

研究題目 近接ビオチン標識法を基盤とした低分子化合物の標的タンパク質の同定

研究組織

研究代表者：山中 聡士（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：澤崎 達也（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

研究分担者：山田 航大（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

我々が 2020 年に開発した新規近接ビオチン化酵素 AirID (Ancestor BirA biotin identification) は、E3 ユビキチンリガーゼに融合することでサリドマイド誘導体や PROTAC(proteolysis targeting chimera)などのタンパク質分解薬依存的なタンパク質-タンパク質間相互作用解析が可能であることを 2022 年に報告した。本研究では、本技術を発展させ、標的タンパク質が未発見である低分子化合物を PROTAC 化することで、低分子化合物の標的タンパク質同定法の構築を目指した。

[1-2] 研究の方法・経過

PROTAC 依存的な標的タンパク質探索の感度を上げるために、CRBN のサリドマイド結合ドメイン(CULT)へ AirID を融合した AirID 融合 CULT を安定発現する細胞を作製した。ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウン法(STA-PDA)によって、AirID を融合した完全長 CRBN を発現する細胞と比較した。また、抗腫瘍活性を示す抗生物質であるゲルダナマイシン(GA)および抗がん作用などを示すポリフェノール化合物であるクルクミン誘導体(CUR)を対象に、サリドマイド誘導体を用いた PROTAC を有機合成した。次に、GA-PROTAC を AirID 融合 CULT 発現細胞へ処理し、既知標的タンパク質の HSP90 のビオチン化を解析した。そして、GA-PROTAC あるいは CUR-PROTAC を処理した細胞を用いて、細胞内においてビオチン化されるタンパク質を質量分析によって探索した。見出した標的タンパク質候補を対象に、コムギ

無細胞タンパク質合成系を用いた生化学的な相互作用解析および培養細胞を用いたプルダウンアッセイを行うことで、質量分析のバリデーションを行った。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

サリドマイド結合ドメイン(CULT)を用いた STA-PDA の結果、CULT を用いた方が完全長 CRBN を用いるより標的タンパク質のビオチン化効率が高くなることを見出した。また、様々なリンカー長の GA-PROTAC を用いた STA-PDA および質量分析の結果、HSP90 のビオチン化強度はリンカー長に依って異なっていた。PROTAC においてリンカー長の違いはその分解活性に大きな影響を与えることが知られており、本評価系が PROTAC の活性を評価する指標になることが示唆された。さらに、GA-PROTAC 依存的にビオチン化される GA の新たな標的タンパク質候補を複数見出した。

また、CUR-PROTAC を暴露した AirID 融合 CULT 発現細胞を用いた質量分析の結果、CUR の標的タンパク質候補を複数見出した。標的タンパク質候補を対象に、ビオチン化クルクミンを用いた生化学的な相互作用解析および培養細胞を用いた相互作用解析を行った結果、少なくとも 6 種の CUR 標的タンパク質を見出した(図 1)。見出した標的タンパク質の中には、CUR の薬理作用である抗酸化作用に深く関与することが予想されるタンパク質が含まれていた。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究において、近接ビオチン標識法を用いることで低分子化合物の標的タンパク質が同定可能であることが示唆された。有効性を示すにも関わらず標的タンパク質が未発見である低分子化合物は数多く存在することから、今後の薬剤開発や作用メカニズムの解明に本評価系が利用されることが期待される。今後の展望として、見出した標的タンパク質を対象にした詳細な解析を進めており、GA および CUR の作用メカニズムにおける標的タンパク質の機能の解明を目指す。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Satoshi Yamanaka, Hirotake Furihata, Yuta Yanagihara, Akihito Taya, Takato Nagasaka, Mai Usui, Koya Nagaoka, Yuki Shoya, Kohei Nishino, Shuhei Yoshida, Hidetaka Kosako, Masaru Tanokura, Takuya Miyakawa, Yuuki Imai, Norio Shibata, Tatsuya Sawasaki*. Lenalidomide derivatives and proteolysis-targeting chimeras for controlling neosubstrate degradation. *Nature Communications* 14: 4683, 2023

[3-2]学会発表

1. 山中 聡士. コムギ無細胞系および近位依存性ビオチン標識法を用いたタンパク質分解薬依存的な相互作用解析技術の開発と応用. 第 64 回 日本生化学会 中国・四国支部例会 シンポジウム, 愛媛, 5 月 27 日, 2023
2. 山中 聡士, 降旗 大岳, 臼井 麻衣, 長岡 昂治, 庄屋 祐希, 西野 耕平, 小迫 英尊, 田之倉 優, 宮川 拓也, 柴田 哲男, 澤崎 達也. ネオ基質分解制御のためのサリドマイド誘導体および PROTAC の開発. 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 11 月 1 日, 2023
3. 長岡 昂治, 河野 将大, 庄屋 祐希, 山中 聡士, 西野 耕平, 小迫 英尊, 澤崎 達也. 近位依存性ビオチン化酵素を用いた DCAF ファミリーのインタラクトーム解析. 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 10 月 31 日, 2023
4. 澤崎 達也, 山中 聡士. タンパク質分解創薬における標的タンパク質同定手法. 第 40 回 メディシナルケミストリーシンポジウム, 名古屋, 11 月 14 日, 2023
5. Satoshi Yamanaka, Hirotake Furihata, Mai Usui, Koya Nagaoka, Yuki Shoya, Kohei

Nishino, Hidetaka Kosako, Masaru Tanokura, Takuya Miyakawa, Norio Shibata, Tatsuya Sawasaki. Thalidomide derivatives and proteolysis-targeting chimeras for controlling neosubstrate degradation. KEYSTONE SYMPOSIA (Targeted Protein Degradation), アメリカ, 1 月 23 日, 2024

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究で用いた方法は細胞内のタンパク質を対象にした評価系であり、細胞膜に局在するタンパク質に細胞外から作用する低分子化合物の評価はできない。今後の課題として、上記に様な低分子化合物を対象にした評価系の構築を目指す。

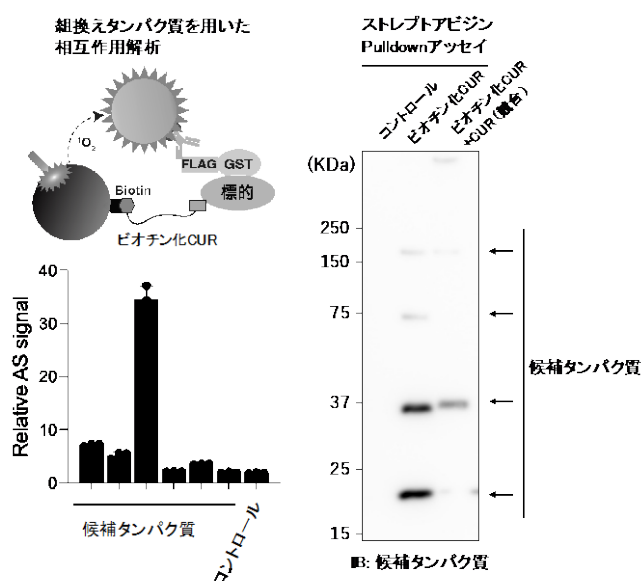


図 1. 候補タンパク質を対象にした生化学的な相互作用解析の結果(左)、培養細胞を用いた相互作用解析の結果(右)