

病原体に対する治療薬候補としてのオートファジー誘導ペプチドの同定

小路 早苗

1. はじめに

オートファジーは進化的に保存された細胞内タンパク質分解系で、シャペロン介在性オートファジー、ミクロオートファジー、マクロオートファジーの三つに分類することができる。その中でも一番研究が進んでいるマクロオートファジー（以降オートファジーと呼ぶ）は、半減期の長いタンパク質や細胞内オルガネラを分解する機構である。まず隔離膜を形成伸長し、膜の両端が融合して細胞質画分を包み込んだオートファゴソームを形成する。次にオートファゴソームはリソソームと融合し、二重膜の内膜と一緒に包み込んだ細胞質画分を分解する。

オートファジーは古くなったタンパク質や細胞内オルガネラを分解するために低レベルでは基本的にすべての細胞で起こっている。細胞が栄養やエネルギーを生み出す必要が生じたとき、たとえば飢餓状態や成長因子の欠乏状態では、オートファジーは迅速に亢進する。またオートファジーは発生や分化のように構造の再構築が必要な場合や、酸化ストレス、病原微生物の感染、タンパク質凝集体の蓄積、損傷を受けた細胞質構成要素の除去が必要な場合にも亢進する。他には栄養状態、ホルモン、温度や酸素濃度、細胞密度などがオートファジー活性に影響を与えることが知られている。

2. 薬剤によるオートファジーの制御

近年、オートファジーが感染症、神経変性疾患、老化、がん、代謝性疾患、炎症性疾患に対して生体を保護する機能を備えていることが明らかとなり¹⁾、上記の疾患を改善することを最終目的としたオートファジー制御薬剤の研究・開発が急速に進んできている(表1)。

1) ラパマイシン、トリニン

mTOR (mammalian target of rapamycin) 複合体1 (mTORC1) は成長因子や栄養が豊富な状態でオートファジーを遮断する主要な抑制性シグナル分子である。ラパマイシン、トリニン1はmTORC1を阻害することによってオートファジーを誘導する^{2,3)}。しかしながら、mTORC1はオートファジー制御以外にも細胞の成長、代謝、分裂、タンパク質合成などの多彩な生命現象に関与しており、mTORC1阻害剤はオートファジー以外の細胞内プロセスにも影響を与える。

2) メトホルミン

AMPK (AMP-activated protein kinase) はmTORC1を阻害すると同時にULK1をリン酸化することで、オートファジーを活性化する。抗糖尿病薬のメトホルミンは、AMPKを活性化してオートファジーを亢進する⁴⁾。

3) リチウム、カルバマゼピン

イノシトール1,4,5-三リン酸レベルを下げることでオートファジーを誘導する⁵⁾。向精神薬。

4) クロロキン、ヒドロキシクロロキン

オートファジーが、栄養不足、低酸素、化学療法からがん細胞を守っていると考えられ、がんの治療にオートファジー阻害薬の使用が試みられている。抗マラリア薬のクロロキン、ヒドロキシクロロキンは、リソソームの機能障害を起こすことでオートファゴソームがリソソームと融合して内容物を分解する過程を阻害する⁶⁾。がん細胞に抗がん剤とヒドロキシクロロキンを併用すると、アポトーシスによる細胞死を引き起こす。現在、アメリカでは臨床試験に入っているが、ヒトでの抗がん作用はまだはっきりしていない。

5) 治療薬として用いる場合のオートファジー制御薬の特徴

今まで報告されているオートファジーを制御する薬剤は、オートファジーに特異的なものではない。すでに他の効能で臨床使用されている薬剤で、オートファジーも制御するもの(たとえばカルバマゼピンやメトホルミン)は多機能な薬効を示すため、目的とする効能以外はむしろ副作用となる。そのため、臨床で使用するにはオートファジー

国立国際医療研究センター研究所分子炎症制御プロジェクト
(〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1)

Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide

Sanae Shoji-Kawata (Department of Molecular Immunology and Inflammation, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama 1-21-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870481

© 2015 公益社団法人日本生化学会

表1 オートファジーを制御する化合物 (本文中で紹介したもの)

化合物の名称	作用機序	mTOR 依存性	参考論文
ラパマイシン	mTORC1 を阻害してオートファジーを活性化.	あり	2
トリニ1	mTORC1 と mTORC2 を阻害してオートファジーを活性化.	あり	3
メトホルミン	AMPK を活性化してオートファジーを活性化. 抗糖尿病薬.	あり	4
リチウム, カルバマゼピン	イノシトール三リン酸レベルを低下させ, オートファジーを活性化. 抗精神薬.	なし	5
クロロキン, ヒドロキシクロロキンリソソームの分解能を阻害し, オートファジーを不活性化. 抗マラリア薬.		なし	6

特異的な制御薬が理想的である.

オートファジーの亢進もしくは抑制のどちらが治療に有用かは, 対象とする疾患によって異なる. たとえばオートファジー活性化はヒト免疫不全ウイルス (HIV) の増殖を抑制する一方, C型肝炎ウイルスに対してはウイルス増殖を亢進する⁷⁾. そのため, 治療対象に応じてオートファジーを亢進するか抑制するか選択する必要があり, オートファジーが各種疾患で果たす役割とその機序を解明する基礎研究は重要である.

細胞は分裂することで細胞内に蓄積したタンパク質凝集体などの不要物を除去することができる. 神経細胞は寿命が長く分裂しないため, オートファジーの細胞内の不要物を除去する作用が細胞の生存に重要である. オートファジーに必須の遺伝子 Atg5 もしくは Atg7 を脳特異的に欠損させたマウスではタンパク質凝集体が蓄積し神経変性を引き起こすことから^{8,9)}, オートファジーの神経細胞での重要性がわかる. そこで, 脳にタンパク質凝集体が蓄積する神経変性疾患を, オートファジー活性化剤を用いてタンパク質凝集体を分解・除去し治療する試みがある. 中枢性降圧剤リルメニジン (欧米で認可) は細胞内cAMPを減少させることでオートファジーを誘導し, ハンチントン病の治療薬候補として臨床試験に入っている.

オートファジー制御薬を臨床で用いる場合, ヒトでオートファジーの亢進・低下を測定する適切な方法が必要である. ヒドロキシクロロキンの抗がん作用を調べる臨床試験では, 血液を採取してオートファジーの基質タンパク質 p62 を測定しオートファジー活性を測定しているが, 他の臓器でオートファジーが起こっているか調べることは難しい.

3. オートファジーを誘導するペプチド

1) ペプチドの同定

オートファジーには, 細胞内に侵入した病原微生物を脂質二重膜で包み込み分解する機能 (ゼノファジー) があり, 自然免疫として細胞防御を行っている⁷⁾. 我々は,

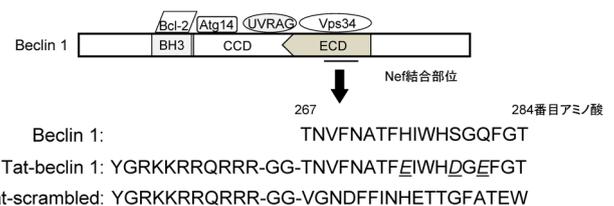


図1 Beclin 1由来の細胞透過性ペプチド

Beclin 1 の evolutionarily conserved domain (ECD) の 18 アミノ酸を HIV-1 Tat タンパク質の transduction domain に GG リンカーを用いてつないだ Tat-beclin 1 ペプチドのアミノ酸配列を示す. ペプチドの親水性を高めるため, 種の間で保存性の低い Beclin 1 の 3 アミノ酸 (斜体下線のもの) を親水性のアミノ酸に置換した. Beclin 1 の 18 アミノ酸の配列をシャッフルしたものをコントロールペプチド (Tat-scrambled) として用いた.

HIV のウイルスタンパク質 Nef が Beclin 1 に結合しオートファジーを阻害することから¹⁰⁾, Nef が結合する Beclin 1 領域は Beclin 1 のオートファジー活性にとって重要な領域であると考えた. Beclin 1 の欠失変異体を用いた免疫沈降実験の結果, Nef は Beclin 1 の evolutionarily conserved domain (ECD) の 18 アミノ酸に結合することがわかった. この 18 アミノ酸を欠損させた Beclin 1 は, 血清飢餓にしてもオートファジーを誘導できず, この領域が Beclin 1 のオートファジー活性に必須の領域であることを見いだした¹¹⁾. この 18 アミノ酸を細胞透過性ペプチド (Tat-beclin 1) として合成し (図1), さまざまな細胞に処理したところ, 検討したすべての細胞において p62 の減少とオートファゴソームに結合するタンパク質 LC3 II の増加がみられた. 次に LC3 に GFP タンパク質を結合させた遺伝子¹²⁾ を安定的に発現する HeLa 細胞を Tat-beclin 1 処理したところ, コントロールペプチドに比べ GFP 陽性のオートファゴソームの数が約 27 倍増加した. さらに電子顕微鏡観察したところ, Tat-beclin 1 処理細胞ではオートファゴソームおよびリソソームと融合したオートリソソームが観察された. オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するバフィロマイシン A1 を Tat-beclin 1 と同時に処理したところ, LC3 II と p62 の量の増加がみられ, Tat-beclin 1 がオートファジーのフラックス (flux) を亢進していることがわかった. オー

トファジーに必須の遺伝子 Atg7 と Beclin 1 を siRNA でノックダウンしたところ、Tat-beclin 1 によるオートファゴソーム形成が抑制され、Tat-beclin 1 によるオートファジーの誘導が canonical な経路であることが示された。Tat-beclin 1 処理と血清飢餓を同時に行ったところ、さらに p62 の減少、LC3 II の増加がみられ、Tat-beclin 1 と血清飢餓がオートファジー経路の上流部分で異なる経路を用いている可能性が考えられた。すでに報告されている Beclin 1 ECD の構造から¹³⁾、Nef が結合する Beclin 1 の 18 アミノ酸は ECD の表面に帯状に広がり他のタンパク質との結合に関与していることが考えられた。

2) ペプチドがオートファジーを誘導する機序

Tat-beclin 1 がオートファジーを誘導する機序を明らかにするため、Tat-beclin 1 結合タンパク質を質量分析法で解析したところ、GAPR-1 を同定した。GAPR-1 (GLIPR2 ともいう) はゴルジ体に局在するタンパク質として報告されており¹⁴⁾、GAPR-1 タンパク質を siRNA を用いて低下させたところ、オートファゴソームの数が上昇し、GAPR-1 がオートファジーに抑制的に働くことが考えられた。免疫染色法を用いた実験から、このタンパク質が内在性 Beclin 1 をゴルジ体にトラップしオートファジーの誘導を阻害すること、Tat-beclin 1 が GAPR-1 に結合し Beclin 1 をゴルジ体から細胞質に開放することでオートファジーを誘導するという新しいオートファジー制御機構の解明に成功した。

3) ペプチドの神経変性疾患および感染症に対する効果—細胞の系

次に我々は、Tat-beclin 1 を神経変性疾患および感染症の治療薬として用いることができるか検討した。ハンチントン病は常染色体優性の遺伝病であり、異常に伸長したポリグルタミンタンパク質からなるハンチンチンが凝集体を形成し神経細胞毒性を持つことで起こる神経変性疾患である。そこで、ポリグルタミン伸長タンパク質 (htt103Q) を安定的に発現する HeLa 細胞に Tat-beclin 1 を処理したところ、可溶性 htt103Q と 1 μ m 未満の大きさの htt103Q 凝集体の減少を検出できた。これらの結果は、Tat-beclin 1 が凝集体を作る前段階の htt103Q および小さな htt103Q タンパク質凝集体を除去できることを示している。

オートファジーは、いくつかのウイルスや細菌感染に対し防御的に働く。そこで我々は、3種類の+鎖RNAウイルス [シンドビスウイルス (SINV)、チクングニアウイルス (CHIKV)、ウエストナイルウイルス (WNV)], HIV-1, *Listeria monocytogenes* に対して、Tat-beclin 1 の効果を検証した。HeLa細胞にウイルスを感染させ、Tat-beclin 1 を処理したところ、SINV, CHIKV および WNV 増殖を 10~50 倍抑制することができた。さらに Tat-beclin 1 はマウス骨髄

由来マクロファージにおける *L. monocytogenes* の増殖を抑制した。ここでは、細菌がオートファジーを回避するのに使う ActA タンパク質を欠損した細菌株を使用している。この Tat-beclin 1 の抗細菌効果は、オートファジーに必須の遺伝子 Atg5 を欠損させたコンディショナルマウス由来のマクロファージでは観察されなかった。次に HIV-1 感染前日からヒト初代培養マクロファージに Tat-beclin 1 を処理し、HIV 感染後も毎日ペプチド処理したところ、培養液中に放出される HIV 抗原量が減少していた。shRNA を用いて Atg5 をノックダウンすると、Tat-beclin 1 による抗 HIV-1 効果はみられなかった。

4) ペプチドの感染症に対する効果—マウスの系

Tat-beclin 1 がマウスでオートファジーを誘導できるか調べるため、我々は GFP-LC3 トランスジェニックマウス¹⁵⁾ に Tat-beclin 1 を腹腔内注射し、組織におけるオートファゴソームの数を定量した。ここでは、今まで用いてきた L 型のアミノ酸で合成した Tat-beclin 1 に加え、細胞内で分解されにくい D 型のアミノ酸からなる Tat-beclin 1 を用いた。L 型と D 型の Tat-beclin 1 を投与したマウスの骨格筋、心筋、脾臓において、顕著にオートファゴソームの数が上昇していた。さらに、生後 5 日の GFP-LC3 マウスにペプチドを腹腔内投与したところ、脳における p62 タンパク質量が減少していた。これらのことは、Tat-beclin 1 が成体マウスの末梢組織および新生マウスの中枢神経にオートファジーを誘導することができることを示している。

我々は CHIKV, WNV に感染させたマウスにおいて Tat-beclin 1 効果の解析を行った。チクングニア熱は蚊が媒介する感染症で、ウイルス (CHIKV) は筋肉、皮膚、関節で増殖し弛緩性の麻痺を引き起こす。マウスに CHIKV を皮下感染させ、Tat-beclin 1 を毎日腹腔内投与したところ、ヒラメ筋と大腿筋でウイルス力価が減少しており、コントロールペプチドでは 100% の致死率であったのに比べ Tat-beclin 1 投与マウスでは 62.5% の致死率であった。次に WNV 感染マウスで Tat-beclin 1 投与実験を行った。ウエストナイル熱は蚊が媒介する感染症で中枢神経系へも感染し、死に至ることがある。我々は、マウスの脳内に WNV を感染させ、D 型の Tat-beclin 1 を毎日腹腔内投与したところ、脳内でのウイルス力価を 1000 倍以上減少させることができた。さらに、Tat-beclin 1 投与マウスでは、コントロールペプチド投与群と比べ脳内の細胞死が抑制されマウスの致死率も顕著に減少していた。

4. おわりに

オートファジー活性化剤が有効と考えられる疾患には、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患、感

染症, がんの発症予防, 代謝性疾患, 抗老化寿命延長などがあげられる。オートファジーを活性化する Tat-beclin 1 を各種疾患モデルマウスに投与することで, オートファジー活性化剤がどのような疾患の治療に有効か, 今までに報告されていない疾患も含めてスクリーニングし, 候補疾患を洗い出すことができると考えている。また, Tat-beclin 1 は内在性 Beclin 1 がオートファジーを誘導するのと同じ機序でオートファジーを活性化している可能性が考えられるため, オートファジー以外のシグナルに影響を与えずオートファジーを特異的に活性化する薬剤の候補となる可能性がある。一方, マウスの実験でL型 Tat-beclin 1 を腹腔内投与し約20時間が経過すると, オートファジー活性が非常に低下することを観察しており, ペプチドの創薬応用を考えた場合, 代謝, 排出を遅らせる工夫や投与方法の検討などを行う必要がある。

文 献

- Choi, A.M., Ryter, S.W., & Levine, B. (2013) *N. Engl. J. Med.*, **368**, 651–662.
- Rvikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D.C. (2002) *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1107–1117.
- Thoree, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., & Gray, N.S. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 8023–8032.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T., Codogno, P., & Meijer, A.J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 34870–34879.
- Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., & Rubinsztein, D.C. (2005) *J. Cell Biol.*, **170**, 1101–1111.
- Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., & Thompson, C.B. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 326–336.
- Shoji-Kawata, S. & Levine, B. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 1478–1484.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006) *Nature*, **441**, 885–889.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006) *Nature*, **441**, 880–884.
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I., & Deretic, V. (2009) *J. Cell Biol.*, **186**, 255–268.
- Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G.R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A.D., Sun, Q., Pallauf, K., MacDuff, D., Huerta, C., Virgin, H.W., Helms, J.B., Eerland, R., Tooze, S.A., Xavier, R., Lenschow, D.J., Yamamoto, A., King, D., Lichtarge, O., Grishin, N.V., Spector, S.A., Kaloyanova, D.V., & Levine, B. (2013) *Nature*, **494**, 201–206.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5720–5728.
- Huang, W., Choi, W., Hu, W., Mi, N., Guo, Q., Ma, M., Liu, M., Tian, Y., Lu, P., Wang, F.L., Deng, H., Liu, L., Gao, N., Yu, L., & Shi, Y. (2012) *Cell Res.*, **22**, 473–489.
- Eberle, H.B., Serrano, R.L., Füllekrug, J., Schlosser, A., Lehmann, W.D., Lottspeich, F., Kaloyanova, D., Wieland, F.T., & Helms, J.B. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 827–838.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1101–1111.

著者寸描

●小路 早苗 (しょうじ さなえ)



国立国際医療研究センター上級研究員。
医学博士。

■略歴 埼玉県生まれ。1999年京都大学大学院薬学研究科修士課程修了。2003年同大学院医学研究科博士課程修了。04年から阪大微生物病研究所研究員。09年からテキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター、ハワード・ヒューズ医学研究所研究員。13年から現職。

■研究テーマと抱負 細胞内をクリーニングするオートファジーを用いて, オートファジーの活性化が有効と考えられる疾患改善を目指しています。私の行っている研究が疾患の治療に役立つように発展させたいです。

■趣味 温泉めぐり, ウォーキング, アクアビクスなど体を動かすこと。素材にこだわった料理作り。