

# 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

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

### 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。

加速フェーズ期間では、特に、AUTACの作用機構解明に力を入れ、タンパク質Xがどのようにオートファジー経路に関与するのか詳細に調べた。これまでの研究期間で得た、タンパク質Xの局在制御、他の因子との相互作用など、研究の取っ掛かりとなるデータを活用して進めた。

### 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。

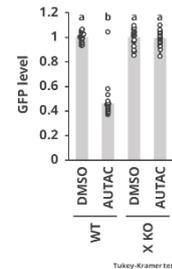
AUTAC の実用に向けた研究にも取り組んだ。創薬以外の研究者にも広く利用できるような AUTAC の創出や、マウスや線虫を使った薬物動態や薬効の評価を行っている。

## (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。

### (以下、加速フェーズでの成果)

➤ タンパク質 X はオートファジー受容体 p62 との相互作用を介して X-p62 ゲルをつくる  
 選択的オートファジーにおける基質認識はオートファジー受容体と呼ばれるタンパク質が分解基質に結合することによって保証されている。p62 はユビキチン陽性のゲル状構造を形成し、隔離膜上に発現する LC3 と結合することが知られている。基質を連れたタンパク質 X は p62 と直接相互作用することにより、p62 ゲル内に入り込む(タンパク質 X は p62 ゲルの client 因子のひとつである)と考えられる。

#### ➤ X-p62 ゲルには RNA が集積する

タンパク質 X は、AUTAC の作用のために RNA が関与している可能性がある。細胞質に RNase を発現させたところ、AUTAC による標的タンパク質分解が抑制された。また、蛍光ラベルされた RNA を細胞内に導入したところ、AUTAC 関連構造に局在した。これらの結果は、AUTAC 作用に RNA が関与することを示唆する。RIP-seq を使って、AUTAC 処理時にタンパク質 X と結合する RNA の同定にも取り組んだ。

➤ タンパク質 X は抗菌オートファジーにおいて重要である

グアニル化を起点とするオートファジーは、もともと、A群連鎖球菌 (GAS) のオートファジー分解機構の研究で発見された。この経路におけるタンパク質 X の重要性を検証した。タンパク質 X が機能しない細胞では、GAS のオートファジーによる排除が著しく抑制された。また、GAS 感染下タンパク質 X は GAS 周辺に集積し、流動性をもつ層を形成した。タンパク質 X の集積は、オートファジー開始複合体の構成要素 FIP200 欠損細胞でも観察された。このことから、タンパク質 X の集積がオートファジー開始系に影響することが示唆された。オートファジーは、様々な分子の分解に関わるため、タンパク質 X オートファジーの基質選択に普遍的に関わる因子なのかどうか検証したが、タンパク質 X が関わるオートファジーは細菌排除だけであった。文献を調査すると、タンパク質 X はウイルス感染に対する応答とも関係しており、自然免疫応答の文脈での機能が示唆される。

研究項目②: AUTAC の医療応用に向けた検討

➤ 汎用 AUTAC の創出

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<sup>F36V</sup>)を利用した(Nabet et al., Nat. Chem. Biol., 2018)。SLF<sup>F36V</sup>は、タグタンパク質 FKBP<sup>F36V</sup> と特異的に結合する。SLF<sup>F36V</sup>(F36V-AUTAC)を使えば、FKBP<sup>F36V</sup>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<sup>F36V</sup> 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。

(以下、加速フェーズでの成果)

➤ 100 倍高い分解活性を示す AUTAC

既存の AUTAC は分解効果が出現するのに、10 μM 程度の薬剤濃度が必要であった。動物での応用を考えると、さらなる活性向上が求められる。企業との共同で、数十種類の AUTAC 誘導体を合成し、第二世代 AUTAC を創出した。第二世代 AUTAC は既存のものとは比べ 100 倍程度活性が向上した。この成果は、Journal of Medicinal Chemistry 誌に報告した。

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。加速フェーズ期間を通じて、当初イメージしていた主要課題「AUTAC の作用機序の解明」の終着点よりもよりインパクトの高い研究ができた。オートファジーの制御因子として新たにタン

パク質 X が p62 と相互作用することにより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る上、自然免疫系に関する基礎科学においても今後につながる一歩である。

自然免疫におけるタンパク質 X の重要性に関する論文とタンパク質 X と p62 の相互作用を介した相分離に関する論文を準備しており、順次投稿する予定である。

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。そのための一歩として、既存の AUTAC よりも活性の高い第二世代 AUTAC を加速フェーズ期間中に Journal of Medicinal Chemistry 誌に報告した。この成果は、今後の AUTAC の展開において大きな情報を与えている。

➤ 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。その手掛かりとなる成果として、分解活性の高い第二世代 AUTAC の創出は意義深いと考えている。

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

研究期間累積件数: 2件(加速フェーズ実施後更新)

## 1. Second-Generation AUTACs for Targeted Autophagic Degradation.

J. Med. Chem. 66, 12342–12372 (2023) DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00861

Daiki Takahashi, Taiichi Ora, Shigekazu Sasaki, Naoki Ishii, Toshio Tanaka, Takumi Matsuda, Mutsuki Ikeda, Jun Moriyama, Nobuo Cho, Hiroshi Nara, Hironobu Maezaki, asahiro Kamaura, Kenichiro Shimokawa, Hirokazu Arimoto

(概要) 2019年に発表したAUTACは効果を示す濃度が10–100 μMと高く、将来医薬応用を考える場合、処理濃度を大幅に下げることが求められた。この論文では、数十のAUTAC誘導体を合成し、標的タンパク質の分解活性の評価を行った。その結果、既存のAUTACと比較して100倍程度低い濃度で同等の分解活性を示す第二世代AUTACを創出することに成功した。

## 2. C. elegans ATG-5 mutants associated with ataxia.

microPublication biology DOI: 10.17912/micropub.biology.000792

Azusa Yugeta, Hiroki Arai, Daiki Takahashi, Nami Haruta, Asako Sugimoto, Hirokazu Arimoto

(概要) グアニル化が関与するオートファジーの動物個体での研究として、マウスや線虫の利用を計画した。オートファジー分解を明確に観察するため、オートファジー必須因子ATG-5の欠損株、変異株の作出を行っている。その中で、ataxiaに関連するATG-5変異体を作成することに成功したため、表現型に関する基礎的データを取得し報告した。ACT-X研究期間中に主要課題から派生した研究成果である。

## (2) 研究期間全出願件数: 1件(特許公開前のもも含む)

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)

## ➤ 学会発表

## ✦ 抗菌オートファジーに着想を得た創薬技術 AUTAC

高橋大輝

日本化学会 第101回春季年会 中長期的テーマシンポジウム、2021年3月19日

## ✦ オートファジーにもとづくデグレーダーの開発

高橋大輝

第12回スクリーニング学研究会 ワークショップ、2021年11月26日

(以下、加速フェーズでの成果)

- ✦ 基質特異的なオートファジー分解を誘起する手法  
高橋大輝、芳賀春菜、山本真瑠、横坂春、有本博一  
日本ケミカルバイオロジー学会 第 17 回年会、2023 年 05 月 30 日
- ✦ 選択的オートファジーの化合物による制御  
高橋大輝、有本博一  
第 15 回オートファジー研究会、2023 年 11 月 29 日
- 総説
  - ✦ Selective autophagy as the basis of autophagy-based degraders.  
Cell Chemical Biology 28 1061–1071 (2021) DOI: 10.1016/j.chembiol.2021.05.006  
Daiki Takahashi and Hirokazu Arimoto.  
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。
  - ✦ p62 Phase-Separation as the Foundation of Autophagy-Based Degraders.  
Biochemistry 62 559–560 (2023) DOI: 10.1021/acs.biochem.2c00252  
Daiki Takahashi and Hirokazu Arimoto  
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。さらに、その過程でタンパク質 X が、S-グアニル化された分解基質と結合することが分かった。タンパク質 X に結合する化合物は新たな AUTAC の創出につながるため、この情報の公開を敢えて控えている。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。
  - ✦ 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」32 201–206 (2022)  
高橋大輝、有本博一  
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。
- 著作物
  - ✦ 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」32 222 (2022)  
高橋大輝
- ワークショップ
  - ✦ 第 12 回 スクリーニング学研究会 WS1: Targeted Protein Degradation  
ファシリテーターとして  
2021 年 11 月 26 日