

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26251020

研究課題名(和文)オートファジーによる神経変性疾患抑制の分子機構解明と創薬に向けた研究

研究課題名(英文) Study on molecular machinery of suppression of neurodegeneration by autophagy and drug discovery research

研究代表者

吉森 保 (Yoshimori, Tamotsu)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：60191649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の分解システムであるオートファジーは、パーキンソン病等の神経変性疾患の原因となる凝集しやすいタンパク質を分解します。私達は、Rubiconというオートファジーを抑制するタンパク質を減らすとそれらのタンパク質がより分解されることを発見しました。また、オートファジーを活性化しそのようなタンパク質の分解を促進する薬剤の候補となる低分子化合物を見つけることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患は、超高齢社会を迎える我が国の重要課題です。それを抑える細胞の仕組みの一端を明らかにできたこと、そしてその結果治療の標的となりうるタンパク質が判ったことは学術的にも社会的にも大きな意義があります。さらにこの研究で発見したオートファジーを促進する化合物は、将来これらの病気の治療薬の開発に結びつくことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：The intracellular degradation system, autophagy is known to degrade aggregate-prone proteins causing neurodegeneration including Parkinson disease. We found that suppression of Rubicon, a negative regulator of autophagy enhances these proteins. In addition, we identified several Low molecular weight compounds, which are candidates for activating autophagy thereby promote degradation of the proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内大規模分解システム・オートファジーが、易凝集性たんぱく質を分解し神経変性疾患を抑制することが明らかになってきた。しかし、その分子メカニズムはほとんど分かっていない。一方、神経変性疾患の治療戦略としてオートファジー亢進薬投与が考えられているが、オートファジーの強制的亢進の生体への影響に関する報告は無く、オートファジーに特異的に作用する低分子化合物は知られていない状況である。

2. 研究の目的

本研究は、オートファジーによる易凝集性たんぱく質分解の分子機構の解明を進めると同時に、オートファジーを抑制する制御たんぱく質の KO マウスを用いたオートファジー亢進の生体への影響検討と、オートファジーを特異的に亢進させる低分子化合物や遺伝子の探索を行い、新たな治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) オートファジーが易凝集性たんぱく質を除去するメカニズムについて、まずハンチントン舞蹈病等の神経変性疾患(ポリグルタミン病)の原因となる異常伸張ポリグルタミン鎖含有タンパク質(PolyQ)をモデルに主に培養哺乳類細胞を用いて解析を進める。
- (2) オートファジーの欠損の影響についてはオートファジーに必須の遺伝子群 ATG の KO マウスを用いた研究が盛んに行われる一方で、オートファジーの持続的亢進の強制が生体に何をもたらすかは知られていない。応募者は、オートファジーを抑制的に制御する新規たんぱく質 Rubicon を同定し、その KO マウスを作製、オートファジーが恒常的に亢進していることを確認した。このマウスを用いて、生体、特に中枢神経におけるオートファジーの恒常的亢進の影響を *in vivo* で検討する。
- (3) オートファジー促進剤として知られているラパマイシンやラパログは、栄養条件に反応してオートファジーを含む様々な細胞機能を制御するたんぱく質キナーゼ mTOR の阻害によりオートファジーを活性化する。mTOR は、オートファジー以外にもたんぱく質合成など重要な細胞機能を多数支配しており、その阻害は広範な影響をもたらす。しかし、オートファジーに特異的な亢進薬はこれまでにほとんど知られていない。本研究の期間内に、より特異的で効果の高い薬剤開発の足がかりとなる、有望な低分子化合物の同定を行う。また、創薬の標的となり得るオートファジーによる神経変性疾患抑制に働く因子の網羅的探索を行う。

4. 研究成果

- (1) 当初の計画では培養哺乳類細胞を用いて行う予定であったが、進展がはかばかしくなく途中から線虫を用いることにした。まず線虫においても Rubicon ホモログが存在することを見出した。そこで Rubicon のノックダウンを行い、線虫における神経変性疾患モデルである延長ポリグルタミン含有タンパク質の凝集塊形成を検討したところ、Rubicon ノックダウンによって凝集塊形成が抑制された。さらにパーキンソン病の原因となる シヌクレインを発現した線虫で、Rubicon KD によって凝集塊形成の改善を示した。またブレリミナリだが、Rubicon を KD すると凝集塊形成による運動機能障害が改善する傾向があることを見出した。
- (2) 中枢神経特異的 Rubicon KO マウスを作成し、神経変性疾患の病態が改善されるか検討した。具体的には シヌクレイン線維をマウスの脳内に直接注入し、10ヶ月後に脳切片を染色し シヌクレイン凝集塊の組織内伝播を定量化した。その結果、中枢神経特異的 Rubicon KO マウスはコントロールマウスに比べ有意に凝集塊伝播が抑制されていることが判明した。また全身において Rubicon を KO したマウスではある組織の形成不全が起こることが明らかになった。オートファジーの恒常的亢進が常に beneficial とは限らないことを示しており、治療戦略上極めて重要な情報である。
- (3) 神経変性疾患抑制を目的とした低分子化合物・内在性タンパク質の探索によりオートファジー特異性の高い亢進剤を同定するため、まず S/N 比の高い安定したオートファジーのアッセイ系を構築した。それを用いて低分子化合物のスクリーニングを実施し、複数の候補を得た。それらの候補の解析を行い、そのうちのひとつが飢餓誘導性の非選択的オートファジーには影響しないが、病原体やタンパク質凝集塊に対する選択的オートファジーを特異的に促進することを見出した。この化合物を培養液に加えることで、ポリグルタミン凝集塊形成が顕著に抑制された。この化合物の効果は mTOR 経路を介さない。非選択的オートファジーに影響せず mTOR 経路を介さないことで、より副作用の少ない薬剤を開発できる可能性がある。さらに、神経変性疾患治療法開発の標的候補となるオートファジー制御タンパク質を探索するため、プロテオミクス解析と siRNA スクリーニングを実施し複数の候補タンパク質を同定した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Lystad AH, Carlsson SR, de la Ballina LR, Kauffman KJ, Nag S, Yoshimori T, Melia TJ, Simonsen A, Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B

lipidation in autophagy-related processes, *Nat. Cell. Biol.*, 査読有, 21 巻, 2019, 372-383

DOI: 10.1038/s41556-019-0274-9

Nakamura S, Oba M, Suzuki M, Takahashi A, Yamamuro T, Fujiwara M, Ikenaka K, Minami S, Tabata N, Yamamoto K, Kubo S, Tokumura A, Akamatsu K, Miyazaki Y, Kawabata T, Hamasaki M, Fukui K, Sango K, Watanabe Y, Takabatake Y, Kitajima TS, Okada Y, Mochizuki H, Isaka Y, Antebi A, Yoshimori T, Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging, *Nat. Commun.*, 査読有, 10 巻, 2019, 847

DOI: 10.1038/s41467-019-08729-6

Chang C, Young LN, Morris KL, von Buelow S, Schoeneberg J, Yamamoto-Imoto H, Oe Y, Yamamoto K, Nakamura S, Stjepanovic G, Hummer G, Yoshimori T, Hurlley JH, Bidirectional Control of Autophagy by BECN1 BARA Domain Dynamics, *Mol. Cell.*, 査読有, 73 巻, 2018, 339-353

DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.035

Tan JM, Mellouk N, Osborne SE, Ammendolia DA, Dyer DN, Li R, Brunen D, van Rijn JM, Huang J, Czuczman MA, Cemna MA, Won AM, Yip CM, Xavier RJ, MacDuff DA, Reggiori F, Debnath J, Yoshimori T, Kim PK, Fairn GD, Coyaud E, Raught B, Muise AM, Higgins DE, Brumell JH, An ATG16L1-dependent pathway promotes plasma membrane repair and limits *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread, *Nat. Microbiol.*, 査読有, 3 巻, 2018, 1472-1485

DOI: 10.1038/s41564-018-0293-5

Mori H, Fukuhara T, Ono C, Tamura T, Sato A, Fauzyah Y, Wada M, Okamoto T, Noda T, Yoshimori T, Matsuura Y, Induction of selective autophagy in cells replicating hepatitis C virus genome, *J Gen Virol.*, 査読有, 99 巻, 2018, 1643-1657

DOI: 10.1099/jgv.0.001161

Lee JH, Rao MV, Yang DS, Stavrides P, Im E, Pensalfini A, Huo C, Sarkar P, Yoshimori T, Nixon RA, Transgenic expression of a ratiometric autophagy probe specifically in neurons enables the interrogation of brain autophagy in vivo, *Autophagy*, 査読有, 15 巻, 2018, 543-557

DOI: 10.1080/15548627.2018.1528812

Aoki A, Nakashima A, Kusabiraki T, Ono Y, Yoshino O, Muto M, Kumasawa K, Yoshimori T, Ikawa M, Saito S, Trophoblast-Specific Conditional Atg7 Knockout Mice Develop Gestational Hypertension, *Am J Pathol.*, 査読有, 188 巻, 2018, 2474-2486

DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.07.021

Itoh K, Adachi Y, Yamada T, Suzuki TL, Otomo T, McBride HM, Yoshimori T, Iijima M, Sesaki H, A brain-enriched Drp1 isoform associates with lysosomes, late endosomes and the plasma membrane, *J Biol Chem.*, 査読有, 293 巻, 2018, 11809-11822

DOI: 10.1074/jbc.RA117.001253

Hao F, Itoh T, Morita E, Shirahama-Noda K, Yoshimori T, Noda T, The PtdIns3-phosphatase MTMR3 interacts with mTORC1 and suppresses its activity, *FEBS Letters*, 査読有, 590 巻, 2015, 161-173

DOI: 10.1002/1873-3468.12048

Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y, Watada H, Human IAPP-induced pancreatic cell toxicity and its regulation by autophagy, *J Clin Invest.*, 査読有, 124 巻, 2014, 3634-3644

DOI: 10.1172/JCI69866

Kira S, Tabata K, Shirahama-Noda K, Nozoe A, Yoshimori T, Noda T, Reciprocal conversion of Gtr1 and Gtr2 nucleotide-binding states by Npr2-Npr3 inactivates TORC1 and induces autophagy, *Autophagy*, 査読有, 10 巻, 2014, 1565-1578

DOI: 10.4161/auto.29397

Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, Fujita N, Saitoh T, Akira S, Yoshimori T, Sibley LD, Hwang S, Virgin HW, The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy, *Immunity*, 査読有, 40 巻, 2014, 924-935

DOI: 10.1016/j.immuni.2014.05.006

Chen X, Khambu B, Zhang H, Gao W, Li M, Chen X, Yoshimori T, Yin XM, Autophagy induced by calcium phosphate precipitates targets damaged endosomes., *J Biol Chem.*, 査読有, 289 巻, 2014, 11162-11174

DOI: 10.1074/jbc.M113.531855

〔学会発表〕（計50件）

吉森 保, Suppression of Autophagy by Rubicon Is Signature of Aging, Keystone Symposia

- on Molecular and Cellular Biology "Autophagy: From Model Systems to Therapeutic Opportunities" (招待講演) (国際学会)、2019
- 吉森 保、Autophagy: Its molecular machinery and implications in diseases、The 1st OIST-OU Joint Symposium "Cell Biology and Immunology", (招待講演) (国際学会)、2019
- 吉森 保、オートファジー：疾患に対抗し寿命を延ばす細胞の守護者、第1回 医学系研究科-産業科学研究所懇話会 (招待講演)、2019
- 吉森 保、オートファジーとは何か：ノーベル賞の大隅先生と挑んだ21年、安田記念医学財団創立30周年記念講演会 (招待講演)、2018
- 吉森 保、組織によってオートファジーの能力や役割は異なる、第11回オートファジー研究会 (招待講演)、2018
- 吉森 保、オートファジーによる疾患制御の分子機構、第40回北海等大学獣医学学術交流基金群講演会 (招待講演)、2018
- 吉森 保、A E3 Ligase in Lysophagy and Xenophagy in Endothelial Cells、HFSP meeting 2018 in Osaka~The physical basis of autophagosome biogenesis~ (招待講演) (国際学会)、2018
- 吉森 保、21 Years of Autophagy: towards Understanding the Intracellular Degradation System Fighting against Diseases and Aging、26th Conference of the European Cell Death Organization "Cell death in disease: from small molecules to translational medicine" (招待講演) (国際学会)、2018
- 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：疾患と老化に対抗する細胞恒常性維持機構、第16回高付加価値食品開発のためのフォーラム (シーズとニーズの新たな出会い) (招待講演)、2018
- 吉森 保、22 Years of Autophagy: towards Understanding the Cellular Self-Degradation System Fighting against Diseases and Aging、Keynote lecture in 2nd Nordic Autophagy Society Conference (招待講演) (国際学会)、2018
- 吉森 保、Autophagy and its Relevance to Movement Disorders、MDS Basic Science Summer School (招待講演) (国際学会)、2018
- 吉森 保、オートファジー：疾患と老化に対抗する細胞の恒常性維持機構、第2回 Aging Forum (招待講演)、2018
- 吉森 保、オートファジー：疾患に対抗し寿命を延長する細胞内分解システム、第34回創薬セミナー (招待講演)、2018
- 吉森 保、疾患と老化に対抗するオートファジー、新潟大学教育研究特別シンポジウム (招待講演)、2018
- 吉森 保、オートファジーによる疾患抑制の分子機構、千里ライフサイエンスセミナーM2: オートファジーと疾患 (招待講演)、2018
- 吉森 保、オートファジー：感染症などの疾患に対抗する細胞の守護者、第92回日本感染症学会学術講演会・第66回日本化学療法学会総会 (招待講演)、2018
- 吉森 保、Dissection of Molecular Mechanisms in Lysophagy、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Selective Autophagy" (招待講演) (国際学会)、2018
- 吉森 保、Selective Autophagy and Diseases、Keynote Session in The Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development & Disease (招待講演) (国際学会)、2016
- 吉森 保、20 years of Autophagy: towards Understanding the Intracellular Self-Degradation System Fighting against Diseases、2016 International A3 Foresight Symposium on Autophagy (招待講演) (国際学会)、2016
- 吉森 保、Mechanistic Insights into Membrane Dynamics in Autophagy、FRIAS Black Forrest Winter Conference on Autophagic Membrane Trafficking and Dynamics in Ageing and Disease (招待講演) (国際学会)、2016
- ⑲ 吉森 保、Autophagy: The Intracellular Self-Degradation System Fighting against Disease、The 5th NIF Winter School on Advanced Immunology (招待講演) (国際学会)、2016
- ⑳ 吉森 保、Autophagy: The Intracellular Self-Degradation System Fighting against Diseases、Lorne Infection & Immunity Conference 2015 (招待講演)、2015
- ㉑ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：疾患に対抗する細胞内自己分解システム、第5回 MD 研究者養成コース四大学コンソーシアムリトリート (招待講演)、2015
- ㉒ 吉森 保、オートファジー：疾患に対抗する細胞内大規模分解系、第452回日本皮膚科学会大阪地方会・第22回小林浩記念講演 (招待講演)、2015
- ㉓ 吉森 保、オートファジーによる病態抑制のメカニズム、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) オリnpas(株)ランチョンセミナー (招待講演)、2015
- ㉔ 吉森 保、New Insights into Autophagy in Disease、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) 1S14: 科学研究費補助金 新学術領域研究「オ

- ートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで」共催シンポジウム Autophagy (招待講演) (国際学会)、2015
- ②⑦ 吉森 保、オートファジーの膜動態：分子機構と疾患との関わり、第9回オートファジー研究会・新学術領域研究「オートファジーの集学的研究：分子基盤から疾患まで」第3回班会議、セッション6 (分子機構・膜動態) (招待講演)、2015
- ②⑧ 吉森 保、Autophagy: Molecular Machinery and Role in Suppression of Diseases、The 14th CRG symposium: Cellular Machineries (招待講演) (国際学会)、2015
- ②⑨ 吉森 保、New Insights into Membrane Biogenesis and Targeting in Autophagy、EMBO Conference on Autophagy: Autophagy signaling and progression in health and disease (招待講演) (国際学会)、2015
- ③⑩ 吉森 保、疾患に対抗する細胞内大規模分解システム・オートファジー、第2回 GSK 皮膚免疫カンファレンス (招待講演) (国際学会)、2015
- ③① 吉森 保、Autophagy: The Intracellular Self-Degradation System Fighting against Diseases、The 21st Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy (招待講演) (国際学会)、2015
- ③② 吉森 保、Insights into Membrane Dynamics in Autophagy、The Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology (招待講演) (国際学会)、2015
- ③③ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：疾患に対抗する細胞内自己分解システム、第24回日本 Cell Death 学会学術集会 (招待講演)、2015
- ③④ 吉森 保、Autophagy: the cellular Guardian Sustaining Life、第67回日本細胞生物学会大会 大会長企画シンポジウム (招待講演) (国際学会)、2015
- ③⑤ 吉森 保、New Insights into Membrane Dynamics and Role of Autophagy、Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Autophagy (E6)” (招待講演) (国際学会)、2015
- ③⑥ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と病態生理、第118回日本小児科学会学術集会 (招待講演)、2015
- ③⑦ 吉森 保、Autophagy: Its Membrane Dynamics and Role in Suppression of Diseases、British Society for Cell Biology & British Society for Developmental Biology Joint Spring Meeting (招待講演) (国際学会)、2015
- ③⑧ 吉森 保、New Insights into Membrane Biogenesis and Targeting in Autophagy、The 7th International Symposium on Autophagy (招待講演)、2015
- ③⑨ 吉森 保、Lysophagy: Damaged Lysosomes Are Selectively Eliminated by Autophagy、Gordon Research Conference on Lysosomal Diseases (招待講演)、2015
- ④⑩ 吉森 保、New Insights into Membrane Biogenesis and Targeting in Autophagy、2014 Northeastern Asian Symposium on Autophagy (招待講演)、2014
- ④① 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と疾患との関わり、脳心血管抗加齢研究会 2014 併催：第4回 運動器抗加齢医学研究会 / アンチエイジングフェスタ 2014 (招待講演)、2014
- ④② 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と疾患との関わり、第41回日本臓器保存生物医学学会学術集会 (招待講演)、2014
- ④③ 吉森 保、オートファジーの膜動態：分子機構と疾患との関わり、第8回 オートファジー研究会、セッション5：分子機構と膜動態 (5) 生理・病態 (招待講演)、2014
- ④④ 吉森 保、オートファジーの膜動態の分子機構とその破綻による病態の解明、第87回日本生化学会大会 平成26年度 第9回柿内三郎記念賞受賞講演 (招待講演)、2014
- ④⑤ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と疾患との関わり、第3回 川島腎カンファレンス (招待講演)、2014
- ④⑥ 吉森 保、Insights into membrane dynamics and role of mammalian autophagy、The 38th Naito Conference on Molecule-based biological systems (招待講演)、2014
- ④⑦ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と疾患との関わり、第5回 Molecular Cardiovascular Conference キーノートレクチャー (招待講演)、2014
- ④⑧ 吉森 保、細胞の守護者オートファジー：分子機構と疾患との関わり、平成26年度 がん若手研究者ワークショップ (招待講演)、2014
- ④⑨ 吉森 保、オートファジーと疾患、第19回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (招待講演)、2014
- ⑤⑩ 吉森 保、18 years of Autophagy: 生命を支える細胞内大規模分解系の理解を目指して、第10回近畿先天代謝異常症研究会 (招待講演)、2014

〔図書〕(計1件)

吉森 保 他、南山堂、プログレッシブ 生命科学 (第1版)、2014、312 (70-78)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室HP <http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yoshimori/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。