

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料 〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05029
研究課題名：脂質過酸化が関与するネクローシスの分子機構解明への化学的挑戦
研究代表者氏名（ローマ字）：袖岡 幹子（SODEOKA Mikiko）
所属研究機関・部局・職：国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員
研究者番号：60192142

研究の概要：

我々はこれまでに低分子化合物の標的タンパク質やその相互作用タンパク質の同定を可能にする独自技術として、コンパクトな蛍光団であるNBDを利用したTurn-ON 蛍光アフィニティラベル化法を開発してきた。本研究ではこのNBD法をはじめとする化学的な解析手法を駆使して、IM化合物などの細胞死制御化合物の標的タンパク質を同定し、脂質過酸化が関与するネクローシスの制御機構を明らかにする。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞死、ネクローシス、フェルトーシス、ネトーシス、脂質過酸化、アフィニティラベリング、イメージング

1．研究開始当初の背景

細胞死は生命現象の中でも最も根幹的な事象であり、そのしくみの解明は生命科学の最も重要な命題のひとつであると言っても過言ではない。その制御異常は癌、自己免疫疾患、神経変性疾患など様々な疾病をひきおこす。アポトーシス（自死）という積極的な細胞死形態の存在が明らかになった1980年代以降、細胞死研究が活発となり、アポトーシスに関する細胞内情報伝達機構が解明された。一方、細胞の膨化や破裂を伴うネクローシス（壊死）と呼ばれる細胞死は、強い傷害により起こる受動的な細胞死であると考えられ、その制御機構は研究対象とはされてこなかった。しかし2000年代に入り、制御機構をもつ様々なタイプのネクローシスが見出され、中でも脂質過酸化が関与するネクローシスは、様々な疾患との関連から注目を集めている。

2．研究の目的

我々は、酸化ストレスによって誘導されるネクローシスを選択的に抑制するIM化合物を開発し（*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3114）、心筋梗塞モデルにおいて優れた保護効果を示すことを明らかにした（*ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 182）。またIM化合物は、ネクローシスの中でも、脂質過酸化が関与するという共通点をもつフェルトーシスとネトーシスと呼ばれる2つのタイプの細胞死のみを抑制し、その他の細胞死は抑制しないこともわかった（*ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1272）。フェルトーシスは細胞内の鉄が関与して脂質過酸化が起こる細胞死として知られ、またネトーシスは好中球が自らのDNAなどを含むNETs（Neutrophil Extracellular Traps）と呼ばれる網を放出して細菌をとらえる特徴的な細胞死である。そこで本研究では、IM化合物などの低分子細胞死制御化合物をプローブとして用い、これら脂質過酸化が関与するネクローシスの制御機構の解明をめざす。

3．研究の方法

我々は、低分子化合物の結合タンパク質の蛍光標識化・蛍光イメージングの手法として、比較的小さな蛍光団であるニトロベンゾキサジアゾール（NBD）を利用したTurn-ON 蛍光アフィニティラベリングという独自の方法を開発し（*Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1021）、標的タンパク質同定に応用している（*Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 475）。すなわち、生物活性化合物にエーテル結合を介してNBDを結合させたO-NBD（無蛍光）はアミノ基との反応性を有し、優れたアフィニティラベル化プローブとなる。O-NBD プローブは、標的タンパク質に結合すると、近接効果により近傍のリジン残基による選択的な置換反応を受け、N-NBDとなり蛍光がONになる。また、光反応性基と異なり、O-NBDはリジン残基と出会うまで分解しないことから、標的タンパク質や結合部位の同定だけでなく、適切な導入位置とリンカーを選べば、タンパク質複合体の解析も可能となる。さらに我々はアルキンタグとラマン分光法を用いて、低分子化合物の細胞内局在や標的タンパク質を解析する手法も開発している（*J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20681; *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13901）。

これまでの研究から、IM化合物の標的が膜タンパク質複合体である可能性が示唆されている。そこでIM化合物の標的タンパク質複合体をNBD法で解析し、その分子実体を明らかにすることにより、フェルトーシスとネトーシスに共通する制御機構を解明する。また、IM化合物以外にもフェルトーシスやネトーシスを誘導ないしは阻害する細胞死制御化合物を見出し、これら化合物の構造展開・プローブ化を行った上で、NBD法などの化学的手法を駆使してその作用機序解明を行うことにより、フェルトーシスやネトーシスにユニークな制御機構にも迫る。

4. これまでの成果

IM 化合物に関しては、すでに得られている様々な構造活性相関を元に *O*-NBD プローブの設計と合成を進めた。その結果、細胞死抑制活性を維持した誘導体を得ることができた。さらに得られた *O*-NBD プローブを用いて生細胞イメージングを行い、細胞内で特定のオルガネラが蛍光標識されることを見出した。そこで蛍光検出を元にタンパク質の解析を進め、蛍光標識されたタンパク質の同定にも成功した。また、IM 化合物を用いた活性評価系で、フェロトーシスを選択的に誘導できる化合物を見出した。

ネトーシスに関しては、以前より見出していたネトーシス促進剤である diaminodiphenyl sulfone (DDS) の構造展開を行って活性を 10 倍以上向上させると共に、活性を維持したまま *O*-NBD を導入したプローブの開発にも成功した。さらに本 *O*-NBD プローブを用いて蛍光標識実験を行い、複数の標的タンパク質候補を同定した。

さらにマウス好中球またはヒト細胞株を用いたネトーシス評価系を構築し、様々な化合物ライブラリーからスクリーニングを行った。その結果、複数のネトーシス阻害剤を見出すことに成功した。そのうちの一つに関しては、リソソーム中に存在するミエロペルオキシダーゼ (MPO) を標的とすることを明らかにし、MPO がネトーシスにおける脂質過酸化物の生成に重要な役割を果たすことも示した。この過程で、CRISPR/Cas9 で目的のタンパク質を効率よくノックアウトする実験系および、レンチウイルスを用いてノックアウトしたタンパク質を再発現させる実験系も確立した。さらに生成した脂質酸化物が核膜に直接作用して核の膨潤を引き起こすことも明らかにした (*Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 718586)。

5. 今後の計画

IM 化合物に関しては同定した標的タンパク質候補に関して、CRISPR/Cas9 を用いてノックアウト実験を行い、細胞死誘導および IM 化合物の活性に及ぼす影響を調べ、細胞死に重要な標的タンパク質を同定する。同定された標的タンパク質に関しては、Flag タグなどを導入したタンパク質を再発現させ、タグに対する免疫沈降を行って相互作用タンパク質の同定を狙う。さらに、NBD と IM 化合物をつなぐリンカーの長さを種々検討し、生細胞中で標的タンパク質の相互作用タンパク質を標識し、同定することも計画する。以上の検討でタンパク質複合体の同定に成功した後は、細胞死刺激下での動的なタンパク質複合体の変化を NBD 標識により解析することも目指す。さらにフェロトーシス誘導剤に関しても、NBD 法などのアフィニティラベリングの手法を活用し標的タンパク質の同定を進め、IM 化合物とは異なる方向から本ネクローシスに迫る。

ネトーシスに関しては、ネトーシス促進剤 DDS の標的タンパク質候補のノックアウト実験および解析を進める。さらにネトーシス阻害剤に関しては、その標的タンパク質の同定を目指して構造展開および NBD プローブ化を進め、NBD を用いた解析を進める。加えてネトーシス阻害剤に関しては、動物実験に適用可能な誘導体の開発も進め、虚血再灌流障害や炎症性疾患などの疾患モデルで活性を評価し、*in vivo* でのネトーシスの役割を明らかにするとともに、医薬リードとしての応用も検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ケミカルバイオロジーを用いた細胞死の解析, 閼閼孝介, 袖岡幹子, 医学のあゆみ「細胞死のすべて—そのメカニズムと, 生命現象・疾患との関わり」 540-549 (2022)
医歯薬出版 ISBN: 9784006028305
- ネトーシスの誘導機構とその感染症における役割, 四元聡志, 田中正人, 医学のあゆみ「細胞死のすべて—そのメカニズムと, 生命現象・疾患との関わり」 354-358 (2022)
医歯薬出版 ISBN: 9784006028305
- Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation. T. Tokuhira, A. Ishikawa, H. Sato, S. Takita, A. Yoshikawa, R. Anzai, S. Sato, R. Aoyagi, M. Arita, T. Shibuya, Y. Aratani, S. Shimizu, M. Tanaka*, S. Yotsumoto* *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 718586-718586 (2021).
- Deuteration of terminal alkynes realizes simultaneous live cell Raman imaging of similar alkyne-tagged biomolecule. S. Egoshi, K. Dodo*, K. Ohgane, M. Sodeoka*, *Org. Biomol. Chem.*, **19**, 8232–8236 (2021).
- 酸化ストレス誘導性ネクローシスの抑制剤開発, 閼閼孝介, 袖岡幹子, 月刊「細胞」 2021 年 10 月臨時増刊号「新規細胞死機構が制御する生体応答」 53(12), 743-746 (2021)
ニューサイエンス社 ISSN: 13467557

7. ホームページ等

<http://soc.riken.jp>

https://www.riken.jp/research/labs/chief/synth_org_chem/

https://www.riken.jp/research/labs/csrs/catal_integr_res/index.html