞で一過性に発現させ、その破碎液に混和したビーズと共沈してくる変異体タンパク質を SDS-PAGE とウェスタンブロットティングにより定量した。

< tfLC3 アッセイによるオートファジー活性測定 >

2 種類の蛍光タンパク質 EGFP と mRFP を融合させた LC3(tandem fluorescent-tagged LC3: tfLC3)を安定発現する細胞でオートファジーが誘導されると、この tfLC3 がリソソームに運ばれた際に EGFP の蛍光が減少するのに対して mRFP の蛍光は影響を受けないことを利用して、オートファジー活性を測定することができる。具体的には、横河電機の共焦点定量イメージサイトメーターを用いて細胞からの EGFP と mRFP の蛍光シグナルを定量し、その比(EGFP/mRFP)がコントロールとの比較で減少しているかどうか、すなわちオートファジー活性が上昇しているかどうか、を AutoPhagyGO 社との共同研究で調べた。

4. 研究成果

Rubicon の全長および C 末端の Rubicon 相同ドメインがコントロールピーズよりも化合物架橋ピーズと共沈してくる感触を得ていたが、ピーズ自体に非特異的に吸着しやすい性質を持っており、バックグラウンドが高く再現性に乏しかった。また、この研究の端緒となった化合物アレイを用いたスクリーニングでは、赤色蛍光タンパク質と融合させた Rubicon を発現するヒト培養細胞の破碎液を用いたが、もし化合物が Rubicon と直接には結合せずに細胞内の他の因子を介して相互作用していたとしても陽性と判定される可能性があり、その場合にはこの新たな因子を突き止めないかぎり両者の複合体を標的とするのが困難となる。

そこで出発点に立ち帰り、Rubicon に直接に結合する化合物の探索に着手した。具体的には、東京大学の濡木研究室との共同研究で高度に精製した Rubicon の全長および Rubicon 相同ドメインを、大幅にアップデートされた上述の化合物アレイによるスクリーニングに使用したところ、Rubicon と直接に結合すると考えられる 100 以上の候補を得ることができた。次に現所属研究室で開発された tfLC3 アッセイを用いて、ヒト培養細胞のオートファジー活性を上昇させる少数の化合物に絞り込んだ。さらに、高度に精製した Rubicon 相同ドメインと候補小分子の共結晶化を濡木研究室との共同研究で試みたところ、そのうちの 1 つとの複合体の結晶構造を得ることに成功した。Rubicon のアミノ酸残基では説明できない特徴的な電子密度がポケットに観測されており、これだけで化合物の構造式全体を過不足なく説明できるかどうか解析を続けているが、少なくとも環状の炭素骨格がはまり込んでいるのは確認できている。現在はこの結合が薬理的に意味のあるものかどうかを検証するために、当該のポケットを形成する Rubicon のアミノ酸残基に変異を導入した細胞を用い、化合物の存在下におけるオートファジー活性の測定を試みている。すなわち、野生型の細胞で見られた活性の上昇が緩和・解消されていれば、この化合物は結晶構造で観察された様式で Rubicon に結合し、そのオートファジー抑制機能を阻害するものと考えられる。また今後は、Rubicon 全長についても他の候補小分子との複合体を同様に形成させ、クライオ電子顕微鏡を用いて立体構造解析を進め、化合物の結合部位とその作用機序、また Rubicon そのもののオートファジー抑制機能の作用機序を解明する予定である。

一方、Rubicon との相互作用が既に報告されているタンパク質と上記のドメイン欠損変異体をヒト培養細胞で一過性に発現させ、両者が共沈する組み合わせ・条件を検討したところ、14-3-3 タンパク質および NEMO については結合に必要なとされているドメインに依存した相互作用を確認できた。さらに、現所属研究室で実施されたインタラクトーム解析で複数の新規 Rubicon 相互作用因子の候補を得ており、その中の Ca²⁺結合膜タンパク質との相互作用を調べたところ、両者が共沈することを見出した。さらにこの相互作用に必要な Rubicon のドメインを探索したところ、C 末端の比較的広い領域が必須であることが判明した。さらに Ca²⁺結合膜タンパク質については細胞質領域の C 末端ドメインが Rubicon との相互作用に重要であることが示唆された。また蛍光顕微鏡や近接ライゲーションアッセイにより、両者が細胞内で共局在することも確認している。今後は、両者の相互作用に必要なドメインの間で安定な複合体を形成させて構造解析を行う予定である。またそれぞれの遺伝子をノックダウン・ノックアウトした細胞に、相互作用ができない変異型コンストラクトを発現させることにより、両者の相互作用がオートファジーに及ぼす影響を調べる。

残念ながら当初の目的は未達に終わってしまったが、共同研究者の多大な協力のもと軌道修正することができ、近い将来に漕ぎ着けることができる目処がついたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yanagawa Kyosuke, Kuma Akiko, Hamasaki Maho, Kita Shunbun, Yamamuro Tadashi, Nishino Kohei, Nakamura Shuhei, Omori Hiroko, Kaminishi Tatsuya, Shimomura Iichiro, Sakata Yasushi, Yoshimori Tamotsu	4. 巻 -
2. 論文標題 The Rubicon-WIP1 axis regulates exosome biogenesis during aging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.05.08.593233	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fangze Duan, Keisuke Tabata, Ryosuke Kawagoe, Tatsuya Kaminishi, Shuhei Nakamura, Maho Hamasaki, Tamotsu Yoshimori
2. 発表標題 Rubicon may regulate autophagy through Ca ²⁺ with myoferlin
3. 学会等名 日本細胞生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------