

令和元年6月12日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19039

研究課題名(和文)ミトコンドリア分裂阻害剤の探索と作用機序の解明

研究課題名(英文) Search for mitochondrial division inhibitors and elucidation of mechanism of action

研究代表者

栗原 悠介 (Kurihara, Yusuke)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：30747192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア分裂阻害剤を探索する目的で、約10000化合物のライブラリーを用いた1次スクリーニングを行った結果、121種の化合物を絞り込むことができた。現在は、それら121種の化合物を含めた新たなライブラリーの構築を試みている。新たなライブラリーを加えた2次スクリーニングでは、ミトコンドリア分裂阻害能が強く、細胞毒性の低いという選定基準に加え、ミトコンドリア膜電位の上昇とミトコンドリア含有量の増加という新たな選定基準を設けた。今後、2次スクリーニングで選定された化合物において、その作用機序を明らかにし、最終的には疾患モデル動物への効果を検証する予定である。

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をはじめとする神経変性疾患発症の原因の一つとして、ミトコンドリアの異常な分裂亢進による神経細胞死が考えられている。本研究ではミトコンドリア分裂の阻害剤をスクリーニングにより同定し、神経変性疾患の治療系を確立することを目的とする。

現在、121種類の候補薬物が同定されており、今後はこれらの候補薬物に加え、新たなライブラリーを加え、二次スクリーニングを行う予定である。二次スクリーニングで得られた薬物は動物実験において、薬効、安全性を検証する。本研究によって、神経変性疾患のみならず、ミトコンドリア分裂に関わる多くの疾患の治療薬開発への道が拓かれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As a result of the primary screening using a library of about 10,000 compounds for the purpose of searching for mitochondrial division inhibitors, 121 compounds could be selected. At present, we are trying to construct a new library containing these 121 compounds. In addition to the selection criteria that mitochondrial fission-inhibiting ability is strong and low cytotoxicity, in the secondary screening to which a new library has been added, new selection criteria were set up, including the increase in mitochondrial membrane potential and the increase in mitochondrial content. In the future, we plan to clarify the mechanism of action of compounds selected in the secondary screening, and finally to verify the effects on disease model animals.

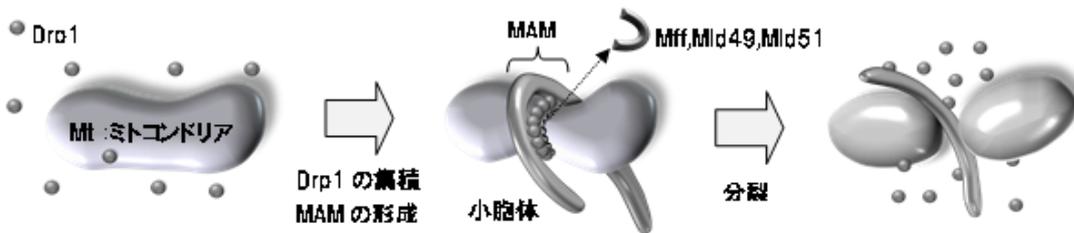
研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生の他、アポトーシスや自然免疫応答など、さまざまな細胞内現象の中心的な役割を果たす。環境や機能に応じてその形態をダイナミックに変化させるミトコンドリアは、融合と分裂のバランスを巧みに変化させる。例えば、低グルコース環境下において、ミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生能を向上させるために、融合を亢進する。また、アポトーシス誘導条件下では、ミトコンドリアの分裂を亢進することでミトコンドリア膜間スペースのアポトーシス因子を放出し、死のカスケードを始動させる。ミトコンドリアの分裂・融合を制御する主な因子として、哺乳類では、細胞質に局在し分裂に関わるダイナミン様 GTPase タンパク質の Drp1、ミトコンドリア外膜に局在し外膜の融合に関わる GTPase タンパク質の Mfn1 と Mfn2、ミトコンドリア膜間スペースに局在し内膜の融合に関わるダイナミン様 GTPase タンパク質の OPA1 が同定されている。Drp1 はミトコンドリア上でリング状に自己会合し、GTPase 活性によって収縮することでミトコンドリアを切断する。また、ミトコンドリア外膜上には Mff, Mid49, Mid51 などの膜タンパク質が局在しており、これらが Drp1 のレセプターとして働いていることが分かっている (図1)。また近年、Drp1 を介したミトコンドリアの分裂は、小胞体とミトコンドリアとの接触部位 MAM(Mitochondria-Associate Membrane) 特異的に行われ、Drp1 の活性は SNARE protein syntaxin17(Syn17) により制御されることが明らかになっている。一方、Mfn1 と Mfn2 は、共にその GTP 加水分解に依存してミトコンドリア外膜の融合を仲介する。Mfn2 はミトコンドリア外膜の融合のみならず、小胞体にも局在することから、MAM 構造の形成や、小胞体からミトコンドリアへの Ca²⁺ の受け渡しの制御を担うなど、多彩な機能を持つ。また、OPA1 は内膜の融合だけではなく、クリステ構造の再構築によってアポトーシスを制御する役割を持つ。

図1：ミトコンドリア分裂の概要

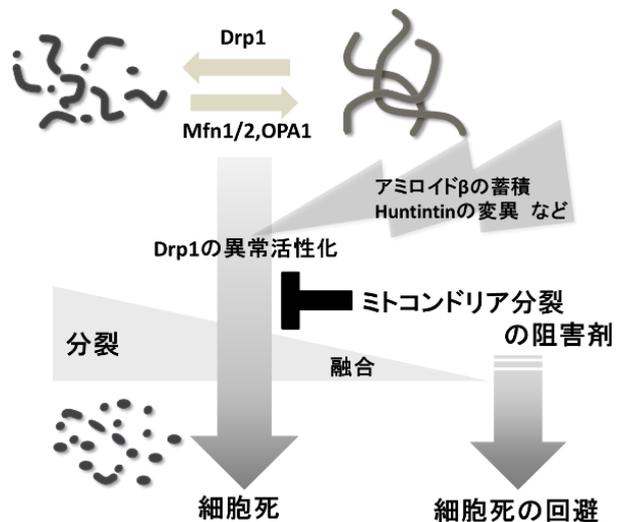


このようにミトコンドリアダイナミクス制御因子は、さまざまな細胞内現象に寄与することが分かってきている。また、ミトコンドリアダイナミクス制御因子の動物個体における生理的な役割は、ノックアウトマウスを用いた解析により明らかになりつつある。ミトコンドリアダイナミクスの生理的な重要性が明らかになる一方で、Drp1 活性の異常亢進に起因する病態が、近年、数多く報告されている。

2. 研究の目的

Drp1 の活性亢進によるミトコンドリアの異常分裂は、特に神経疾患の原因となっており、そのため、Drp1 の活性を抑制する薬物は、これらの疾患に対する有効な治療薬になる可能性がある (図2)。ミトコンドリア分裂の阻害剤は、過度なミトコンドリア分裂に起因する疾患の治療薬として、大変有用であると考えられているが、現在のところ、有効なミトコンドリア分裂阻害剤は見つかっていない。2008 年に、ミトコンドリア分裂阻害剤として Mdivi-1 が報告されているものの、酵母を用いたスクリーニング系によって得られた化合物ということもあり、哺乳動物細胞に対する効果は低い。そこで本研究では、哺乳動物細胞を用いた薬物スクリーニングを行うことで、哺乳動物に対して、より効果の高いミトコンドリア分裂阻害剤を探索することを目的としている。

図2：ミトコンドリア分裂と細胞死



3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア阻害剤のスクリーニング

- 細胞：Su9-RFP 安定発現 HeLa 細胞株
- 使用ライブラリー：
 - 1次スクリーニング
 - ⇒コア・ライブラリー (9,600 種類)
 - 2次スクリーニング
 - ⇒アナログライブラリー(約 50,000 種類)
- 使用機器：IN Cell Analyzer 2000(高速イメージングサイトメーター)、Biomek NXP(全自動分注システム)
- 評価方法：IN Cell Investigator(解析ソフト) によるミトコンドリアの長さの測定
- 実験手順：Su9-RFP 安定発現 HeLa 細胞を 96well プレートに播き、スクリーニング化合物を加えた後、CCCP を処理し、30 分間インキュベートする。その後、IN Cell Analyzer 2000 によってミトコンドリアの形態を観察し、ミトコンドリア分裂を阻害する化合物を抽出する。評価方法として、IN Cell Investigator を用いてミトコンドリアの長さの平均値を算出し、コントロール細胞 (DMSO のみを添加し、ミトコンドリアが分裂しない細胞) の 5 割以上のミトコンドリアの長さを維持する化合物をヒット化合物とした (図 3)。さらに、絞り込まれた化合物のアナログを加え、1 次スクリーニングと同様の方法で 2 次スクリーニングを行い、コントロール細胞の 7 割以上のミトコンドリアの長さを維持する化合物を抽出する。2 次スクリーニングを経て抽出した化合物において、処理濃度/時間を検討し、最もミトコンドリア分裂阻害効果が高く、且つ、細胞毒性の低い化合物を選出する。なお、この検索方法で効果的なミトコンドリア分裂阻害剤を絞り込めない場合は、ドメイン特異的 (GTPase 特異的、リン酸化酵素特異的など) に作用する化合物を検索する等し、ライブラリーの種類を順次拡大する。

(2) ミトコンドリア分裂阻害剤の作用点の特定

具体的に、ミトコンドリア分裂阻害剤の①Drp1 の GTPase 活性 への影響、②Drp1 のミトコンドリアリクルートへの影響、③Drp1 受容体である Mff,Mid49,Mid51 と Drp1 との結合能への影響、④小胞体とミトコンドリアとの接触部位 MAM における、ミトコンドリア分裂関連因子への影響を調べ、化合物の「作用点」を特定する。具体的な方法を以下に示す。

①Drp1 の GTPase 活性への影響

精製したリコンビナント Drp1 と GTP、およびスクリーニングで得られた化合物を混ぜ、30°C で 30 分間インキュベートする。その後、遊離リン酸によるマラカイトグリーンの発色を 600nm の吸光度で測定し、化合物によって Drp1 の GTPase 活性が阻害されるかを検討する。

②Drp1 のミトコンドリアリクルートへの影響

ミトコンドリア分裂誘導剤である CCCP の添加により、Drp1 は効率的にミトコンドリア上に集積し、点状の局在を示す。そこで、まず Drp1 と蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質 Drp1-GFP を細胞に導入する。次に、スクリーニングで得た化合物と CCCP を細胞に併用処理し、共焦点顕微鏡で Drp1-GFP の局在を確認することで、Drp1 のミトコンドリアへの集積に化合物が影響を与えるかを検証する。

③Drp1 受容体である Mff,Mid49,Mid51 と Drp1 との結合能への影響

Drp1 はミトコンドリア上に集積し、自身の GTPase 活性によって GTP を GDP へと加水分解する過程でミトコンドリアを分裂する。この時、Drp1 がミトコンドリア上に集積するためには、ミトコンドリア外膜に局在する Mff,Mid49,Mid51 と結合する必要がある。そこで、同定された化合物が、Drp1 と Mff および Mid49、Mid51 との結合能に影響を与えるかを免疫沈降法や共焦点顕微鏡によって検証する。

④小胞体とミトコンドリアの接触部位 MAM に関わる因子への影響

Drp1 の集積は、ミトコンドリア上の小胞体との接触部位 MAM 特異的に行われ、そこに局在する Syn17 によって制御されることが明らかになっている。また、MAM において、PKA キナーゼとそのアンカー型タンパク質である Rab32 による Drp1(Ser637)へのリン酸化修飾が、Drp1 の活性を負に制御していることも分かっている。そこで、同定された化合物が、Syn17 と Drp1 の相互作用、また、Rab32-PKA による Drp1(Ser637)へのリン酸化修飾に影響を与えるかをイムノブロット法および免疫沈降法により検証する。

(3) 疾患モデル細胞およびマウスを用いた解析

●アルツハイマー病モデル細胞を用いた検証

アルツハイマー病の原因タンパク質と考えられているアミロイドβ前駆体(APP695)をマウス神経細胞 N2a 細胞に取り込ませると、取り込まれた APP695 は Drp1 にニトロシル修飾を与えることが分かっている。ニトロシル修飾を受けた Drp1 は活性化することで、ミトコンドリ

アの分裂を亢進し、その結果、細胞死が誘導される。そこで、APP695 の N2a 細胞への取り込みと同時に、同定した化合物を処理することで、①ミトコンドリアの分裂の亢進が阻害されるか、②ミトコンドリア分裂亢進による細胞死が阻害されるかを、共焦点顕微鏡を用いて検証する。

●ハンチントン病モデル細胞を用いた検証

ハンチントン病原因タンパク質である HTT-Q97 を発現させたラット皮質神経細胞において、HTT-Q97 が Drp1 を活性化することで、ミトコンドリアの分裂を亢進し、その結果、細胞死が誘導されることが分かっている。そこで、HTT-Q97 を発現させたラット皮質神経細胞に、同定した化合物を添加し、①ミトコンドリアの分裂の亢進が阻害されるか、②ミトコンドリア分裂亢進による細胞死が阻害されるかを、共焦点顕微鏡を用いて検証する。

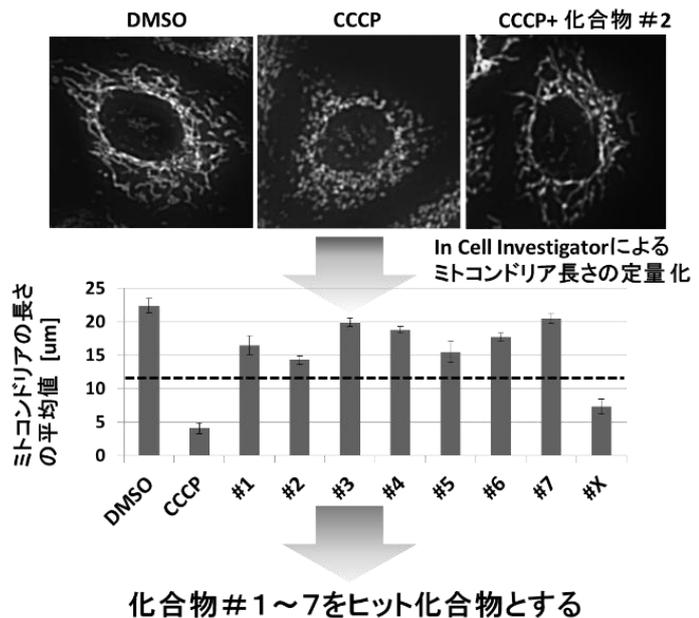
●ハンチントン病モデルマウスを用いた解析

ハンチントン病モデルマウス (YAC128 mutant huntingtin mice) において、HTT-Q97 による Drp1 の活性化によりミトコンドリア分裂が亢進し、その結果、線条体や大脳皮質の細胞死が誘導され、ハンチントン病の症状を呈することが分かっている。そこで、同定した化合物を病態モデルマウスに投与し、線条体や大脳皮質における神経細胞死やミトコンドリアの過剰分裂、凝集体や核内封入体の形成に影響を与えるかを検証する。

4. 研究成果

1 次スクリーニングの結果、121 種の化合物を絞り込むことができた。現在は、これら 121 種の化合物を含めた新たなライブラリーの構築を試みている。新たなライブラリーを利用した 2 次スクリーニングでは、よりミトコンドリア分裂阻害能が強く、細胞毒性の低い事に加え、ミトコンドリア膜電位の上昇とミトコンドリア含有量の増加を新たな基準として設ける予定である。2 次スクリーニングで同定された化合物は、その作用機序を明らかにし、最終的には疾患モデル動物への効果を検証する。期間内に遂行できなかった研究計画は、期間終了後に継続して行う予定である。本研究によって、ミトコンドリア分裂分子機構の解明において貴重な解析手段が得られるのみならず、神経変性疾患を始めとするミトコンドリア分裂に関わる多くの疾患の治療薬開発への道が拓かれることが期待される。

図 3 : スクリーニングの概要



※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。