2　選択的オートファジーの自在制御による疾患抑制	有本　博一

【目的】これまでの低分子量医薬品は、酵素や受容体を主な標的分子としてきた。これらは基質となる化合物と結合する狭い領域を有しているため、低分子で「ふた」をすると「阻害薬」などが創製できる。このアプローチの課題はヒトプロテオームのうち酵素機能を持つものが 2 割程度に過ぎないことである。足場タンパク質などとして働く大半のタンパク質は、低分子創薬の対象から外れている。

阻害作用に大きく依存した従来型低分子医薬の欠点を克服するアイデアとして、標的タンパク質を選択分解する手法がある。本研究では、選択的オートファジーを利用して標的を分解する新手法 AUTAC の確立に取り組んだ。

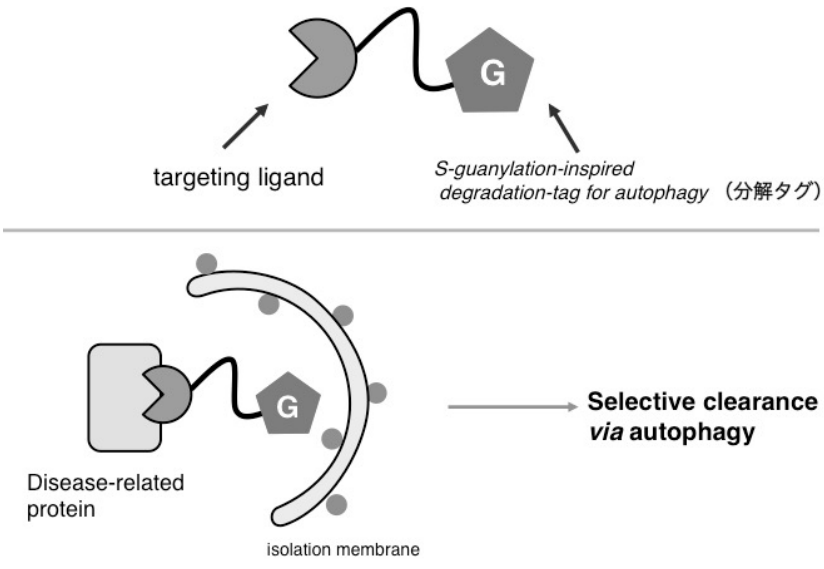
【方法】S-グアニル化は、A 群レンサ球菌の選択的オートファジーにおいて分解対象を示すタグとして働くことが示唆されている（伊藤、斎藤ら Mol Cell 2013）。そこで、S-グアニル化構造を元にして設計した分解タグと、疾患標的分子に結合する標的化リガンドをリンカーで結合して各種のキメラ分子（AUTAC）を合成した。助成期間においては、主に機能不全ミトコンドリアの分解を行う AUTAC に重点を置いて検討した。ミトコンドリアの分解は、生細胞イメージング、およびミトコンドリア局在タンパク質（Tom20、Hsp60、UQCRC1 など）のレベル変化を免疫ブロット法で評価した。

【結果】ミトコンドリア外膜に分解タグを導入するため、ミトコンドリア局在タンパク質と EGFP-ハロタグとの融合タンパク質（mito-HT）を HeLa 細胞に一過性発現させた。分解タグを含むハロタグリガンドを投与すると、ミトコンドリア周囲にユビキチン鎖の集積が観測された。しかしながら、健常な HeLa 細胞では、このときミトコンドリアタンパク質レベルは減少しなかった。一方、OPA1 遺伝子の RNAi や CCCP 処理によってミトコンドリアが断片化する条件に置くとミトコンドリアタンパク質の顕著な減少が確認された。続いて、ハロタグ法を用いずにミトコンドリア外膜に直接分解タグを送達できる AUTAC4 を開発し、同様なミトコンドリア分解の結果を得た。

21 番染色体のトリソミーであるダウン症由来繊維芽細胞では、ミトコンドリア機能が低下していることが報告されている（A. Izzo ら Hum Mol Genet 2017）。

ダウン症由来 Detroit532 細胞にハロタグ法もしくは AUTAC4 を用いて分解タグを導入したところ、断片化したミトコンドリアの排除が進み、ミトコンドリア長、ネットワーク数、ATP 産生量が改善した。

Autophagy-targeting chimera（AUTAC）



2. 選択的オートファジーの自在制御による疾患抑制

有本　博一

東北大学 大学院生命科学研究科 分子情報化学分野

Key words：オートファジー，疾患，ミトコンドリア

緒　言

オートファジーは細胞内の主要な分解系のひとつで1950年代ごろ研究が始まった。オートファジーの観察には当初電子顕微鏡の利用が必須であり、生きたままの細胞を使った観察ができなかった。このため1990年ごろまでは発表される論文の数も少なく脚光を浴びたとは言えない。大隅良典教授らは、酵母を使ってオートファジーに必要な遺伝子（現在ではAtgと呼ばれる）を明らかにし、現代生物学の手法を使ってオートファジーを観察することを可能にした。現在では年間数千報もの論文が発表されるホットな研究領域に育っている。

オートファジーは一般には飢餓応答の働きがよく知られている。一方で、Atgタンパク質を部分的に欠損させたマウスでは、神経細胞にタンパク質凝集体が蓄積する。このことはオートファジーが神経変性疾患の抑制にも一役買っていることを示唆する。また、肝臓に腫瘍が形成するという報告もある。特に多細胞生物においては、ひとつひとつの細胞が飢餓に陥る可能性は低く、有害物の排除というオートファジー機能がむしろ重要であるとも指摘されている。しかしながら、現時点でオートファジーを主な作用機序とする医薬品は開発されていない。理由として、よく挙げられるのは次の3点である。1）現在、ヒトにおいてオートファジーのレベルを直接評価する方法が存在せず、仮にオートファジー制御薬を開発しても、その効果を評価できない、2）癌の治療においては、オートファジーの細胞保護的効果が妨害となることがある、3）マクロオートファジーは分解物選択性に乏しく、特定の分子標的を狙うことが多い現代の創薬とマッチしない。筆者は3）がオートファジーの創薬応用を阻む主原因と考えている。

マクロオートファジーの一部は、有害物を選択的に分解することが知られている。選択的オートファジーでは、分解を受けるカーゴと隔離膜との間をとりもつオートファジーアダプターが関与する。代表的なアダプターとしてp62/SQSTM1などがあり、これらはカーゴを修飾するユビキチン鎖を認識するものが多い。しかしながら、選択的オートファジー機構の理解は未だ不十分と言わざるを得ず、疾患抑制への応用は進んでいない。既存のオートファジー 誘導薬の中には、分解物選択性を示すものは知られていない。

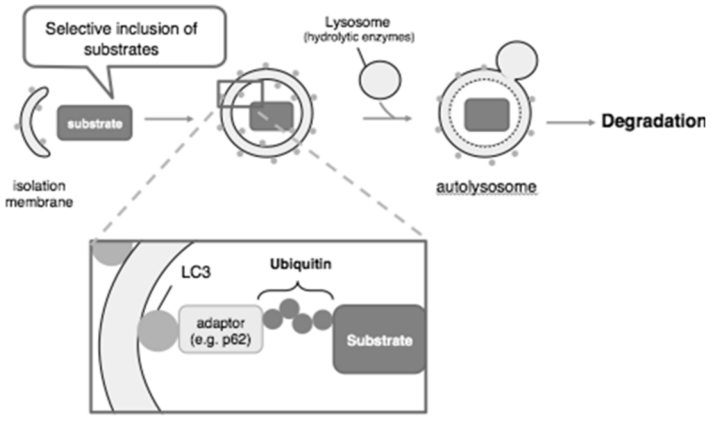


図1. 選択的オートファジーの代表的な機構
成長する隔離膜と分解を受ける基質の間をオートファジーアダプターやポリユビキチン鎖が仲立ちするため、分解選択性が発現する。

このような背景から、選択的オートファジー機構の深い理解こそが、医薬応用の鍵になると筆者は考えた。そこで、選択性が認められている細菌排除（抗菌オートファジー）に着目した。2004 年に中川、吉森両博士は、細胞内に侵入した A 群連鎖球菌（GAS）が GcAV と呼ぶオートファジー様機構で分解排除されることを示している［1］。この GcAV の周囲を詳しく観察したところ、GcAV にトラップされる前に細菌周囲が S-グアニル化という修飾を受けることを見出した［2］。S-グアニル化は、2007 年に澤、赤池らと筆者が報告した内因性のタンパク質修飾反応である［3］。S-グアニル化と細菌排除の選択性に深い相関が見られたことから［2］、S-グアニル化は選択的オートファジーを誘引するタグとして機能することが推定される。

選択的オートファジーを細胞内の局所に誘引する分解タグは、タンパク質性のポリユビキチン修飾を除いて知られていない。もし、S-グアニル化が分解タグとして働くとすれば、低分子のタグとして初めての例になる。そこで、HeLa 細胞や A549 細胞内に強制発現させた、蛍光性の EGFP タンパク質をモデル基質として選択的分解を試みた。すなわち、Promega 社が市販している Halo tag 技術を使い、細胞内の EGFP タンパク質に S-グアニル化（cGMP 修飾）を導入したところ、EGFP の局在が変化し、ドット状の輝点を形成することがわかった。この輝点は生細胞イメージングにおいて LC3 タンパク質やポリユビキチンと共局在する。さらに免疫ブロットにおいて S-グアニル化された EGFP タンパク質レベルの低下が観測された。これらのことから S-グアニル化は他の細菌由来成分の関与がなくとも単独で選択的オートファジー分解を誘導できるタグであることが検証された（論文未発表）。

これらの結果は、S-グアニル化を利用する疾患抑制法の可能性を示唆するが、課題も明らかになった。我々の身体にある S-グアニル化は、内因性ヌクレオチドである 8-ニトロ cGMP に由来する。S-グアニル化の cGMP 構造は、負電荷を持つため、細胞外から投与する際には細胞膜透過性に問題がある。さらに、cGMP 構造はプロテインキナーゼ G に結合して活性化する。これらの課題を解決するには、医薬的な利用に適する様に S-グアニル化構造を改変した新たなタグを開発する必要があった。そこで、構造活性相関研究を実施し、S-グアニル化のリボース部分を脂肪族置換基に変更したタグを見出した（論文未発表）。

本研究では、これらの未発表知見を基にして、疾患に関連する細胞内基質の選択的分解を検討した。

方法および結果

1. AUTAC の設計

緒言で述べたように S-グアニル化単独で選択的オートファジーを誘導できるため、分解タグを疾患標的に結合する標的化リガンドと組み合わせたキメラ分子（Autophagy-targeting chimera: AUTAC）を設計した。リガンドと分解タグはポリエチレングリコール鎖など水溶性に優れたリンカーで結合した。

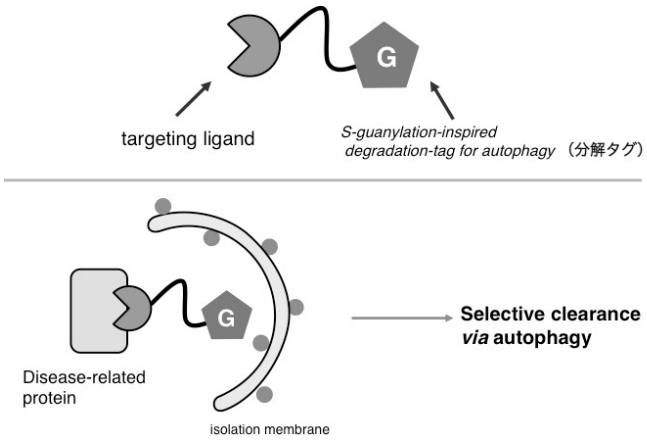


図 2. AUTAC（上）と疾患原因タンパク質の選択的オートファジー分解（下）
S-グアニル化が単独で選択的オートファジーの目印になるという仮説にもとづいて、S-グアニル化からヒントを得て開発した分解タグと、標的タンパク質の低分子リガンド（標的化リガンド）を組み合わせたキメラ分子 AUTAC を考案した。

2. 細胞内のタンパク質を標的とするAUTAC1、AUTAC2、AUTAC3の効果

AUTAC1は、メチオニンアミノペプチダーゼ2（MetAP2）に結合するAUTAC分子である。MetAP2に共有結合するリガンドとして天然物フマギリンなどが知られている。HeLa細胞にAUTAC1を1～100μMの濃度で投与したところ、MetAP2の細胞内レベルが対照群に対して有意に低下した。この効果はリソソーム阻害剤バフィロマイシンA1によって抑制されることから、（リソソーム融合を必要とする）オートファジー機構であることが示唆された。

AUTAC2は、FKBP12タンパク質に結合するように設計されたAUTAC分子である。FKBP12には天然物FK506や各種の人工誘導体が結合する。AUTAC2は予想通り、FKBP12レベルを低下させた。

AUTAC3は、抗がん剤の標的としても知られるBRD4タンパク質に結合するように設計されたAUTAC分子である。BRD4に結合する低分子リガンドとしてBradnerらによって開発されたJQ1などが知られている。AUTAC3は、細胞内のBRD4タンパク質のレベルを抑制したが、上記のAUTAC1,2と比較すると効果にばらつきが見られた。その理由は今後も検討していく必要があるが、BRD4タンパク質が主に核内に局在することが原因と考えている。オートファジーは核の内部では起きないため、観測されたBRD4の分解は細胞分裂期に核膜が消失するタイミングで進行する可能性がある。

核内移行シグナルNLSを含むNLS-EGFP-HaloTagタンパク質、および、核外に移行するNES-EGFP-HaloTagタンパク質をHeLa細胞に発現させ、緒言に述べたのと同様の方法で分解タグを導入したところ、前者のEGFP蛍光レベルは、ほとんど低下しなかった。AUTAC3を用いた時の結果との関係を今後さらに検討していく予定である。

3. AUTACによるミトコンドリア分解

ユビキチン–プロテアソーム系（UPS）が細胞内の可溶性タンパク質を分解するのに対して、マクロオートファジーは凝集性タンパク質、タンパク質以外の生体高分子、病原体など広範な基質を分解することができる。筆者らのAUTAC法は、オートファジー特有の幅広い応用範囲を持つものと期待される。

そこで、本研究ではミトコンドリア分解に重点をおいて研究を進めた。ミトコンドリアの機能不全は、パーキンソン病などの神経変性疾患や老化において重要な原因となる。

4. HaloTag技術を使うミトコンドリア分解の誘導

ミトコンドリアの表面（つまり外膜）に分解タグを導入するため、HaloTag技術を利用した。ミトコンドリア外膜に局在が報告されているタンパク質とHaloTagタンパク質の融合タンパク質をHeLa細胞に発現させた。ここにS-グアニル化タグを含むHaloTagリガンドを投与して、ミトコンドリア表面に分解タグを導入した。免疫細胞化学によって観察すると、ミトコンドリア（Hsp60抗体で染色）とK63型ユビキチン鎖の共局在が観測された。すなわちAUTACは、上述のタンパク質分解用AUTACと同様にミトコンドリア周囲にユビキチン化を誘導できることがわかった。

ミトコンドリアの分解は、ミトコンドリア内の各所に存在するタンパク質（外膜Tom20、内膜Hsp60、マトリックスUQCRC1）のレベルを同時にモニターすることによって判断できる。当初の予想に反して、健常細胞のミトコンドリアに分解タグを導入した場合にはミトコンドリアタンパク質群の減少は観測されなかった。オートファゴソームの直径（0.5～1μM）に対して、線状に連結した健常ミトコンドリアのサイズは大き過ぎる。これが原因と考え、ミトコンドリアを断片化させる条件で改めて実験を行なった。まず、ミトコンドリア内膜の融合に関わるOPA1をノックダウンしたところ、分解タグの導入によって上記のミトコンドリア局在タンパク質レベルが対照群の1/2程度に低下した。このことはミトコンドリアサイズが分解効率に関係するという仮説を支持すると考えられる。ミトコンドリア毒であるCCCP処理を行うと、膜電位の消失に伴ってミトコンドリア断片化が進行することが知られている。CCCP処理条件下でミトコンドリア外膜に分解タグを導入したところ、同様のミトコンドリアタンパク質レベル低下が見られた。CCCP処理は、ミトコンドリアから細胞質へのcytochrome Cの放出を介してアポトーシスを誘導するが、分解タグ導入によって細胞死が抑制されることも明らかになった。

5. HaloTag 技術を用いないミトコンドリアの AUTAC 分解

ミトコンドリア外膜に局在する内因性タンパク質の結合リガンドを用いれば、HaloTag 法を用いることなく分解タグを送達することができる。このためにキメラ分子 AUTAC4 を開発した。AUTAC4 は HaloTag 法と異なり、ミトコンドリア外膜と共有結合は形成しない。このため、現状では HaloTag 法よりも、やや効果が弱い。しかし、1μM の AUTAC4 を HeLa 細胞に 10 時間処理したのち、10μM CCCP で 2 時間処理したところ対照群（AUTAC4 処理なし）に比べて有意に細胞死を抑制することがわかった。この細胞死効果は、リソソーム阻害剤であるバフィロマイシン A1 で消失した。

6. AUTAC4 のダウン症患者由来線維芽細胞に対する効果

ダウン症は、21 番染色体がトリソミーとなることによって生じる。21 番染色体にはミトコンドリアタンパク質もコードされていることから、その過剰発現はミトコンドリア機能不全を介して種々の症状を引き起こす。片方がダウン症の双子から採取した初代繊維芽細胞を観察した 2017 年の報告によると、ダウン症患者ではミトコンドリアの顕著な断片化が存在する［4］。このことから AUTAC 法の適用によりダウン症細胞のミトコンドリア機能を改善できるか興味を持った。

Detroit 532 細胞を入手して観察を行ったところ、細胞の増殖速度は遅く、ミトコンドリア形態の断片化が進んでいた。また、JC-1 染色を用いると、ダウン症由来 Detroit 532 細胞では、（外部からミトコンドリア毒などを添加しない状態においても）膜電位の低下が見られた。このことは 2017 年の論文と符合する結果と思われる。次に 10μM AUTAC4 で 3 日間処理したところ、Detroit 532 細胞の膜電位は改善し、ミトコンドリア長さ、ミトコンドリア同士の結合（ネットワーク数）の改善が見られた。

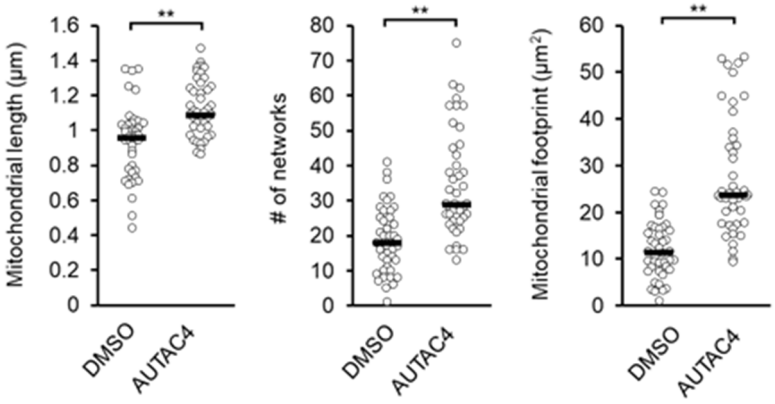


図 3. Detroit 532 細胞に対する AUTAC4 の効果

細胞は、10μM AUTAC4 で 3 日間処理した。ミトコンドリアは MitoTracker Green で染色して可視化し蛍光顕微鏡で観察した。図は 40 細胞について解析した結果を各細胞ごとにプロットした結果である。水平方向の線は平均値を表す。Wilcoxon rank sum test により解析して $p < 0.01$ の場合に**と表示した。

AUTAC4 処理前のミトコンドリアを MitoTracker Red を用いて共有結合性標識しておき、処理によるミトコンドリア分解（赤色蛍光の減少）を観察した。約 1 日間の AUTAC4 処理によって、標識されたミトコンドリアは 3 割程度まで分解された。一方、全ミトコンドリア量は、処理条件においても一定に保たれていることがわかった。つまり、AUTAC4 による断片化ミトコンドリアの分解が始まると、新たにミトコンドリア生合成が開始されることがわかった。ダウン症の原因である 21 番染色体のトリソミーは解消されていないにも関わらず、AUTAC4 処理によって健常な形態のミトコンドリアが生合成されることは大変興味深い。

考　察

本研究では、S-グアニル化にヒントを得て開発された低分子量の分解タグを利用したキメラ分子 AUTAC について検討した。特定のタンパク質ならびに断片化したミトコンドリアを狙ってオートファジー分解することができた。

これまでの低分子医薬品は、標的タンパク質のごく狭いエリアに結合して機能を発揮してきたので、必然的に酵素や受容体などに適用が制限されている。現在、ヒトプロテオームの約 8 割がアンドラッガブルと呼ばれ低分子医薬の対象になっていない。特定のエリアに「フタをする」という機構にこだわる限り、この状況を変えるのは難しいだろう。

一方、最近では薬剤が結合する標的タンパク質を丸ごと分解する新たな創薬手法に注目が集まっている。この分野の開拓者は Yale 大学の C. Crews 教授であり、手法は一般的に PROTACs と呼ばれている。PROTACs は標的分子のユビキチン化を促進し、プロテアソーム分解に導く。PROTACs の効果は、基礎医学研究で汎用される RNAi などのノックダウン法の効果と類似しており、基礎研究で見出された創薬標的をシームレスに狙うのに便利である。

今回研究した AUTAC 法は、キメラ分子を利用して細胞内物質を分解する点で PROTACs に類似性を持つ。しかし、PROTACs がプロテアソーム分解に適した可溶性タンパク質のみを対象とするのに比べると、より広い応用性が期待できる。今回の報告では、AUTAC がオルガネラ（ミトコンドリア）を分解できることを述べたが、オートファジー機構を用いる AUTAC の特徴をよく表している。このように AUTAC は PROTACs などの手法と共に、これまでの低分子医薬品の設計法を大きく変貌させる可能性があると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、東北大学大学院生命研究科分子情報化学研究室において、学生諸氏の協力のもと実施された。Detroit 532 細胞は JCRB 細胞バンクから、HeLa 細胞、A549 細胞、Atg5$^{-/-}$ MEF 細胞は理化学研究所　バイオリソース研究センターから分譲を受けたものである。研究費の支援を受けた上原記念生命科学財団に特に感謝申し上げる。また、本研究は 10 年間にわたる未公表の基礎検討に立脚されており、この間の公的研究費による支援にも深く感謝する。

文　献

1）Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. Science. 2004 Nov 5;306(5698):1037-40. doi: 10.1126/science.1103966

2）Ito C, Saito Y, Nozawa T, Fujii S, Sawa T, Inoue H, Matsunaga T, Khan S, Akashi S, Hashimoto R, Aikawa C, Takahashi E, Sagara H, Komatsu M, Tanaka K, Akaike T, Nakagawa I, Arimoto H. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. Mol Cell. 2013 Dec 26;52(6):794-804. doi: 10.1016/j.molcel.2013. 10.024. Epub 2013 Nov 21.

3）Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, Akaike T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. Nat Chem Biol. 2007 Nov;3(11):727-35. Epub 2007 Sep 30. doi: 10.1038/nchembio.2007.33

4）Izzo A, Nitti M, Mollo N, Paladino S, Procaccini C, Faicchia D, Call G, Genesio R, Bonfiglio F, Cicatiello R, Polishchuk R, Pinton P, Matarese G, Conti A, Nitsch L. Metformin restores the mitochondrial network and reverses mitochondrial dysfunction in Down syndrome cells. Hum Mol Genet. 2017 Mar 15;26(6): 1056-1069. doi: 10.1093/hmg/ddx016.