

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07322

研究課題名(和文) 個体老化におけるリン酸化酵素NLKの分子機能解明と新規加齢性疾患治療法の検討

研究課題名(英文) Elucidating the aging-control function of NLK and investigating novel therapies for aging-related diseases.

研究代表者

石谷 閑 (Ishitani, Shizuka)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：90608861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では個体老化および加齢性疾患におけるNLKの分子機能を明らかにするとともに、NLK阻害剤の疾患・老化に対する治療効果を検討した。まずNLK機能改変動物を作製し、これらを用いてNLKの分子機能の解析をおこなった。また、加齢性疾患の一種であるポリグルタミン病におけるNLKの分子機能の解析をおこなった。さらに、NLK阻害剤の開発および、加齢性疾患モデルマウスを開発した。また、本研究で開発したin vitro kinase assay系を活用して、ヒト希少疾患に関わるキナーゼ遺伝子変異を3つ同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、NLKと遺伝的相互作用がある分子やNLKの基質の同定、発生におけるNLKの役割解明が進んできたが、一方で、成体組織や加齢性疾患、個体老化におけるNLKの機能はあまり研究が進んでいない。本研究では、独自開発したモデル動物や新規阻害剤を用いて、哺乳類を含む動物成体におけるNLKの機能、老化制御機能を見出した。本研究は個体老化機構の理解を大きく進めるだけでなく、健康寿命延伸のための新たな医療技術のシーズ創出にも繋がるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular function of NLK in individual aging and aging-related diseases, as well as the therapeutic effects of NLK inhibitors on disease and aging. First, we generated NLK-functionally modified animals and analyzed the molecular function of NLK using these animals. We also analyzed the molecular function of NLK in polyglutamine disease, a type of aging-related disease. In addition, we developed NLK inhibitors and mouse models of aging-related diseases. We also identified three kinase mutations associated with rare human diseases using the in vitro kinase assay system developed in this study.

研究分野：細胞生物学

キーワード：NLK (Nemo-like kinase) 加齢性疾患 個体老化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

NLK(Nemo-like kinase)は MAP キナーゼ(MAPK)ファミリーに属する種を超えて保存されたタンパク質リン酸化酵素である。ERK1/2、JNK、p38 などの classical MAPK とは構造が少し異なっており、atypical MAPK(非典型的 MAPK)とみなされている。また、classical MAPK がその kinase domain 上の活性化ループに位置する TXY モチーフの T (Thr)と Y(Tyr)を MAPK キナーゼ(MAPKK) によりリン酸化をされるのに対して、NLK では TXY モチーフが TQE(Thr-Gln-Glu)となっており、その活性化に MAPKK によるリン酸化を必要としない(図 1 下段)。事実、NLK は上流刺激に応じてホモダイマーを形成し、トランス自己リン酸化により TQE モチーフの Thr をリン酸化し、これにより自身を活性化する(Ishitani S et al., *MBoC* 2011)。NLK の機能は、申請者の所属グループが世界に先駆けて明らかにしてきており、さらに近年、海外の研究グループが NLK 研究に参入し、その結果多数の NLK 基質が同定されている(Ishitani T and Ishitani S, *Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition*, 2018)。しかしながら、多くの報告は生化学的な解析により示されたものであり、大部分の NLK 基質についてそのリン酸化の in vivo での役割は不明である。そのような中、私はゼブラフィッシュを用いた個体解析により、NLK による Notch リン酸化、Lef1 リン酸化などが神経前駆細胞の運命制御に必須であることを示した(Ishitani T, Ishitani S et al., *Nat Cell Biol* 2010; Ota S, Ishitani S et al., *EMBO J* 2012)。

これまでに、多様な細胞運命制御因子(Lef1 や Notch1、Yap など)及び代謝制御因子(Foxo1 や Raptor など)が NLK 基質として同定されたことを受け、NLK の機能改変動物の開発が海外で進められている。これまでに、NLK のノックアウト(KO)マウスが作製され、ホモ KO マウスは発生途上の肺で Lef1 の活性制御破綻が起き、結果、肺胞形成が異常になり生後間もなく窒息死することが示された(Ke et al., *Sci Rep* 2016)。しかし、ホモ KO が致死であり、また NLK をコンディショナルに機能阻害できる動物が開発されていないため、成体における NLK の機能解析はほとんど進んでいない。一方、ポリグルタミン病モデルマウス(脊髄小脳変性症 1 型及び球脊髄性筋萎縮症)の病状が NLK ヘテロ KO により有意に改善すること(Ju H et al., *J Neurosci* 2013; Todd TW et al., *eLIFE* 2015)や、PTEN 欠損がん細胞の増殖・生存が NLK RNAi により低下すること(Mendes-Pereira AM et al., *PLoS One* 2012)、NLK 阻害剤によりポリグルタミン病モデル神経細胞におけるポリグルタミン化タンパク質(病因タンパク質)が分解へと導かれることや種々のがん細胞の増殖・生存活性が低下すること(未公表データ)などが分かかってきており、NLK は加齢性疾患の発症を正に制御する酵素であることが示唆されている。また、過去の文献において、NLK ヘテロ KO マウスの寿命が野生型マウスよりも長いことを示すデータ(Todd TW et al., *eLIFE* 2015、論文中では言及されていない)があり、このことから、NLK の活性阻害が個体老化を抑制する可能性が期待される。NLK と個体老化、加齢性疾患の関係に注目した我々は、マウス(寿命 3 年以上)では寿命評価やメカニズム解析に時間がかかりすぎると考え、新たなモデル動物として超短命魚類ターコイズキリフィッシュ(通称キリフィッシュ)に注目した。キリフィッシュは、乾季・雨季のあるアフリカの乾燥地帯に生息する小型魚類であり、雨季の間に卵から一気に成魚に成長し、卵を産みつつ、徐々に老化し、死に至る。乾季の間は卵の状態に休眠し、雨季になるとスコールの刺激で発生を再開する。乾季における休眠能力を獲得するために trade off で短寿命化した動物と考えられているが、その老化の表現型はヒト老化に類似しており、運動能低下、筋萎縮、臓器の繊維化、がん発生、脳の萎縮、背骨の湾曲、組織再生力低下などが観察される(Hu CK and Brunet A, *Aging Cell*, 2018)。その寿命の短さは、研究室で飼育可能な脊椎動物の中で最短(3-6 ヶ月)であり、このため、長寿動物ハダカデバネズミに並ぶ、老化研究における次世代モデル動物としてにわかに注目され始めている。そこで我々は、キリフィッシュ研究の世界的さきがけのドイツ Max Planck Institute for Biology of Ageing を訪問して飼育法を習得し、野生型の卵を持ち帰り、日本で飼育系を立ち上げた。そして、ゲノム編集系を独自に立ち上げ、NLK KO キリフィッシュの作出に成功した。NLK KO による寿命延長は現在評価中で結果が出ていないが、少なくとも、NLK ヘテロ KO キリフィッシュは、野生型で筋萎縮と運動能低下が起きる老齢期になっても、筋萎縮と運動能低下が起きないことを見出している(申請者らの未公表データ)。このことは、NLK が個体老化を正に制御する因子であるという我々の仮説に合致する。NLK の個体機能解析推進のボトルネックの一つとして、NLK 阻害剤がないことが挙げられる。酵素の研究には、その特異的阻害剤が有効なツールとなる。しかし、全ての classical MAPK 及び多くのタンパク質リン酸化酵素に対して特異的阻害剤の開発が進められているのに対し、NLK の特異的阻害剤は全く報告がない。私は、NLK 研究の推進には阻害剤が必要であると考え、2012 年より阻害剤の開発を進めてきた。東大創薬機構から入手した約 17000 種の低分子化合物を対象とした大規模スクリーニングを実行し、「in vitro、in vivo 双方において NLK の酵素活性を特異的に抑制し、かつ特異性が高く細胞毒性が低い化合物」を探索し、そしてさらにヒット化合物の構造改変も進め、その結果、ヒト細胞内で NLK の活性を IC₅₀ 20 nM で抑制できる強力な NLK 阻害剤を得た。この NLK 阻害剤は非常に特異性が高く、ヒトの全キナーゼのうち NLK に最も強く作用するだけでなく、NLK と構造が類似したキナーゼ群の

活性をほとんど抑制しない(未公表データ)。

このように、NLK が加齢性疾患や個体老化に関わる可能性が期待できるが、動物成体において NLK がどのような基質をリン酸化し、どのような生理的役割を果たしているかは不明である。また、独自開発した NLK 阻害剤が加齢性疾患治療薬あるいは抗老化薬となる可能性も期待できるが、検証が必要である。

2. 研究の目的

NLK は、MAP キナーゼファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素である。私はこれまで、神経発生における NLK の機能と制御を解明してきた。その過程で、NLK が不良タンパク質蓄積や神経変性、がん発生を正に制御し、加齢性疾患や個体老化に関わる知見が得られつつある。個体老化における NLK の機能の詳細は未だ不明ではあるが、これらの新たな知見は、NLK の特異的阻害剤が加齢性疾患治療薬あるいは抗老化薬となる可能性を示している。そこで本研究では、NLK 阻害剤や NLK 機能改変動物など独自の解析ツールを開発し、個体老化および加齢性疾患における NLK の分子機能を明らかにするとともに、NLK 阻害剤の疾患・老化に対する治療効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究では個体老化および加齢性疾患における NLK の分子機能を明らかにするとともに、NLK 阻害剤の疾患・老化に対する治療効果を検討する。

まず、研究室で飼育可能な脊椎動物の中で最も寿命が短い小型魚類ターコイズキリフィッシュを用いて、NLK の個体老化における役割を解析する。具体的には、ゲノム編集により NLK KO キリフィッシュを作出し、NLK KO により寿命延伸が起こるか確認する。続いて、野生型個体で NLK の発現の高い組織に注目し、野生型 - NLK KO 個体間の老化速度の違い、およびそれを引き起こすメカニズムを詳細に解析する。

また、NLK 酵素活性欠損マウスや NLK コンディショナル KO マウスを作製し、哺乳類における NLK の役割を検証する。特に、個体老化への効果に注目する。

さらに、強力かつ選択的な NLK 阻害剤を作出し、これを用いて NLK 阻害の加齢性疾患・老化に対する治療効果の検討も行う。疾患モデル細胞やキリフィッシュ個体、加齢性疾患モデル動物に NLK 阻害剤を投与し、加齢性疾患・老化に対する治療効果を検討する。また、臨床的応用を目標として、NLK 阻害剤の構造最適化を進める。

4. 研究成果

まず、NLK の老化における役割を解析するために、ゲノム編集技術により、NLK 機能改変キリフィッシュ、および NLK 機能改変マウス、NLK コンディショナル KO マウスを作製し、これらを用いて、個体老化および加齢性疾患における NLK の分子機能の解析をおこなった。NLK 機能改変マウスにおいては、運動能力の向上が認められた。今後さらに解析を進めることで、老化における NLK の分子機能の解明をめざす。

加齢性疾患の一種であるポリグルタミン病における NLK の分子機能の解析をおこなった。ポリグルタミン病は、グルタミン鎖が異常伸長したポリグルタミンタンパク質が神経細胞の変性を誘導し、神経系に重篤な障害を及ぼす、遺伝性の神経変性疾患である。NLK が異常ポリグルタミンタンパク質をリン酸化することは以前から分かっていたが、私は、生化学的解析によって NLK による異常ポリグルタミンタンパク質のリン酸化部位を複数箇所同定した。さらにこれらのリン酸化部位の変異体を用いた解析によって、NLK による異常ポリグルタミンタンパク質の直接的なリン酸化が異常ポリグルタミンタンパク質の蓄積を促すことを明らかにした。

さらに、NLK 阻害の加齢性疾患・老化に対する治療効果の検討を目的として、NLK 阻害剤の開発を行った。これまでに強力かつ選択的なリード化合物を作出しており、これをベースとして臨床的応用を目標とした構造最適化を進めることで、物性や薬物動態面を飛躍的に向上させることに成功した。加えて、発症における NLK の関与が判明している加齢性疾患については、NLK 阻害剤の治療効果の検討を目的とした疾患モデルマウスの作製および生化学的解析系・行動解析系の構築をおこなった。現在、治療効果を期待できるマウス体内濃度の維持をめざし、継続的投与方法の検討をおこなっており、今後、独自開発した加齢性疾患モデルマウスへの投与効果の検討を行う。

また、本研究で開発した *in vitro* kinase assay 系を活用して、臨床研究者と共同研究を行い、ヒト希少疾患に関わるキナーゼ遺伝子変異を 3 つ同定した (Uehara et al., *Sci Rep* 2020; Zarate et al., *Genet Med* 2021; Nishina et al., *J Hum Genet* 2021)。加えて、本研究で進めていたシグナル解析系・阻害剤解析系を利用し、CDK8 遺伝子変異に起因する希少疾患の発症メカニズムの一端を解明するとともに (Uehara et al., *Sci Rep* 2020)、Wnt シグナル-NF B シグナルの新たなクロストークの発見に貢献した (Zou et al., *Nat Commun* 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishina Sachiko, Hosono Katsuhiko, Ishitani Shizuka, Kosaki Kenjiro, Yokoi Tadashi, Yoshida Tomoyo, Tomita Kaoru, Fukami Maki, Saito Hiroto, Ogata Tsutomu, Ishitani Tooru, Hotta Yoshihiro, Azuma Noriyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Biallelic CDK9 variants as a cause of a new multiple-malformation syndrome with retinal dystrophy mimicking the CHARGE syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1021-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00909-x	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 Zarate YA, Uehara T, Abe K, Oginuma M, Harako S, Ishitani S, 他25名, Hirose Y, Ishitani T, Kosaki K.	4. 巻 Jun;23(6)
2. 論文標題 CDK19-related disorder results from both loss-of-function and gain-of-function de novo missense variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetics in Medicine	6. 最初と最後の頁 1050-1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41436-020-01091-9	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 Uehara Tomoko, Abe Kota, Oginuma Masayuki, Ishitani Shizuka, Yoshihashi Hiroshi, Okamoto Nobuhiko, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro, Ishitani Tooru	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathogenesis of CDK8-associated disorder: two patients with novel CDK8 variants and in vitro and in vivo functional analyses of the variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74642-4	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 Zou J, Anai S, Ota S, Ishitani S, Oginuma M, Ishitani T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Determining zebrafish dorsal organizer size by a negative feedback loop between canonical/non-canonical Wnts and Tlr4/NF B.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-42963-3	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石谷 閑、石谷 太
2. 発表標題 ポリグルタミン病におけるタンパク質リン酸化酵素NLKの機能解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石谷閑、石谷太
2. 発表標題 新規キナーゼ阻害剤を用いたポリグルタミン病の治療戦略
3. 学会等名 第9回 細胞競合コロキウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石谷 閑、石谷 太
2. 発表標題 ポリグルタミン病におけるタンパク質リン酸化酵素NLKの機能解析
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石谷 閑
2. 発表標題 新規キナーゼ阻害剤を用いたポリグルタミン病の新規治療戦略
3. 学会等名 春季岡崎生物学研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所生体統御分野ホームページ
<https://ishitani-lab.biken.osaka-u.ac.jp/>

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

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