

平成30年6月1日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15484

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能維持のための創薬スクリーニング

研究課題名(英文)Drug screening to improve mitochondrial functions

研究代表者

今居 譲 (Imai, Yuzuru)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授

研究者番号：30321730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：若年性パーキンソン病原因遺伝子ParkinとPINK1は、それぞれユビキチンリガーゼとミトコンドリア局在性キナーゼをコードする。PINK1とParkinは協働してミトコンドリアの品質管理に関与すること、その活性の喪失でドーパミン神経変性が起こることが明らかになってきた。本研究ではPINK1-Parkinシグナルを活性化しミトコンドリアの機能を高める創薬を目的として実施した。PINK1-Parkinシグナルをモニターする細胞ベースのレポーターアッセイ系を開発し、約31万の化合物ライブラリーをスクリーニングした。次にミトコンドリア膜電位や細胞生存性への影響を評価し、3つの化合物候補を得た。

研究成果の概要(英文)：The genes responsible for autosomal recessive early-onset Parkinson's disease, Parkin and PINK1 encode a ubiquitin ligase and a mitochondrial protein kinase, respectively. A series of studies have revealed that Parkin in collaboration with PINK1 has a role for mitochondrial quality control, impairment of which leads to dopaminergic neurodegeneration. In this study, we aimed at searching drugs to improve mitochondrial functions through moderate activation of PINK1-Parkin signaling.

We developed a cell-based reporter assay to monitor PINK1-Parkin signaling and screened approximately 310-thousands of chemicals. Hit compounds obtained in the screening were further tested for mitochondrial membrane potential and cell viability and three candidates were identified as seed compounds.

研究分野：神経科学

キーワード：ミトコンドリア ドーパミン神経 パーキンソン病 神経変性疾患 創薬

1. 研究開始当初の背景

若年性パーキンソン病(PD)原因遺伝子 Parkin と PINK1 は、それぞれユビキチンリガーゼとミトコンドリア局在性キナーゼをコードする。申請者を含む世界中の研究グループは、PINK1 と Parkin が損傷したミトコンドリアを選択的に排除するマイトファジー (ミトコンドリアのオートファジー) に関与することを明らかにしてきた^{1, 2, 3}。すなわち PINK1-Parkin を介したミトコンドリア品質管理が障害されることにより、PD の発症へとつながることが示唆される⁴。

申請者らは、2012~2014 年に PINK1 による Parkin のリン酸化を介した活性化メカニズムを明らかにした。2015 年には、Parkin のリン酸化による構造変換をモデリングした構造解析が発表された。現在考えられている Parkin 活性化は以下のようなものである：

定常時、Parkin は細胞質で不活性な状態としてコンパクトに折り畳まれている。ミトコンドリア機能障害により膜電位が低下すると PINK1 が活性化する。活性化 PINK1 によりリン酸化されたユビキチンが Parkin のリン酸化ユビキチン結合ポケットに入り込むことにより Parkin の構造が緩み、次に PINK1 が Parkin のユビキチン様領域をリン酸化する。これによりユビキチンリガーゼ活性中心が露出し、Parkin が活性型ユビキチンリガーゼとなる。

この発見から、リン酸化ユビキチンを模倣する効果をもつ化合物が、Parkin の活性化剤として創薬のシードになると考えられた。

2. 研究の目的

リン酸化ユビキチンを模倣する効果をもつ化合物は、Parkin 活性化薬剤の潜在力を保持していると考えられ、これをスクリーニングすることを本研究の目的とした。

PINK1, Parkin 変異が関与しない遺伝性 PD、孤発性 PD においても、ミトコンドリアの機能低下が原因となることが明らかとなってきた^{6, 7}。すなわち、本創薬のターゲットは PD 全般が含まれる。また Parkin はユビキチンに発現していることから、同定された化合物はミトコンドリア機能低下を病因とする PD 以外の疾患も標的となる。

3. 研究の方法

Parkin の基質 Mfn1 に NanoLuc ルシフェラーゼを挿入し、Parkin の活性化とともにルシフェラーゼ活性が低下するレポーターを作製した (図 1)。このレポーターおよび Parkin を安定的に発現するヒト細胞株を単離した。スクリーニングのリファレンスとしてレポーターのみを安定的に発現するヒト細胞株も用意した。予備実験として、96-well plate にて既知の PINK1-Parkin シグナル活性化試薬 valinomycin を添加し、その感度を見積もったところ、nM オーダーにて活性化が検出され大規模スクリーニングに適用可能と判断

した (図 2)。各ウェルの細胞数は、生細胞のプロテアーゼ活性を細胞透過性の蛍光性ペプチド基質 (glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin;GF-AFC) を用いて測定する方法にて評価し、細胞数あたりのルシフェラーゼ活性の低下を指標にスクリーニングを計画した。

4. 研究成果

スクリーニングは、構造多様性が考慮された低分子化合物ライブラリーと Parkin の立体構造情報に基づくフォーカスライブラリーを併用した。低分子化合物ライブラリーは 10 万程度の化合物をスクリーニングし 31 の候補を得た。さらにミトコンドリア膜電位低下の有無でスクリーニングし、膜電位に大きく影響しない 2 つの候補化合物 (compounds

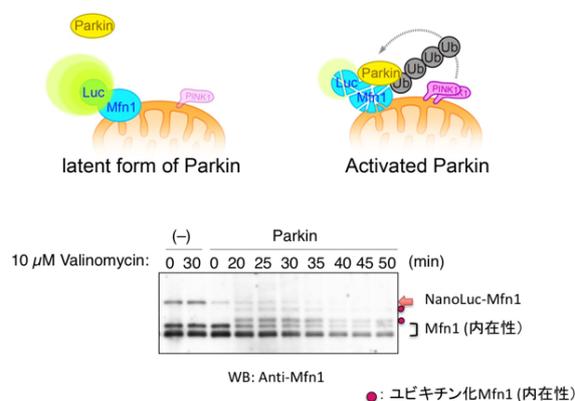


図1. セルベーススクリーニング系の樹立
NanoLuc-Mfn1 を基質としたルシフェラーゼアッセイと、細胞生存性を蛍光シグナルで評価するスクリーニング系を樹立した。

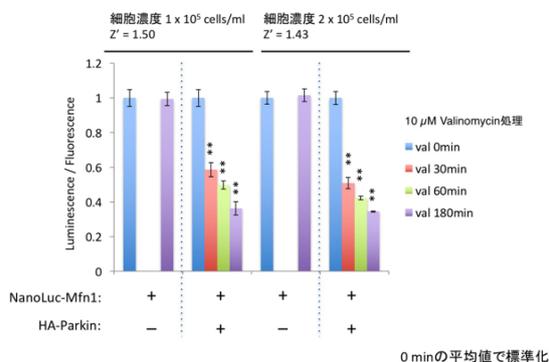


図 2. セルベーススクリーニング系の頑強性の評価

ミトコンドリア膜電位を低下させ PINK1 を活性化することが知られている Valinomycin を用いて、アッセイ系の感度を検証した。

X, Z)を得た。そのうち1種類(compound X)は、GFP-Parkinを発現したHeLa細胞においてParkinのミトコンドリア移行が認められた。

Parkinとリン酸化ユビキチンの結合様式の立体構造情報に基づく*in silico*スクリーニングでは、東大創薬機構の約21万種の化合物から約300種の候補を絞りこみ、さらに哺乳類培養細胞でのParkinのミトコンドリア移行を指標とした評価および*in vitro*ユビキチンリガーゼアッセイでのスクリーニングに進めた(図3-5)。その結果、ミトコンドリア膜電位に影響を及ぼさない化合物1種類(compound Y)を得た。

Compound Xのミトコンドリア移行活性は、PINK1ノックアウト細胞では見られなくなることから、PINK1の活性に依存していることが示唆された。またParkinのユビキチンリガーゼ不活性型変異体においても、移行活性は認

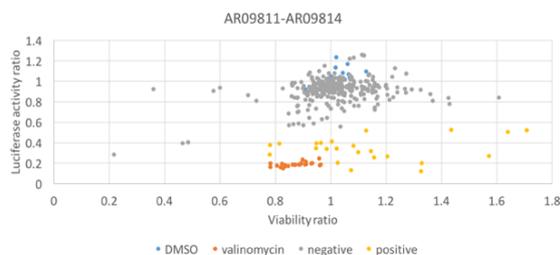


図3. スクリーニング結果の例

縦軸を発光強度(Parkinの活性)、横軸を細胞生存性とし、散布図を作成した。発光強度が低下し、細胞生存性に影響のないグループ(オレンジのドット)を陽性化合物とし、さらに膜電位への影響をMitotracker redで二次スクリーニングした。

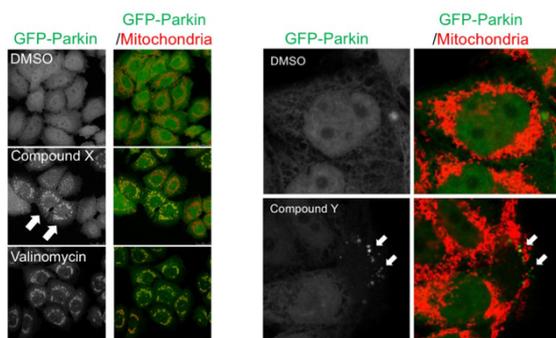


図4. 候補化合物によるParkinのミトコンドリア移行活性

GFP-Parkinを用いて、ミトコンドリア移行活性を評価した。Compound Xは10 μM 6時間、Compound Yは、10 μM 24時間での例。Compound Xは強いミトコンドリア移行活性がある(矢印)。一方、Compound Yは、部分的な移行がみられた(矢印)。

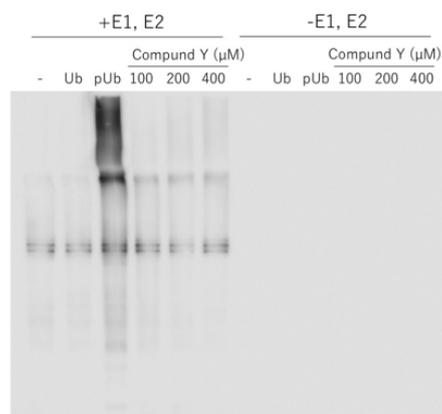


図5. Parkinユビキチンリガーゼ活性への影響

リン酸化ユビキチン(pUb)を陽性コントロールとして、Parkinのユビキチンリガーゼ活性への影響を調べた。Compound Yは特異的にParkinを活性化した。一方、ポリユビキチン鎖形成に必要なE1, E2酵素非存在下では、シグナルは見られないため、タンパク質の凝集化ではないと考えられた。

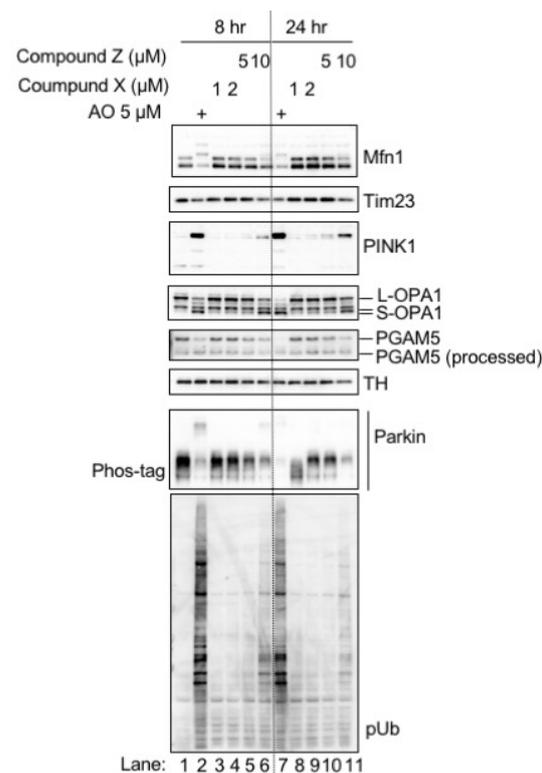


図6. Compounds X, Zによるドーパミン神経における内在性Parkinの活性化

Compound Xは、ミトコンドリア膜電位低下が見られない濃度で、Parkinの分解基質であるMfn1の発現レベルの低下が見られた。Compound Zは高濃度5-10 μMでは、膜電位の低下とPINK1の活性化が見られた。膜電位の低下はOPA1, PGAM5の切断を指標とした。AOはAnitmycin/Oligomycinでミトコンドリア膜電位低下によるPINK1活性化が見られる。

められず、リン酸化ユビキチンシグナルを介しての Parkin の活性化である可能性が示唆された。次に、PD で神経変性が認められるドーパミン神経において、これら化合物の影響を検討した。ドーパミン神経を iPS 細胞から分化させ、ミトコンドリア膜電位・細胞生存性に及ぼす影響がなく、かつ Parkin が活性化する濃度を決定した (図 6, 7)。

Compound X, Z ともに 2.5 μM 以下で、ミトコンドリア膜電位低下、細胞毒性はみられず、Parkin の活性化が見られた。一方、Compound Y は低濃度で活性がみられないことから、他の Compound と組み合わせるなど、更なる解析が必要であった。

次に、PD においてミトコンドリアの機能低下が示唆される筋肉細胞において Compound X, Z の影響を評価した。ドーパミン神経で GFP-Parkin のミトコンドリア移行がみられる濃度では、その移行効率は低く、ドーパミン神経において Parkin の活性が高いこと⁴が改めて確認できた。

関連する研究を鑑みると、これまでに PINK1 を活性化する化合物として、主に二種類が報告されている。一つは ATP アナログであり、キナーゼを活性化すると考えられるもの、もう一つは駆虫薬として使われている既知の薬剤で、ミトコンドリア膜電位を低下させ PINK1 を活性化するものである。本研究で同定された化合物は、PINK1 のキナーゼ活性には影響を与えず、ミトコンドリア膜電位低下も起こら

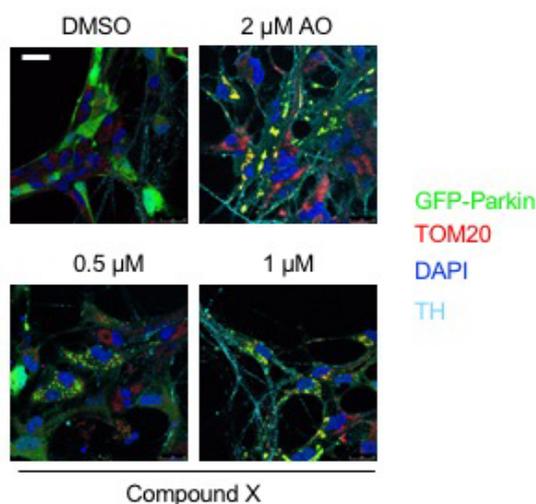


図 7. Compounds X によるドーパミン神経における Parkin の活性化

Compound X は、ミトコンドリア膜電位低下が見られない濃度で、Parkin ミトコンドリア移行がみられる。Parkin は可視化するため、GFP-Parkin を導入した。AO は Anitmycin/Oligomycin で陽性コントロール、TOM20 はミトコンドリアの染色、DAPI は細胞核の染色、TH はドーパミン神経マーカーとして用いた。

ないことから、これらとは全く作用点が違うと考えられ、オリジナリティの高い化合物の開発が期待できる。

今後、Compound X, Z を中心にさらに薬物の特性を評価していく。特に、ミトコンドリア変性を示す PD ショウジョウバエモデルで、*in vivo*での効果、血液脳関門への透過効率、薬物の安定性、代謝への影響を評価する。有効であれば、これらをリードとし化合物の最適化を推し進める予定である。

<引用文献>

1. Shiba-Fukushima K, *et al.* Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS genetics* **10**, e1004861 (2014).
2. Shiba-Fukushima K, *et al.* PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific reports* **2**, 1002 (2012).
3. Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y. PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in Drosophila. *PLoS genetics* **10**, e1004391 (2014).
4. Shiba-Fukushima K, *et al.* Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* **26**, 3172-3185 (2017).
5. Imai Y, Lu B. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder. *Current opinion in neurobiology* **21**, 935-941 (2011).
6. Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **30**, 563-571 (1991).
7. Meng H, *et al.* Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nature communications* **8**, 15500 (2017).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shiba-Fukushima K, Ishikawa K-I, Takanashi M, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N: Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. 第 39 回日本分子生物学会年会ポスター 横浜、2016 年 11 月 30 日
- ② Shiba-Fukushima K, Ishikawa K-I, Takanashi M, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N: *In vivo* evidence for the involvement of phospho-ubiquitin signal. 第 39 回日本神経学会学術大会ポスター 横浜、2016 年 7 月 22 日

[図書] (計 3 件)

- ① 服部信孝、今居 譲、柴佳保里、:「劣性遺伝性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の臨床、病理、分子遺伝学」実験医学増刊 認知症第 35 巻 12 号 21-26 (2017)
- ② 今居 譲、柴佳保里、服部信孝:「遺伝子から探るパーキンソン病病態へのミトコンドリアの関与」医学のあゆみ 第260巻 1号 85-91 (2017)
- ③ 今居 譲:「ミトコンドリア機能障害とパーキンソン病」日本臨牀 第 75 巻 1 号. 28-35, (2017)
- ④ Inoshita T, Imai Y: Disturbances in Mitochondrial Function and Vesicular Transport as Mechanisms for Pathogenesis in Parkinson's Disease. *In: Horizons in Neuroscience Research Vol. 29, Costa A and Villalba E ed, Nova Biomedical, New York, Chapter 2, 89-115 (2016).*

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: パーキン活性化剤のスクリーニング法
発明者: 今居 譲、服部 信孝、福嶋佳保里、荒野 拓
権利者: 同上
種類: 特許

番号: 特願 2016-016997

取得年月日: 平成 28 年 2 月 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今居 譲 (IMAI, Yuzuru)

順天堂大学・医学研究科・先任准教授

研究者番号: 30321730

(3) 連携研究者

柴-福嶋 佳保里 (SHIBA, Kahori)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 30468582

井下 強 (INOSHITA, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号: 20601206

大場 雄介 (OHBA, Yusuke)

北海道大学・医学部・教授

研究者番号: 30333503

(4) 研究協力者

荒野 拓 (ARANO, Taku)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 80750091