

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「新たなる臓器保護剤の開発に向けた
ATP 産生制御の構造生命科学」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：高島 成二
(大阪大学生命機能研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

動物の活動においてもっとも重要なエネルギー源である ATP は、ミトコンドリアで酸化的リン酸化と呼ばれる化学反応によって合成される。その合成過程においては、まず電子伝達系と呼ばれる分子群が働く。電子伝達によって作成されたミトコンドリア内膜内外でのプロトン濃度勾配は、ATP 合成酵素の回転エネルギーに変換され ATP が合成される。

当研究室ではこの酸化的リン酸化酵素システムを活性化させる分子である HigD1 と G0s2 を発見した。HigD1 は電子伝達の最終課程である Cytochrome c oxidase (以下 COX と略す)に、G0s2 は ATP 合成酵素に直接結合し、それぞれを活性化させる。本事業は、この 2 つの酸化的リン酸化活性化タンパク質の作用メカニズムを分子構造学的に解明し、酸化的リン酸化酵素を創薬標的とした新たな治療薬開発を行うことを目的として開始された。

まず HigD1 が COX の基質である cytochrome c との結合親和性を変化させないことを見出し、COX 分子にアロステリック活性化の構造基盤が存在することを明らかにした。次に、理研・白水グループとの共同研究により HigD1 の結合により COX 分子全体の構造変化が起きることを電子顕微鏡にて明らかにした。また兵庫県立大学・久保グループとの共同研究により COX の活性化が heme a 周辺の構造変化で惹起されることを共鳴ラマン分光解析により明らかにした。

COX 活性化の分子機構はさらに低分子活性化化合物・阻害化合物の同定により詳細に解析された。精製度の高い COX を利用して活性のマルチスクリーニング系を独自に立ち上げ、COX の活性を HigD1 同様アロステリックに調節する活性化剤、活性阻害剤を同定した。次に、大阪大学青山らとの共同研究により、COX 阻害剤の投与によりプロトン輸送経路と考えられている 2 か所が構造変化をきたすことを X 線結晶構造解析により明らかにした。また COX 活性化剤は活性抑制剤とは異なる部位ではあるが近接した部位に結合していた。以上の構造情報により、議論の的であったプロトン輸送経路の存在場所を明らかにしたのみでなく、low spin heme を含む分子構造が COX 全体の活性を調節できる構造基盤を持つことを明らかにした。

COX 活性化剤は酸化的リン酸化酵素群の異常により惹起されるミトコンドリア病の治療薬となる可能性が示唆され、さらに選別された化合物においてミトコンドリア病モデルマウスに対する治療効果が得られた。さらに、哺乳類の COX にあたる微生物の終末オキシダーゼでも同様の活性調整部位が構造学的に保存されていることを見出し、COX 阻害剤を抗微生物薬として開発する事業に進展した。

一方、G0s2 は一回膜貫通型タンパク質であり構造学的アプローチは困難であったが、国立循環器病研究センター・北風グループとの共同研究により組織に Gos2 を発現させると強力な虚血耐性が与えられることが示され、その発現を上昇させる薬剤の臨床応用が期待された。そこで本事業では G0s2 の極端に短いタンパク質寿命に注目しその分解メカニズムの解明と分解を抑制する薬剤の開発を進めた。結果、G0s2 が E3 である RNF126 とシャペロン補助因子である Bag6 の複合体に認識され速やかに分解されることを明らかにした。そして Gos2 の分解を阻害する化合物をスクリーニングする系を立ち上げ、5 万の化合物ライブラリーから組織での G0s2 の分解を抑制する化合物の同定に成功した。この化合物は細胞内 ATP 濃度を上昇させることにより強い虚血障害に対する保護効果を示し、ミトコンドリア病や虚血性疾患の治療薬としての可能性が示された。また G0s2 と RNF126 の結合部位を明らかにし、そのごく近傍に同定した化合物が共有結合することを示し、一回膜貫通型タンパク質の分解機構の構造学的側面が解明された。

最後に HigD1, G0s2 遺伝子の異常がヒト疾患の原因となっている可能性を模索するため大阪大学の朝野と共同で行っていた循環器疾患の遺伝子解析では、新規のチャネル遺伝子異常が同定された。このチャネルの解析においても CREST で確立されたゼブラフィッシュをもちいた in vivo タンパク質機能評価系が使用され、変異の病因解明、チャネル特異的阻害薬の効果判定から医師主導治験にまで至った。

以上のように、本事業では特定の分子に焦点を当て、その分子を機能調節する化合物とともに構造情報を得て、生体内の機能を明確にするとともに、創薬事業につなげることに成功した。今後、化合物の臨床応用に向けた事業を進めるとともに、これらの化合物を使用してさらな

る生体分子機能の解明を図る。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

プロトン輸送の分子構造基盤の解明

概要: Cytochrome c oxidase=COX 活性をアロステリックに変化させるタンパク質あるいは化合物を用いた生化学的・構造学的解析により、哺乳類COXの活性調節に重要な構造部位の同定に成功した。さらに COX のオルソログである複数の細菌類電子伝達系 terminal oxidase においても同様の活性調節の構造基盤が存在することを立証した。これらの成果はプロトン輸送タンパク質の分子構造基盤の解明に資するのみでなく、新規の創薬開発につながった。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. ミトコンドリア病治療薬の開発

概要: 本事業での解析対象である HigD1, G0s2 の生理作用の構造基盤を解明するために新たに同定した化合物は、ミトコンドリアでの ATP 産生を増加させ、新規のミトコンドリア病治療薬・虚血性疾患治療薬としての可能性が示された。2 種の薬剤共に化合物展開を得て生体内での疾患治療効果が得られ、薬剤として前臨床段階にまで開発がすすめられた。

2. 薬剤耐性感染症治療薬の開発

概要: COX 阻害剤の結合部位の構造が菌類の terminal oxidase まで保存されているという知見から、COX 阻害剤の類似化合物の中から terminal oxidase 阻害剤を同定した。この阻害剤は、強い抗菌作用を示し、新規の抗菌剤開発事業がスタートした。薬剤耐性菌に対する抗菌剤は全世界で必須とされているが製薬会社が開発しない分野であるためアカデミアからの新薬提案は極めて重要と考えられ、今後も進めていきたい。

3. 新規の薬剤スクリーニング法の開発

概要: 本事業で開発されたタンパク質寿命アッセイ系は、近赤外線を利用した細胞境界検出法とともに新規性の強いスクリーニング系で、他のタンパク質にも適応可能な汎用性を有する。実際に、本スクリーニング系を使用した新規の癌治療薬候補の同定を開始している。

< 代表的な論文 >

A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2.

Kamikubo K, Kato H, Kioka H, Yamazaki S, Tsukamoto O, Nishida Y, Asano Y, Imamura H, Kawahara H, Shintani Y, Takashima S.

J Biol Chem. 2019 Aug 1. pii: jbc.RA119.008544. doi: 10.1074/jbc.RA119.008544.

PMID: 31371451

Higdla improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder

Nagao T, Shintani Y, Hayashi T., Kioka H., Kato H., Nishida Y., Yamazaki S., Tsukamoto O., Yashirogi S., Yazawa I., Asano Y., Itoh K., Imamura H., Suzuki T., Suzuki T., Goto Y., Seiji Takashima

The FASEB Journal (in press) 2019

Higdla is a positive regulator of cytochrome c oxidase.

Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata

Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 3;112(5):1553-8. doi: 10.1073/pnas.1419767112.
Epub 2015 Jan 20.
PMID:25605899

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

高島グループ

(1) 研究代表者: 高島成二 (大阪大学・生命機能研究科・教授)

(2) 研究項目

酸化的リン酸化酵素群に直接結合して ATP 産生を制御する 2 つの分子、HigD1 および G0s2 の構造学的機能解析を行う。HigD1 は呼吸鎖活性の律速を解除することが、G0s2 は ATP 合成酵素モーターのエネルギー障壁を低減することが明らかになっていた。その分子機構の構造学的解明と、正確な生体内での機能解析を行い、酸化的リン酸化の活性制御による ATP 産生増強剤という全く新規の治療薬の開発へつなげた。

HigD1 をはじめとする COX 活性制御物質による COX の活性制御機構の解明と化合物の臨床応用に向けて、精製条件の検定、標的であるシトクロム c 酸化酵素 (COX) の活性測定法の改良、COX 精製過程での HigD1 の生化学的動態解析、電子顕微鏡・X線結晶構造解析・共鳴ラマン分光法による COX 構造変化の解析を行った。G0s2 の分解課程から創薬展開も分担した。

青山グループ

(1) 主たる共同研究者: 青山 浩 (大阪大学・薬学研究科・准教授)

(2) 研究項目

細胞呼吸の末端酸化酵素として機能する COX と低酸素時に誘導される HigD1 との複合体の立体構造解明を目的とした。X線結晶解析法・電子顕微鏡・共鳴ラマンなどの分光法で得られた精密な構造情報から、低酸素時における呼吸鎖複合体の分子挙動を原子レベルで解明した。さらに COX 活性を制御できる候補分子との結合物の構造解析を行い、ヒト COX のホモロジーモデルを構築し、創薬リード化合物への展開を図った。

北風グループ

(1) 主たる共同研究者: 北風 政史 (国立循環器病研究センター・臨床開発部・部長)

(2) 研究項目

成犬やラット・マウスなど動物を用いた循環生理実験を中心に HigD1, G0s2 の機能解析を行った。さまざまな低酸素等病態条件下での HigD1, G0s2 の発現様式の検討、低酸素刺激等に対する保護効果との相関解析、HigD1, G0s2 の発現及び活性を制御する薬剤の生体内評価を行った。新たな低酸素モデルの確立も行う。さらにヒト遺伝子における HigD1, G0s2 遺伝子変異の解析及びヒト試料における HigD1, G0s2 の発現解析を実施した。

低酸素刺激時における G0s2, HigD1 等発現状態の検討を成犬等を用いて行った。またこれらのアッセイ系に必要な条件を満たす動物実験系の改良等を行った。また HigD1, G0s2 のヒト遺伝子上での変異検索を行った。

朝野グループ

(1) 主たる共同研究者: 朝野 仁裕 (大阪大学・医学系研究科・講師)

(2) 研究項目

生体内に FRET プローブを導入し、拍動を続ける心臓から得られる異なる波長の蛍光

比を正確に画像定量化する技術を開発した。ATP 感受性 FRET を使用したダイナミックな生体内 ATP 代謝計測法を確立し、HigD1, G0s2 およびその関連因子の機能解析を実行した。さらにヒト遺伝子における HigD1, G0s2 遺伝子変異の解析及びヒト試料における HigD1, G0s2 の発現解析を実施した。さらにこの事業に置いて同定された酸化的リン酸化を制御する化合物の機能アッセイを行った。生体内外での ATP 産生定量化技術の確立・洗練化をすすめるとともに、HigD1 及び G0s2 のヒトにおける変異解析を行った。

島田グループ

(1) 主たる共同研究者: 島田 敦広 (岐阜大学・応用生物科学部・助教)

(2) 研究項目

ウシ心臓からの COX 精製の洗練化技術を有するため、従来の方法では 2 量体しか精製不可能であったが、COX の一量体型の精製を大阪大学と共同で進めることにより HigD1 と COX の結合構造解析を進めた。独自に開発した COX 精製法によりウシ心臓から COX 一量体を精製した。

久保グループ

(1) 主たる共同研究者: 久保 稔 (兵庫県立大学・生命理学研究科・教授)

(2) 研究項目

COX 活性をアロステリックに制御する HigD1・COX 活性化剤・活性阻害剤による COX の構造変化をラマン分光法を使用して継時的に解析した。これにより COX における電子伝達とプロトン輸送の共役メカニズムを解明した。

ウシ酸化型・還元型 COX に HigD1・COX 活性化剤・活性阻害剤を加えることにより起こる COX の heme 周辺の構造変化をラマン分光法により解析した。これら制御剤の添加による COX の吸光波長の変化を測定し励起波長を決定後、制御物質添加後の散乱光を継時的に観察した。

白水グループ

(1) 主たる共同研究者: 白水 美香子 (理化学研究所・生命科学センター・チームリーダー)

(2) 研究項目

HigD1・COX 活性化剤・活性阻害剤と COX の混合物の構造解析を行う。これらの制御剤の結合部位を明らかにするとともに結合に伴う COX の構造変化を解析する。これにより化合物の構造展開を進めるとともに COX における電子伝達とプロトン輸送の共役メカニズムを解明した。高島グループから供給されるウシ COX と化合物・HigD1 の混合単分散サンプルを Arctica(E1 レベル)で観察する。十分な到達分解能が得られたサンプルは、さらなる解析を東京大学の Titan(E2 レベル)を使用して実行した。