

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02072

研究課題名(和文)パーキンソン病発症に関わるアグリソームの形成とクリアランスの制御機構

研究課題名(英文)Studies on the regulatory mechanism of aggresome formation and clearance

研究代表者

井本 正哉 (Imoto, Masaya)

順天堂大学・大学院医学研究科・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)：パーキンソン病(PD)の発症原因と考えられているアグリソームの蓄積を制御する化合物を用いて、その形成機構の解析を行なった。アグリソーム形成を促進する化合物ミクリキシンの強力な誘導体JU23を取得し、JU23を作用させることでアグリソームの構成成分である α -シヌクレイン(α -Syn)との相互作用が減少するタンパク質候補を取得した。また、この化合物の標的タンパク質候補も取得した。一方、ユビキリン2は液-液相分離(LLPS)を介して α -Synの凝集を誘導するが、小分子化合物S0286は、ユビキリン2に結合することで α -Synの凝集を阻害することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケミカルバイオロジーの手法で、アグリソーム形成、特に α -シヌクレイン(α -Syn)凝集の制御機構の解析を行うなかから、それに関わるタンパク質候補を同定したことは、パーキンソン疾患の新しい治療薬開発に向けて新たな治療標的を提案したことになる。また、アグリソーム形成は他の神経変性疾患でも見られる減少であることから、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 analyzed the formation mechanism of aggresomes, whose accumulation is thought to be a cause of the onset of Parkinson's disease (PD) by using a compound that controls the accumulation of aggresomes. We have obtained JU23, a potent derivative of miclxin, a compound that promotes aggresome formation, and obtained candidate proteins whose interaction with α -synuclein (α -Syn), a component of aggresome, is reduced by the action of JU23. On the other hand, ubiquitin 2 induces aggregation of α -Syn through liquid-liquid phase separation (LLPS), and we found that the small molecule compound S0286 inhibits α -Syn aggregation by modulating ubiquitin 2 LLPS.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アグリソーム α -シヌクレイン パーキンソン疾患 液-液相分離

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)はアルツハイマー病に次いで 2 番目に高い罹患率を有する神経変性疾患である。PD の病理学的な特徴としては、中脳黒質のドーパミン神経細胞内に α -Synuclein(α -Syn)を主たる構成成分とする Lewy 小体と呼ばれる異常タンパク質凝集体アグリソームが蓄積することが挙げられ、これが PD の安静時振戦、固縮、動作緩慢などの運動障害の症状を示す主要因と考えられている。これまでに 10 数種の PD 責任遺伝子が同定されており、これら PD 責任遺伝子のいくつかはオートファジーリソソーム系やユビキチンプロテアソーム系に関わるとされるが、アグリソームを形成するメカニズムは未だ不明である。一方、異常タンパク質の蓄積が PD の原因であることから、この異常タンパク質をクリアランスできれば PD 治療へもつながる。しかし、どのようなメカニズムでアグリソームのクリアランスが誘導できるのかという点も不明な点が多い。一方、我々はこれまでにアグリソーム形成を誘導する化合物ミクリキシンと、PD モデル細胞系で形成されたアグリソームの形成を阻害する化合物 SO286 を取得している。

2. 研究の目的

本研究ではミクリキシンと SO286 の用いたケミカルバイオロジーの研究手法で、PD 細胞モデル系でのアグリソーム形成の制御機構を解析を通じて PD 発症機構の分子レベルでの解明を目的とするとともに、未だ根本的治療薬のない PD の新しい治療薬探索や開発への貢献を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アグリソームは、ヒト SH-SY5Y 細胞に 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) を添加し、24 時間後に Proteostat もしくはチオフラビン S (ThS) で染色することで検出した。
 (2) *in vitro* での液滴形成は蛍光染色したリコンビナントたんぱく質を PEG 存在下で 37° C に置き、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。
 (3) FRAP 実験は LSM880 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss) で実施した。画像は、488 nm または 633 nm レーザーを 100 ms の露光で使用して取得した。
 (4) 細胞レベルでの LLPS 誘導は細胞を 50 μ M のヒ素を添加し、生成した液滴は免疫染色および蛍光発色により検出した。
 (5) 化合物の標的たんぱく質を同定するために、ビオチン標識化合物の合成を行い、プルダウン法、および Turbo-ID を用いた近接依存性標識法により結合タンパク質を回収し、LC-MS にてタンパク質の同定を行なった。

4. 研究成果

テーマ 1：ユビキリンの LLPS を介した α -シヌクレイン凝集阻害と SO286 による抑制
 レヴィ小体の主要成分である α -シヌクレイン(α -Syn)フィブリル形成の制御機構は不明な点が多い。近年、 α -Syn が液-液相分離 (LLPS) を誘導してフィブリル化するという報告がなされた (Nat. Chem. 12: 205, 2020)。しかし、フィブリル形成には高濃度の α -Syn と長期間 (30 日間) 要することから、PD 患者の脳内で起こる α -Syn フィブリル形成には他の細胞因子が関与していると考えられる。ユビキリンは LLPS を誘導して液滴を形成することが報告されている (Mol. Cell 69:965, 2018)。このことから、 α -Syn のフィブリル形成にを制御する候補タンパク質として、ユビキリンを考え、研究を進めた。ヒトのユビキリンは 1, 2, 4 の 3 種類が知られており、お互いにホモロジーが高い。一方、SO286 (Fig.1) はユビキリン 1, 2, 4 に結合することを見出していたが、それぞれに対する結合の強さを知るために、ビオチン標識 SO286 を用いて、Biacore で解析した。その結果、SO286 はユビキリン 2 に強く結合することが明らかになった (Fig.2)。そこで、SO286 はユビキリンに結合して LLPS を制御しているのかどうか検討した。その結果、SO286 はユビキリン 1, 2 および 4 による LLPS によって形成する液滴の数や面積に影響しなかった。このことから、SO286 はユビキリンによる LLPS 誘導には影響を与えないことがわかった。一方、液滴は時間依存的にタンパク質のオリゴマー化が進むことで液体としての性質を消失し、ゲル化することが報告されている。そこで試験管レベルでユビキリン 1 および 2, 4 の液滴の時間変化を 1,6-ヘキサンジオール (1.6-HD) 処理及び FRAP アッセイで測定したところ、ユビキリン 2 の液滴は 72 時間以降でゲル化が観察された。一方、ユビキリン 1 は 120 時間までゲル

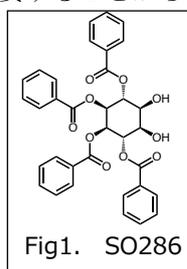
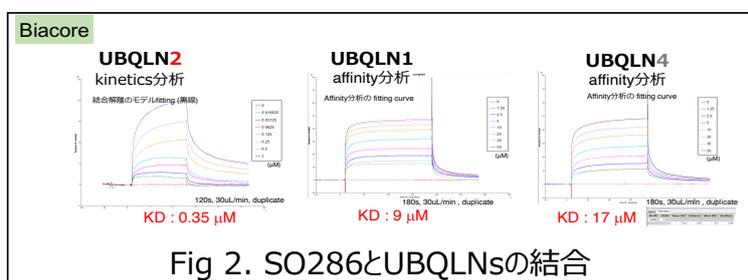
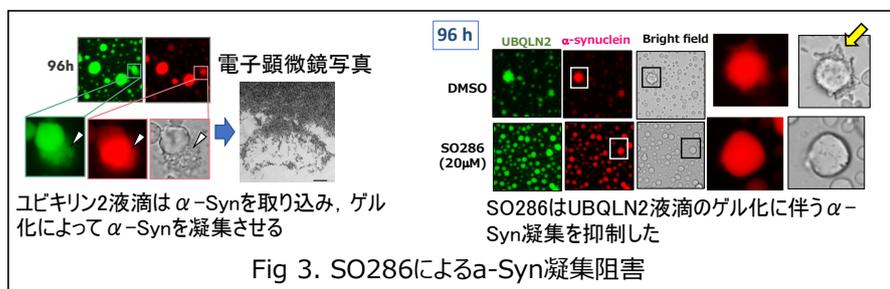


Fig 2. SO286とUBQLNsの結合



ル化が観察されず、ユビキリン4の液滴はかなり早い段階から液性を消失していることがわかった。そこで、次に S0286 によるそれぞれのユビキリンのゲル化に及ぼす影響を検討したところ、S0286 はユビキリン2のゲル化を濃度依存的に阻害することがわかった。この S0286 によるユビキリン2のゲル化阻害は、S0286 がユビキリン2に結合して、そのオリゴマー化を阻害した結果と考察できたので、実際に S0286 はユビキリン2オリゴマー化を阻害するか検討した。その結果、S0286 はゲル化を阻害する濃度域で、ユビキリン2の二量体形成を阻害したことから、オリゴマー化も阻害されていることが示唆された。そこで次に、S0286 がユビキリン2のどの領域に結合するか検討した。その結果、S0286 はユビキリン2の二つの天然変性領域に結合することがわかった。これまで、天然変性領域に結合する化合物はほとんど知られていなかったため、S0286 は極めてユニークな化合物である。

一方、我々は試験管レベルでユビキリン2が LLPS を誘導して液滴を形成する際に α -Syn を液滴に取り込むことを見出した。さらにユビキリン2の液滴は時間依存的にゲル化するが、それに伴い液滴に取り込まれた α -Syn も凝集化することを見出した。このことは、ユビキリン2 LLPS 介在的に α -Syn の凝集・フィブリル化が誘導されていることを示している。



る。しかも、S0286 はこのユビキリン2LLPS 介在的な α -Syn 凝集・フィブリル化を阻害した。この試験管レベルで見られた減少が、細胞レベルでも見られるか検討した。

EGFP- α -Syn を過剰発現した SH-SY5Y 細胞にヒ素を添加すると、3 時間後に細胞内にユビキリン2の液滴様の小さな Puncta が形成され、その Puncta に EGFP- α -Syn が取り込まれることが蛍光顕微鏡で観察された。さらに、時間依存的に α -Syn を取り込んだユビキリン2の液滴様の Puncta が肥大化し、96 時間後にはチオフラビン S (ThS) によって染色されることから凝集化することがわかった。さらに、この凝集体は Puncta から漏出し、電子顕微鏡の結果、 α -Syn のフィブリル化が誘導されていることがわかった (Fig. 3)。S0286 はヒ素によって誘導されるユビキリン2の液滴様の Puncta の肥大化、および α -Syn のフィブリル化を阻害したことから (Fig. 2)、S0286 は細胞内でもユビキリン2LLPS 介在的な α -Syn 凝集化を阻害することが示唆された。以上の結果は、S0286 の神経変性疾患治療薬シードとしての可能性を示している。

テーマ2: Miclxin によるアグリソーム形成機構

Miclxin は他のミトコンドリア阻害剤に比べて極めて強力にアグリソームを形成した。また初代培養細胞でも Miclxin はアグリソーム形成を誘導した。Miclxin 処理によってパーキンソン病患者脳内で観察される TX-100 不溶性 α -Syn が増加し、このことから Miclxin が α -Syn のオリゴマー化を促進していることを示している。また、Miclxin はプロテアソーム阻害剤 MG132 により α -Syn 不溶化を増強しない一方で、オートファジーを阻害する E64d+PepstatinA (E+P) との併用により α -Syn 不溶化を増強した。Lysosome 障害薬 LL0Me でも増強効果が確認できたことから、Miclxin が不

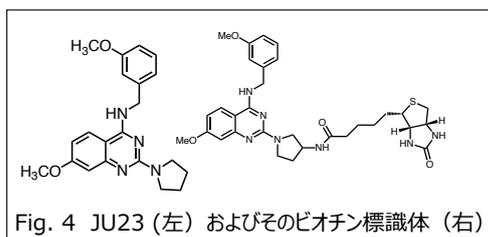


Fig. 4 JU23 (左) およびそのビオチン標識体 (右)

溶化する α -Syn はオートファジーで分解されることが示唆された。Miclxin がアグリソーム形成を促進したことから、その標的タンパク質である MIC60 の機能阻害がアグリソーム形成を誘導するか検証した。3 種類の MIC60 の siRNA を SH-SY5Y 細胞に導入し、MIC60 の発現抑制を確認した状態でもアグリソーム形成は誘導されなかった。このことから、Miclxin によるアグリソーム形成促進には MIC60 以外の標的タンパク質が関与することがわかった。そこで、Miclxin の類縁化合物の中から、Miclxin 同様、アグリソーム形成を促進する活性を有し、さらに MIC60 に作用しない化合物を探索した。その結果、JU23 (Fig. 4) と命名した新規化合物に目的の活性を見出した。JU23 は、 α Syn を含む多くのタンパク質を不溶化し、細胞内にて aggresome 形成を誘導する。そこで、JU23 処理した細胞の電子顕微鏡による解析を行った。その結果、JU23 はリソソーム以上を誘導している可能性が示された。また、JU23 のタンパク質凝集に関する標的タンパク質同定のため Biotin-JU23 を細胞に添加し、アビジジンビーズでプルダウンおよび MS 解析により、DPM1、RPL36a の 2 種類タンパク質が同定された。しかし、これらの Knock Down 細胞においても JU23 の aggresome 形成作用は弱いながらも保持されたままであった。これらのことから、JU23 結合タンパク質 DPM1、RPL36a はタンパク質凝集に関与するとしても、直接の JU23 標的タンパク質ではないと示唆された。さらに、新たな JU23 標的の同定方として、TurboID-StAv システムを用いたタンパク質の新規同定手法を開発した。本手法は細胞内にて標的タンパク質を biotin 化でき、pull-down 困難なタンパク質 (膜タンパク質など) をも同定可能と考えられる。そこで、Biotin-JU23 を 6-14h 細胞に曝露し、TurboID によるタンパク質の biotin 化を評価した

ところ、160 タンパク質が候補タンパク質としてリストアップされた。これらのタンパク質の中にタンパク質凝集関連因子が含まれると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 IMATSUJI SAYAKA, UJIE YUKIKO, ODAKE HIROYUKI, IMOTO MASAYA, ITOH SUSUMU, TASHIRO ETSU	4. 巻 32
2. 論文標題 Cisplatin-induced activation of TGF- signaling contributes to drug resistance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncology Research	6. 最初と最後の頁 139 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/or.2023.030190	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 Hanaki Yusuke, Shikata Yuki, Kikumori Masayuki, Okamura Mutsumi, Dan Shingo, Imoto Masaya, Irie Kazuhiro	4. 巻 675
2. 論文標題 In vivo anti-cancer activity of 10-methyl-aplog-1, a simplified analog of aplysiatoxin, and its possible signaling pathway associated with G1 arrest	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 19 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.07.008	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 Saito Shun, Funayama Kayo, Kato Wataru, Okuda Mayu, Kawamoto Meiko, Matsubara Teruhiko, Sato Toshinori, Sato Akihiko, Otsuguro Satoko, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Maenaka Katsumi, Shindo Kazutoshi, Imoto Masaya, Arai Midori A.	4. 巻 85
2. 論文標題 Dihydromaniwamycin E, a Heat-Shock Metabolite from Thermotolerant Streptomyces sp. JA74, Exhibiting Antiviral Activity against Influenza and SARS-CoV-2 Viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2583 ~ 2591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00550	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 Ikeda Hiroaki, Kawami Misato, Imoto Masaya, Kakeya Hideaki	4. 巻 75
2. 論文標題 Identification of the polyether ionophore lenoremycin through a new screening strategy for targeting cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 671 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00571-1	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 Ohno Osamu, Iwasaki Arihiro, Same Kyouhei, Kudo Chihiro, Aida Erika, Sugiura Kazuya, Sumimoto Shimpei, Teruya Toshiaki, Tashiro Etsu, Simizu Siro, Matsuno Kenji, Imoto Masaya, Suenaga Kiyotake	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation of Caldorazole, a Thiazole-Containing Polyketide with Selective Cytotoxicity under Glucose-Restricted Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4547 ~ 4551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c01566	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 Tashiro Etsu, Nagasawa Yumi, Itoh Susumu, Imoto Masaya	4. 巻 534
2. 論文標題 Involvement of miR-3180-3p and miR-4632-5p in palmitic acid-induced insulin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111371 ~ 111371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2021.111371	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 Zhou Tao, Katsuragawa Misaki, Xing Tian, Fukaya Keisuke, Okuda Toru, Tokiwa Toshiyuki, Tashiro Etsu, Imoto Masaya, Oku Naoya, Urabe Daisuke, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Cyclopeptides from the Mushroom Pathogen Fungus Cladobotryum varium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 327 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c00980	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 Kataura Tetsushi, et al, Imoto Masaya, et al & Korolchuk Viktor I.	4. 巻 57
2. 論文標題 Autophagy promotes cell survival by maintaining NAD levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 2584 ~ 2598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2022.10.008	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 該当する

1. 著者名 Sasazawa Yukiko, Souma Sanae, Furuya Norihiko, Miura Yoshiki, Kazuno Saiko, Kakuta Soichiro, Suzuki Ayami, Hashimoto Ryota, Hirawake Mogi Hiroko, Date Yuki, Imoto Masaya, Ueno Takashi, Kataura Tetsushi, Korolchuk Viktor I, Tsunemi Taiji, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji	4. 巻 41
2. 論文標題 Oxidative stress induced phosphorylation of JIP4 regulates lysosomal positioning in coordination with TRPML1 and ALG2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e111476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111476	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 該当する

1. 著者名 Imoto Masaya	4. 巻 74
2. 論文標題 Approach toward molecular targeted therapy for cancer using microbial products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 601 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00458-7	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 Imoto Masaya, Fujimaki Takahiro, Saito Shun, Tashiro Etsu	4. 巻 74
2. 論文標題 Androgen receptor antagonists produced by Streptomyces overcome resistance to enzalutamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 706 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00453-y	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 Tashiro Etsu, Nagasawa Yumi, Itoh Susumu, Imoto Masaya	4. 巻 534
2. 論文標題 Involvement of miR-3180-3p and miR-4632-5p in palmitic acid-induced insulin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111371 ~ 111371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2021.111371	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5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 神経変性に対する創薬研究
3. 学会等名 第30回日本Cell Death学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 パーキンソン疾患治療薬シード化合物のケミカルバイオロジー
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 Chemical biology challenging refractory disease
3. 学会等名 4th RIKEN-KRIBB Chemical Biology Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 ケミカルバイオロジーで挑む去勢抵抗性前立腺癌治療薬シード探索
3. 学会等名 第61回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井本正哉
2. 発表標題 Identification of BRUP-1 as a drug-seed for Parkinson's disease.
3. 学会等名 Chemical Biology Initiative 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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・客員教授 (32620)	
研究分担者	野田 展生 (Noda Nobuo) (40396297)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	

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