

研究終了報告書

「創薬展開を見据えた新たな方向性をもつオートファジー研究」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：高橋大輝

1. 研究のねらい

既存の創薬は、疾患原因タンパク質の機能を抑制するものが大部分であり、タンパク質以外の標的に対する薬剤は非常に少ない。例えば、神経変性疾患の発症には、神経細胞内に生じる不溶化タンパク質の凝集体やミトコンドリアの異常が関わっている。このような疾患の治療には、これまでとは別のアプローチが必要である。特に、現代の高度高齢社会にある日本にとって、加齢関連疾患への対策は不可欠な課題であり、革新的な治療法が求められる。現状、それらの疾患に対する根本的治療法は確立されておらず、社会的需要に対して医薬開発が追いついていない。

そのような中、私は、オートファジー（細胞内の分解系のひとつ）を利用して、細胞内の異常あるいは過剰な分子を選択的に排除する薬剤「AUTAC」を開発した。この薬剤は、オートファジー分解の目印「S-グアニル化構造」を分解基質に運ぶ化合物であり、AUTACによりS-グアニル化が導入された基質はオートファジー分解を受ける。オートファジーは非常に守備範囲の広い分解系であるため、タンパク質のみならず、細胞内のあらゆる分子の分解が可能だ。実際、ミトコンドリアにS-グアニル化を届けるAUTACは、機能不全ミトコンドリアの分解を通じて、細胞保護効果を示した。

しかし、AUTACを医薬として応用するには物性面で懸念があり、次世代型のAUTACが必要である。新しい創薬標的を探すため、私は、S-グアニル化に基づくオートファジーの分子機構を調べることでヒントを得ようと考えた。また、この機構は、オートファジーの基質選択に普遍的に関わる可能性もあり、基礎科学の面からも非常に興味深い。

2. 研究成果

(1) 概要

本ACT-X研究では“AUTACの作用機構の解明”を主要課題に掲げた。S-グアニル化がオートファジー機構を呼び寄せる分子機構が分かれば、創薬に有用な新たなオートファジー制御起点を見出す手がかりとなると考えたからだ。

実際、申請者は、新たなオートファジー制御起点としてタンパク質Xを同定した。タンパク質Xは、AUTAC基質に集積する因子の探索から見出した。CRISPR/Cas9システムを利用してタンパク質X欠損細胞を作出したところ、AUTACによる分解は完全に抑制された。さらなる検証の結果、分解基質はタンパク質Xとの結合に基づいて液滴を形成（相分離）することが明らかになった。液滴がオートファジー進行のプラットフォームになるとの報告もあり、タンパク質Xと基質の結合を媒介する薬剤が新たなオートファジー制御薬となると考えられる。

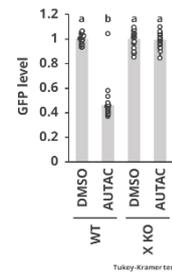
AUTACの実用に向けた研究にも取り組んだ。創薬以外の研究者にも広く利用できるようなAUTACの創出や、マウスや線虫を使った薬物動態や薬効の評価を行っている。

(2) 詳細

研究項目①: S-グアニル化認識機構の解明

➤ S-グアニル化を認識するタンパク質 X の発見

S-グアニル化に基づくオートファジーの機構を明らかにするにあたり、私はまず、S-グアニル化基質に集積する因子の同定を試みた。その結果、タンパク質 X (タンパク質名非開示) がヒットした。欠損細胞株を作成し、AUTAC の作用に対する影響を調べたところ、分解活性がほぼ完全に抑制された。



➤ S-グアニル化とタンパク質 X との相互作用に関する解析

次に、タンパク質 X 上の S-グアニル化との相互作用位置について検証した。リコンビナントタンパク質を用いた近接化ラベル化法、トランケート変異体の解析を通じて、位置を特定した。

➤ タンパク質 X 陽性起点の流動性解析

タンパク質 X は相分離を起こす性質をもつことが知られているため、AUTAC 処理下で生成するタンパク質 X 陽性輝点内部の分子の流動性を検証した。その結果、この起点は“ゲル”の性質をもつことが分かった。オートファジー基質を捕捉する隔離膜はゲル状のドロップレットに沿って伸長するとこの先行研究もあり、関連性を調べている。

➤ タンパク質 X 陽性起点の観察

さらに下流の機構を調べるため、他の関連因子とのかかわりを免疫細胞化学、生細胞観察により解析した。

研究項目②: AUTAC の医療応用に向けた検討

AUTAC の医療応用のためには、幅広い疾患領域の研究者が容易に検証できる基盤をつくる必要があると考え、多くの研究者が利用可能な AUTAC を設計・合成した。課題となるのは、狙った分解基質に対して有効な標的化リガンドが不足していることである。この問題に対応し、bump-and-hole法と呼ばれる分子設計法により創出されたリガンド(SLF^{F36V})を利用した(Nabet et al., Nat. Chem. Biol., 2018)。SLF^{F36V} は、タグタンパク質 FKBP^{F36V} と特異的に結合する。SLF^{F36V}(F36V-AUTAC)を使えば、FKBP^{F36V} と融合した基質を分解できる。F36V-AUTAC ひとつで様々な基質に利用でき、短期間で多くの基質の分解検討が可能である。それぞれの研究者は自身が興味をもつ標的と FKBP^{F36V} の融合タンパク質の発現ベクターをつくるだけでよい。得られた情報は、今後、創薬科学者に分かりやすい形で公開していく予定である。

3. 今後の展開

当初、研究項目②で計画していた「AUTAC による凝集体の排除」、研究項目③として計画していた「相分離の自在制御」については、検討が済んでおらず今後成果発表していきたい。本研究において、AUTAC 作用における必須因子タンパク質 X を同定したが、今後は、この成果に関わる以下 2 つのプロジェクトを推進していきたい。

➤ タンパク質 X のバインダーを利用した次世代型 AUTAC の開発

冒頭にも述べたように、AUTAC 技術は加齢関連疾患に対する創薬現場で非常に大き

公開

な注目を浴びている。AUTAC のドラッグライクネスを高めるための、新たな創薬標的としてタンパク質 X は有効であると考えられる。来年度には、タンパク質 X に結合する化合物を探索し、新たな AUTAC 分子を創出したい。

➤ 相分離制御薬の開発

タンパク質 X の発見を応用し、分解を伴わない相分離制御薬を開発に挑戦する。最終的には相分離の ON/OFF を制御する化合物を開発し、新たな創薬法を確立したい(今後 5 年程度で)。

4. 自己評価

主要課題「AUTAC の作用機序の解明」に関しては、本研究期間内で十分に成果をあげられたと考えている。オートファジーの制御因子として新たにタンパク質 X というタンパク質を同定し、相分離を介して分解過程を進めることを突き止めた。この成果は、AUTAC の医薬応用を加速させる大きな鍵となり、今後につながる一歩である。

また“AUTAC の医薬応用”“相分離制御薬の開発(新たな創薬手法確立)”は、高度高齢社会の様々な課題に直面する日本において、必ず役立つと考えている。

オートファジーの目印として S-グアニル化を発見してから、独自に研究を進めてきたが、今後は様々な分野の研究者と協同し、AUTAC 技術の医薬応用に向けて研究を推進していく。一方、新たな薬剤創出を考慮し、タンパク質 X によるオートファジー経路に関する論文発表を見送った。この機構は、基礎科学の面でも興味深い発見であるため、できるだけ早期に、次世代型 AUTAC を創出し、論文として発表したい。なお、オートファジーにおける基質選択の機構に対する私の意見は、Cell Chemical Biology 誌と Biochemistry 誌に総説として書くことができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 研究期間全出願件数: 1件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	有本博一、高橋大輝
	発 明 の 名 称	オートファジーを誘導する化合物のスクリーニング方法
	出 願 人	東北大学
	出 願 日	2023/3/28
	出 願 番 号	PCT/JP2023/012
	概 要	オートファジーを誘起する化合物の新たなスクリーニング法についての発明を出願した。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Daiki Takahashi and Hirokazu Arimoto.



Selective autophagy as the basis of autophagy-based degraders.

Cell Chemical Biology. 2021, 28, 7, 1061–1071.

オートファジー分解による細胞清浄作用は、がんや神経変性疾患の抑制に寄与する。このことから、オートファジーを利用する創薬への期待が高まっている。しかし、タンパク質の相互作用に基づくオートファジー機構の知見から化合物を設計することは容易ではない。そこで、オートファジー機構を創薬化学向けに整理した総説を発表した。

2. Daiki Takahashi and Hirokazu Arimoto.

p62 Phase-Separation as the Foundation of Autophagy-Based Degraders.

Biochemistry. 2022, DOI: 10.1021/acs.biochem.2c00252.

本 ACT-X 研究で、S-グアニル化にもとづくオートファジーが相分離を介して進むことが示された。この記事では、この研究成果に基づき、相分離を介したオートファジー制御薬の可能性について記述した。

3. 高橋大輝、有本博一

選択的オートファジーを自在に制御できる分子 AUTAC の発明と応用可能性

日本薬学会 医薬化学部会 機関誌「MEDCHEM NEWS」、印刷中

AUTAC の開発戦略と、オートファジーデグレーダー開発について日本語でまとめたセミナー記事を執筆した。

4. 高橋大輝

LIFESPAN(ライフスパン)老いなき世界

日本薬学会 医薬化学部会 機関誌「MEDCHEM NEWS」、印刷中

「老化」の話題について BOOKS 紹介記事を執筆した。