

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04190

研究課題名(和文)細胞内環境での蛋白質間相互作用阻害剤スクリーニング技術の開発

研究課題名(英文) Development of a screening technique of protein-protein interaction inhibitors in the cytosolic environment

研究代表者

河原 正浩 (KAWAHARA, MASAHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：50345097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内環境で簡便に蛋白質間相互作用を検出でき、阻害剤スクリーニングも可能な技術の開発を目指した。これらを達成するために、二種類のシグナル伝達タンパク質に着目し、タンパク質間相互作用を増殖シグナルというリードアウトに変換する系を構築した。その結果、蛋白質間相互作用を細胞増殖で検出でき、阻害剤を評価することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study is directed to develop a technique to easily detect protein-protein interactions in the cytosolic environment as well as to enable inhibitor screening. To attain these, two kinds of signaling proteins are utilized to design a system that converts protein-protein interactions into growth signals as readout. Consequently, we successfully detect protein-protein interactions with cell growth and evaluate the inhibitors.

研究分野：細胞工学

キーワード：蛋白質 創薬 遺伝子 スクリーニング シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

人類は様々な疾患に直面しており、その治療薬開発が重要である。従来の疾患治療薬は、それぞれの疾患に特異的なタンパク質、主に酵素を分子標的として選び、それに作用して活性を阻害する薬剤をスクリーニングするという戦略が主体である。しかし、内在性の他の類縁タンパク質にも作用する場合、これらの薬剤は副作用を示してしまうため、限界がある。一方、新しい創薬の概念として、タンパク質間相互作用の阻害剤探索が最近注目されてきている。生体内のプロセスはほぼ全てがタンパク質間相互作用に支配されていることから、タンパク質間相互作用を標的とした創薬は無数の可能性がある。しかし、蛋白質間相互作用の結合界面は一般的に広く扁平であるため、その阻害剤の合理的設計や探索は、従来の酵素阻害剤探索と比べてはるかに困難である。また、*in vitro* の環境は、多くの分子が共存する細胞内環境と大きく異なっているため、薬効を含めたスクリーニング手法としては細胞を用いたアッセイ系が望ましい。従って、生きた細胞内の *crude* な環境下でタンパク質間相互作用を検出し、かつ有用な阻害剤を簡便にスクリーニングできる手法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞の「増殖」の有無を指標として簡便に蛋白質間相互作用を検出でき、阻害剤スクリーニングも可能な技術を開発する。本研究ではレポーター分子として受容体やその下流のシグナル伝達分子を用い、蛋白質間相互作用に伴う増殖・生存シグナル伝達をリードアウトとする点に独創性がある。既往の研究で、増殖因子受容体を用いた原理証明に成功したが、本研究では既往の系で用いたレポーターコンストラクトに更なる改良を加え、より汎用的な相互作用検出系を開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) c-kit を用いたタンパク質間相互作用検出法の開発

第一に、受容体型チロシンキナーゼ *c-kit* を用いたタンパク質間相互作用検出法を開発した。*c-kit* はリガンド結合に伴う二量体形成により細胞内キナーゼドメインが活性化され、増殖シグナルを伝達する。そこで、相互作用するタンパク質 (*bait* と *prey*) をそれぞれ *c-kit* の細胞内ドメインと連結したキメラタンパク質をデザインした。また、キメラタンパク質の N 末端側に、リガンド依存的に相互作用を増強するヘルパーモジュールを付加することで、相互作用検出の高感度化を狙った。これらのキメラタンパク質を遺伝子導入によりインターロイキン-3 (*IL-3*) 依存性細胞で発現させると、*bait* と *prey* が相互作用したときのみ *c-kit* の細胞内ドメインが近接して二量体形成により活性化され増殖シグナルを伝達する。従って、*IL-3* 非存在下で培養したときの細胞増殖の有無によって相互作用の有無を検出することができる。

### (2) SOS を用いたタンパク質間相互作用検出法の開発

第二に、増殖に関わる主要なシグナル伝達系である *Ras*/*MAP* キナーゼ経路の一員である *SOS* を用いたタンパク質間相互作用検出法を開発した。*SOS* は細胞膜近傍に局在させることで *Ras* を活性化し、増殖シグナルを伝達する。そこで、相互作用するタンパク質のうち、*bait* を *SOS*、*prey* を細胞膜アンカリング配列と連結したキメラタンパク質を *IL-3* 依存性細胞で発現させると、*bait* と *prey* が相互作用したときのみ *SOS* が細胞膜近傍に局在し、*Ras* を活性化することで増殖シグナルを伝達する。従って、この場合も *IL-3* 非存在下での細胞増殖によって相互作用を検出することができる。

#### 4. 研究成果

(1) c-kit を用いたタンパク質間相互作用検出法の開発

実際に、合成小分子 AP21967 依存的に相互作用する FKBP12 と FRB (T2098L 変異体)、および p53 peptide と MDM2 の相互作用を検出することができた。また、後者については、相互作用を阻害しガン抑制効果のある化合物 Nutlin-3 を加えたところ濃度依存的に増殖阻害が見られたことから、小分子阻害剤の評価も可能であることが示された。

(2) SOS を用いたタンパク質間相互作用検出法の開発

具体的な相互作用として、合成小分子 AP21967 依存的に相互作用する FKBP12 と FRB (T2098L 変異体) の検出に成功した。また、MDM2 と p53 peptide との相互作用を阻害する pDI peptide と MDM2 の相互作用の検出に成功したことから、ペプチド阻害剤の評価も可能であることが示された。

以上より、本研究では二種類のシグナル伝達タンパク質に着目し、タンパク質間相互作用を増殖シグナルというリードアウトに変換する技術を開発することに成功した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Saka, K., Lai, C. Y., Nojima, M., Kawahara, M., Otsu, M., Nakauchi, H., Nagamune, T. "Dissection of signaling events downstream of the c-Mpl receptor in murine hematopoietic stem cells via motif-engineered chimeric receptors." *Stem Cell Rev. Rep.* **14**, 101–109 (2018), doi: 10.1007/s12015-017-9768-7. (査読有)
2. Izuta, S., Yamaguchi, S., Misawa, R., Yamahira, S., Tan, M., Kawahara, M.,

Suzuki, T., Takagi, T., Sato, K., Nakamura, M., Nagamune, T., Okamoto, A. "Microfluidic preparation of anchored cell membrane sheets for in vitro analyses and manipulation of the cytoplasmic face." *Sci. Rep.* **7**, 14962 (2017), doi: 10.1038/s41598-017-14737-7. (査読有)

3. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Nagamune, T. "Cell-surface expression levels are important for fine-tuning the performance of receptor tyrosine kinase-based signalobodies." *Biotechnol. J.* **12** (2017), doi: 10.1002/biot.201700441. (査読有)
4. Kashima, D., Kawade, R., Nagamune, T., Kawahara, M. "A Chemically Inducible Helper Module for Detecting Protein-Protein Interactions with Tunable Sensitivity Based on KIPPIS." *Anal. Chem.* **89**, 4824–4830 (2017), doi: 10.1021/acs.analchem.6b04063. (査読有)
5. Nguyen, T. D., Takasuka, H., Kaku, Y., Inoue, S., Nagamune, T., Kawahara, M. "Engineering a growth sensor to select intracellular antibodies in the cytosol of mammalian cells." *J. Biosci. Bioeng.* **124**, 125–132 (2017), doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.017. (査読有)
6. 河原正浩 "キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用" *生物工学会誌* **95**, 127–135 (2017) (査読無)
7. 河原正浩 "人獣共通感染症の機構解明と防除のための基盤技術の開発" *JATAFF ジャーナル* **4**(7), 58 (2016) (査読無)
8. 河原正浩 "細胞内シグナル伝達を操る：再生医療・創薬への応用を目指して" *生物工学会誌* **94**, 535–538 (2016) (査読無)
9. Nakabayashi, H., Aoyama, S., Kawahara, M.,

- Nagamune, T. "Differentiation signalobody: demonstration of antigen-dependent osteoclast differentiation from a progenitor cell line." *J. Biosci. Bioeng.* **122**, 357–363 (2016), doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.02.010. (査読有)
10. Lee, S., Kaku, Y., Inoue, S., Nagamune, T., Kawahara, M. "Growth signalobody selects functional intrabodies in the mammalian cytoplasm." *Biotechnol. J.* **11**, 565–573 (2016), doi: 10.1002/biot.201500364. (査読有)
  11. Miura, T., Nagamune, T., Kawahara, M. "Ligand-inducible dimeric antibody for selecting antibodies against a membrane protein based on mammalian cell proliferation." *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1113–1123 (2016), doi: 10.1002/bit.25858. (査読有)
  12. Yoshida, R., Kawahara, M., Nagamune, T. "Domain structure of growth signalobodies critically affects the outcome of antibody library selection." *J. Biochem.* **157**, 497–506 (2015), doi: 10.1093/jb/mvv008. (査読有)
  13. Honda, S., Nagamune, T., Kawahara, M. "Selection of cDNA candidates that induce oligomerization of NLRP3 using a chimeric receptor approach." *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 223–230 (2015), doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.021. (査読有)
- [学会発表] (計 6 1 件)
1. Masahiro Kawahara "Engineering cytokine receptors for applications in regenerative medicine and drug discovery" 2017 KSBB (The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering) Spring Meeting and International Symposium 招待講演, Hwabaek International Convention Center, Gyeongju, Korea, 2017.4.7.
  2. Masahiro Kawahara, Koichiro Saka, Teruyuki Nagamune "Designing tyrosine motif-grafted receptors to activate target signaling molecules of interest" JAACT2016, 2016.11.11, 神戸国際会議場
  3. Masahiro Kawahara, Satoru Mabe, Teruyuki Nagamune "KIPPIS: Probing intracellular protein-protein interactions with mammalian cell growth" YABEC2016, 2016.10.28, 宮崎シーガイア
  4. 河原 正浩, 鹿島 大揮、景岡 美穂、間部 悟、長棟 輝行 "増殖を指標とした動物細胞内蛋白質間相互作用スクリーニング法" 化学工学会第 83 年会, 関西大学千里山キャンパス, 2018.3.14.
  5. 河原 正浩, グエン トウイズオン, 李松熹, 高須賀 仁, 長棟 輝行 "受容体の分子改変による細胞内抗体選択法の開発" 化学工学会第 49 回秋季大会 バイオ部会シンポジウム「新機能タンパク質・ペプチド分子創製技術の新展開」, 名古屋大学東山キャンパス, 2017.9.22.
  6. Masahiro Kawahara "Manipulating intracellular signal transduction with artificial proteins" 第 17 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「Bottom-up design of functional artificial proteins in vitro and in vivo」招待講演, 仙台国際センター, 2017.6.20.
  7. 河原正浩 "シグナル伝達を創製し、理解し、応用する" 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻講演会「化学と生命のかけはし 2017」招待講演, 東京大学本郷キャンパス, 2017.3.21.
  8. 河原 正浩, 坂 晃一郎, 長棟 輝行 "受容体シグナルの入出力をデザインする" 「細胞を創る」研究会 9.0, 2016.11.21-22, 早稲田大学
  9. 河原正浩 "キメラ受容体による細胞運

- 命制御系の構築とライブラリー選択への応用” 第 39 回生物工学奨励賞 (照井賞) 受賞講演, 富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山, 2016.9.29.
10. 河原 正浩 “細胞の遺伝子改変による創薬プラットフォームの開発” 第 68 回日本生物工学会大会シンポジウム「遺伝子改変技術によるセルエンジニアリングの革新:産業応用に向けて」招待講演, 富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山, 2016.9.28.
  11. 河原 正浩 “デザイナーペプチドの哺乳動物細胞内スクリーニング” 第 89 回日本生化学会大会 フォーラム「デザイナーペプチド・蛋白質が創成する新しい生化学」招待講演, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス, 2016.9.26.
  12. 河原 正浩, 三浦 知啓, 長棟 輝行 “リガンド誘導性二量体化抗体による抗膜蛋白質抗体の選択法” 化学工学会 第 81 年会, 2016.3.15, 関西大学千里山キャンパス
  13. 河原 正浩 “細胞内シグナル伝達を操る: 再生医療・創薬への応用を目指して” BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸ポートアイランド, 2015.12.4
  14. 河原 正浩, 中林 秀人, 田中 健人, 長棟 輝行 “無血清培養での細胞増殖活性向上のためのキメラ受容体のデザイン” 第 67 回日本生物工学会大会, 2015.10.27, 城山観光ホテル
  15. 河原 正浩, 中林 秀人, 青山 幸恵子, 沈 鐘楚子, 長棟 輝行 “キメラ受容体を用いた細胞分化誘導の低コスト化” 化学工学会第 47 回秋季大会 部会セッション「再生医療における化学工学的アプローチ」、2015.9.11, 北海道大学札幌キャンパス
  16. Daiki Kashima, Raiji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “A novel cell-based intracellular protein-protein interaction detection platform (KIPPIS) for intrabody screening” Antibody Engineering & Therapeutics 2017, 2017.12.11-15, Manchester Grand Hyatt San Diego, San Diego, CA, USA
  17. Tatphon Kongkrontong, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Synthetic Control of Mammalian Cell Signaling by Engineering Receptor Tyrosine Kinases” Asian Congress on Biotechnology 2017 (ACB-2017), Khon Kaen, Thailand, 2017.7.24-25
  18. Thuy Duong Nguyen, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Developing a suicide switch for improving quality of scFv libraries ” Antibody Engineering & Therapeutics 2016, 2016.12.11-15, Manchester Grand Hyatt San Diego, San Diego, CA, USA
  19. Akihiro Eguchi, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Development of an epitope-selective antibody selection system using a cell death signal” JAACT2016, 2016.11.12, 神戸国際会議場
  20. Tatphon Kongkrontong, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Activating On-target Signaling Molecules by Utilizing Engineered Receptor Tyrosine Kinase” JAACT2016, 2016.11.12, 神戸国際会議場
  21. Daiki Kashima, Raiji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Highly sensitive detection of intracellular protein-protein interactions by fusing a chemically inducible homo-dimeric module” JAACT2016, 2016.11.11, 神戸国際会議場

22. Thuy Duong Nguyen, Yoshihiro Kaku, Satoshi Inoue, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Engineering a Growth Sensor to Detect Antigen–Antibody Interactions in Mammalian Cells ” SEED2016、2016.7.18-21、Hilton Chicago, Chicago, IL, USA
23. Thuy Duong Nguyen, Yoshihiro Kaku, Satoshi Inoue, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Improvement of a growth sensor detecting antigen-antibody interactions in the cytoplasm of mammalian cells ” Antibody Engineering & Therapeutics 2015、2015.12.7-10、San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
24. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞増殖を指標とした細胞内タンパク質間相互作用検出系 (KIPPIS) の構築と阻害剤探索への展開” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.8-9、神戸ポートアイランド
25. Kongkrongtong Tatphon、長棟 輝行、河原 正浩 “On-target シグナル伝達分子の特異的活性化を目的としたデザイナー受容体の開発” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.6、神戸ポートアイランド
26. 垣内 洋祐、長棟 輝行、河原 正浩 “キメラ受容体の細胞内局在最適化による高感度タンパク質間相互作用検出系の確立” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.6、神戸ポートアイランド
27. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞内タンパク質間相互作用に対する阻害剤探索を指向した新規スクリーニングプラットフォーム KIPPIS の開発” 第 8 回スクリーニング学研究会、2017.10.25、タワーホール船堀
28. コンクローン トーン タットポーン、長棟輝行、河原正浩 “シグナル伝達を自在に制御できる人工細胞創製への挑戦” 「細胞を創る」研究会 10.0、2017.10.19-20、京都教育文化センター
29. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞内タンパク質間相互作用検出系の構築と阻害剤探索への展開” 生物学若手研究者の集い (若手会) 夏のセミナー2017、2017.7.22、ツネイシしなみビレッジ
30. 梅根 輝来人、長棟 輝行、河原 正浩 “効率的な細胞増殖を可能にする受容体の作製/スクリーニング” 化学工学会 第 82 年会、2017.3.7、芝浦工業大学
31. 鹿島 大揮、河出 来時、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞内タンパク質間相互作用検出系のホモ二量体化ヘルパーモジュールを利用した高感度化” 「細胞を創る」研究会 9.0、2016.11.21-22、早稲田大学
32. 梅根 輝来人、長棟 輝行、河原 正浩 “細胞増殖誘導を指標としたチロシンモチーフの探索” 「細胞を創る」研究会 9.0、2016.11.21-22、早稲田大学
- (他 29 件)
- [図書] (計 1 件)
1. 河原正浩, 長棟輝行 “造血幹細胞の増幅を指向したキメラ受容体の構築” 『三次元ティッシュエンジニアリング最前線』, エヌ・ティー・エス社, pp. 95–101 (2015).
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 河原 正浩 (KAWAHARA MASAHIRO)
- 東京大学・大学院工学系研究科・准教授
- 研究者番号 : 50345097