

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18H02099  
研究課題名(和文)パーキンソン疾患に挑むケミカルバイオロジー

研究課題名(英文)Chemical Biology for Parkinson's disease

## 研究代表者

井本 正哉 (Imoto, Masaya)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60213253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン疾患(PD)のメタボローム解析およびタンパク質凝集クリアランスを指標にしたスクリーニングでヒットした3種類の治療薬シードについて、創薬への展開を目指してその作用機構解析研究をおこなった。それらは、それぞれKeap1-Nrf2の結合阻害、PKCを介したTFEB活性化、標的タンパク質の液-液相分離の促進活性を有することでPD患者の脳内で観察されるタンパク質凝集をクリアランスすることを明らかにした。また、いずれの化合物もPDモデル系で顕著な神経保護活性を示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

PDのメタボローム解析研究の成果から、治療薬シードの発見および作用機構解析を行ったことでメタボローム解析研究がバイオマーカー探索だけでなく直接創薬研究に展開できることを示した。また、ケミカルバイオロジーの手法でタンパク質凝集をクリアランスする新しいメカニズムを提唱することができ、このことは他の神経変性疾患の創薬研究にも応用できる可能性を持つ重要性を有している。

研究成果の概要(英文)：We have conducted mechanism studies of three Parkinson's disease (PD) drug-seeds, which were obtained by the screening for metabolome analysis of PD and for clearance of protein aggregation seen in the brain of PD patients. We found that they function by targeting inhibition of Keap1-Nrf2 binding, activation of PLC-mediated TFEB transcription activity, and stimulation of liquid-liquid phase separation of target protein, respectively, thereby showing neuro-protection in PD-model neuronal cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：パーキンソン疾患 オートファジー メタボローム解析 神経変性疾患 タンパク質凝集



ザー顕微鏡画像から定量的に測定した。それぞれの化合物が個々の誘導刺激に与える阻害効果を視覚化したヒートマップ図を作成してクラスター解析を行った。その結果、オートファジー誘導剤が大きく6つのクラスターに分類された。神経変性疾患に治療効果を有するFDA承認薬であり、かつこれまでオートファジー誘導機構が不明であったClemastineとMemantineが小胞体ストレス誘導剤と同じクラスターに属したことに着目し、これらが小胞体ストレスを誘導するか調べたところ、PERK経路およびIRE1 $\alpha$ 経路の活性化が見られたことから、ClemastineとMemantineは小胞体ストレス応答を介してオートファジーを誘導することが示唆された。また、パーキンソン疾患患者の脳内で見られるタンパク質凝集体のクリアランス活性を有するSMK-17(図3)は、MEK阻害剤として開発されたが[3, 4], MEK阻害非依存的にオートファジーを誘導した。さらにクラスタリング分析によってSMK-17がTorin1と同じクラスターに属した。このことからSMK-17がmTOR経路を介してオートファジーを誘導するかどうかを調べたが、SMK-17はリン酸化S6のレベルの減衰をもたらしたが、リン酸化S6Kおよびリン酸化ULK1のレベルの減衰はもたらさなかったことから、SMK-17がmTOR非依存的にオートファジーを誘導することがわかった。また上記オートファジープロファイルのデータセットの主成分分析から、SMK-17によるオートファジー経路におけるPKCの関与の可能性が示唆された。実際にSMK-17によって誘導されるTFEB核移行は、PKC阻害剤Gö6983によって強く抑制されることが観察されましたが、このPKC阻害剤はTorin1によって誘導されるTFEB核移行に影響を与えなかった。また、PKC阻害剤はSMK-17誘発オートファジーを阻害したが、Torin1誘発オートファジーは阻害しなかったことから、SMK-

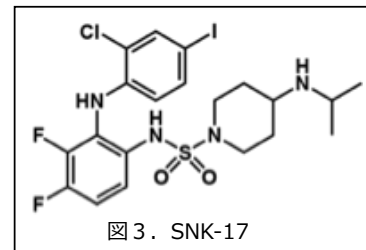


図3. SMK-17

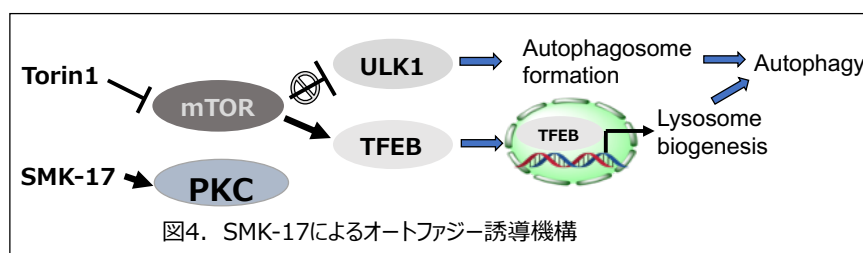


図4. SMK-17によるオートファジー誘導機構

17がmTOR非依存的かつPKC依存的にTFEB活性化を介してオートファジーとリソソーム生合成を誘導することを明らかにした(図4)。

### (3) 液-液相分離を制御する化合物S0286

パーキンソン疾患モデル細胞内に観察されるタンパク質凝集の形成阻害を指標にスクリーニングを行い、ヒット化合物としてS0286を見出した。その後の解析により、S0286は一度できたタンパク質凝集をクリアランスすること、さらにS0286がタンパク質分解機構に関わるタンパク質Ubiquitin1(UBQLN1)に結合することが明らかになった。このことから、S0286はUBQLN1のタンパク質分解機能を促進すると考えられるが、S0286がUBQLN1に結合することがどのようにタンパク質凝集のクリアランスにつながるのかは不明であった。そこで、S0286によるUBQLN1の機能促進機構を解析した。まずS0286がUBQLN1のどの部位に結合しているかを検証するために*in vitro* binding assayを行った。その結果、UBQLN1のS0286結合部位はSTI1ドメイン、STI3ドメイン、STI4ドメインであることが明らかになった。近年、特定の三次構造を取らない天然変性タンパク質が液-液相分離(LLPS)を形成することやLLPSが神経変性疾患においてタンパク質凝集に関与することが報告されている。UBQLN1は天然変性タンパク質であることからUBQLN1もLLPSを形成し、さらにS0286がUBQLN1のSTIドメインに結合することでLLPSの形成を促進し、これによりタンパク質凝集の分解に寄与する可能性を考えた。それを検証するためにまずmCherry-UBQLN1をヒト神経芽腫由来SH-SY5Y細胞にトランスフェクションし、共焦点顕微鏡で観察を行った。その結果、mCherry-UBQLN1は細胞質でドット状の構造体を形成した。また、この構造体は細胞内を流動的に移動する様子が観察され、さらに1,6-hexanediolによって解消されたことから、UBQLN1はLLPSを誘導し、細胞内に液滴を形成することが示唆された。さらに、mCherry-UBQLN1の液滴はS0286を添加することにより形成促進された。また、このmCherry-UBQLN1のLLPSはユビキチン化タンパク質と共局在したことから、UBQLN1が分解タンパク質を液滴内に取り込み、タンパク質分解機構に関与する可能性が示唆された。

一方、UBQLN1リコンビナントタンパク質を精製し、*in vitro*でLLPSの誘導を観察した。その結果、UBQLN1は*in vitro*においても液滴状の構造体を形成した。さらに、mCherry-UBQLN1とパーキンソン疾患における凝集タンパク質 $\alpha$ -synucleinを混合したところ、 $\alpha$ -synucleinがUBQLN1の液滴に取り込まれる様子が観察された。このことからこのタンパク質のLLPS誘導活性がPD治療の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

### [引用文献]

1. Hatano et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:295-301 (2016)
2. Kataura et al. *J. Neurochemistry* 155:81-97 (2020)
3. Kiga et al *Anticancer Drugs*. 23: 119-130 (2012)
4. Kiga et al *Scientific Reports*. 5: 8155 (2015)
5. Kataura et a *Autophagy* 7:1-7 (2020)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito S, Kato W, Ikeda H, Katsuyama Y, Ohnishi Y, Imoto M	4. 巻 73
2. 論文標題 Discovery of “heat shock metabolites” produced by thermotolerant actinomycetes in high-temperature culture.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Antibiotics	6. 最初と最後の頁 203-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-020-0279-4.	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 Kataura T, Saiki S, Ishikawa K, Akamatsu W, Sasazawa Y, Hattori N, Imoto M.	4. 巻 -
2. 論文標題 BRUP-1, an intracellular bilirubin modulator, exerts neuroprotective activity in a cellular Parkinson's disease model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Neurochemistry	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） 10.1111/jnc.14997	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 Mizotani Y, Suzuki M, Hotta K, Watanabe H, Shiba K, Inaba K, Tashiro E, Oka K and Imoto M.	4. 巻 115
2. 論文標題 14-3-3 a directs the pulsatile transport of basal factors towards the apical domain for lumen growth in tubulogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 E8873-E8881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1808756115	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 Tsgawa H, Mori H, Matsuzaki J, Sato A, Saito Y, Imoto M, Suematsu M, Suzuki H.	4. 巻 15
2. 論文標題 CAPZA1 determines the risk of gastric carcinogenesis by inhibiting Helicobacter pylori CagA-degraded autophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autophagy.	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2018.1515530	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 Hanaki Y, Shikata Y, Kikumori M, Hotta N, Imoto M, Irie K	4. 巻 495
2. 論文標題 Identification of Protein Kinase C Isozymes Involved in the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Activities of 10-Methyl-aplog-1, a Simplified Analog of Debromoaplysiatoxin, in Several Cancer Cell Lines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 438-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.052	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 Kataura Tetsushi, Tashiro Etsu, Nishikawa Shota, Shibahara Kensuke, Muraoka Yoshihito, Miura Masahiro, Sakai Shun, Katoh Naohiro, Totsuka Misato, Onodera Masafumi, Shin-Ya Kazuo, Miyamoto Kengo, Sasazawa Yukiko, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji, Imoto Masaya	4. 巻 7
2. 論文標題 A chemical genomics-aggrephagy integrated method studying functional analysis of autophagy inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1794590	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 Ikeda Hiroaki, Muroi Makoto, Kondoh Yasumitsu, Ishikawa Shumpei, Kakeya Hideaki, Osada Hiroyuki, Imoto Masaya	4. 巻 15
2. 論文標題 Mic1xin, a Novel MIC60 Inhibitor, Induces Apoptosis via Mitochondrial Stress in $\beta$ -Catenin Mutant Tumor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2195~2204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00381	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masaya Imoto, Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Mototsugu Oya
2. 発表標題 Formycin A selectively induced apoptosis in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片浦哲志、斉木臣二、服部信孝、井本正哉
2. 発表標題 バイオマーカーを指標とするパーキンソン病治療薬の探索とBET阻害剤JQ1による神経保護活性
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsushi Kataura, Shinji Saiki, Nobutaka Hattori, Masaya Imoto
2. 発表標題 Biomarker-based Screening Identified BET inhibitor JQ1 as a Neuroprotective Compound for Parkinson ' s Disease
3. 学会等名 第9回日韓ケミカルバイオロジーシンポジウム ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 がん細胞の特性を標的とする阻害剤の化学生物学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度第1回 関東支部例会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Kataura, M. Imoto
2. 発表標題 Chemical genomic analysis on autophagic regulation mechanism in human lung cancer A549 cells
3. 学会等名 EORTC NCI AACR 2018 ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaya Imoto
2. 発表標題 ケミカルバイオロジーで挑むホヤの脊索管形成機構解析
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会2018 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井 智暉, 濱村 祐輝, 本郷 周, 小坂 威雄, 大家 基嗣, 井本 正哉
2. 発表標題 Formycin Aによる去勢抵抗性前立腺がん 細胞選択的細胞死誘導
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	齊木 臣二 (Saiki Shinji) (00339996)	順天堂大学・医学部・准教授  (32620)	
研究分担者	野田 展生 (Noda Nobuo) (40396297)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長  (72801)	

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