

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34428

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22729

研究課題名（和文）タンパク質間相互作用を標的としたDNMT1機能調節物質のスクリーニング

研究課題名（英文）Targeting protein-protein interactions to screen for DNMT1 function modulators.

研究代表者

喜多 絢海（Kita, Ayami）

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：40881363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：DNAメチル化修飾異常はがんの進行に寄与する。DNAメチル化酵素DNMT1の阻害剤が抗がん剤として臨床応用されているものの、選択性が低い等の問題点から、新規作用機序のDNAメチル化調節薬の開発が望まれている。本研究では、腫瘍組織で高発現し、DNMT1を安定化、活性化することが知られている脱ユビキチン化酵素USP7とDNMT1のタンパク質間相互作用に着目し、その相互作用を阻害する物質を取得可能なスクリーニング系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在開発されているDNMT1を標的とした阻害剤は、臨床応用されているものと同様に酵素活性部位に結合する作用機序の薬剤が殆どである。タンパク質間相互作用阻害を標的としたものは、国内外において2件の報告のみであり、その後の開発は進んでいない。本研究で構築したスクリーニング系を利用してDNMT1-USP7相互作用阻害物質を同定することによって、新規作用機序のDNAメチル化調節薬の取得が見込まれる。また、本研究で開発したタンパク質間相互作用阻害物質のスクリーニング系は他のタンパク質間相互作用にも応用可能であり、医薬品等を開発する上で有用なツールなりうることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Aberrant DNA methylation contribute to cancer progression, and although inhibitors of DNA methyltransferase DNMT1 have been clinically applied as anticancer agents, their low selectivity and other problems require the development of DNA methylation modulators with novel mechanisms of action. In this study, we focused on the protein-protein interaction between USP7, a deubiquitinating enzyme that is highly expressed in tumor tissues and is known to stabilize and activate DNMT1, and constructed a screening system to obtain substances that inhibit the interaction.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 DNAメチル化 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA の塩基配列変化を伴わない遺伝子発現調節機構のひとつに DNA のメチル化修飾が存在する。多くの腫瘍組織において、DNA の異常な高メチル化状態ががんの進行に寄与することから、DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1) ががん治療の標的として注目されている。現在、メチル化触媒活性部位を標的とした DNMT1 阻害剤が臨床応用されているが、DNMT1 の触媒活性部位は他のメチル化酵素の触媒活性部位と構造が類似しているため、非選択的な作用による毒性などが問題となっている。すなわち、触媒活性阻害とは異なる機序を有し、DNMT1 をより選択的に調節可能な新規薬物の開発が期待されている。

一方で、DNMT1 は多様な相互作用因子によって、その機能が制御されている。この相互作用を標的とすることで、他のメチル化酵素には作用しない DNMT1 に選択性の高い機能調節の実現が期待できる。近年、腫瘍組織において高発現する脱ユビキチン化酵素 Ubiquitin-Specific Protease 7 (USP7) が、メチル化酵素の中で DNMT1 のみを持つ活性調節領域に結合し、DNMT1 の安定性やメチル化効率を高めることが報告された (Sci Signal. 2010, Nucleic Acids Res. 2011, Sci Rep. 2017)。このことから、DNMT1-USP7 相互作用を阻害することで、DNMT1 選択的にメチル化活性を阻害することができるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の部位特異的蛍光修飾法を応用した FRET スクリーニング系を構築し、新規作用機序の抗がん剤となりうる DNMT1-USP7 の相互作用阻害物質を簡便かつ特異的に取得することを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング系の構築

蛍光基および消光基を付加するアミノ酸残基の選択

部位特異的蛍光修飾法は、部位特異的人工アミノ酸導入法により、任意箇所のアジド基が導入されたタンパク質を取得し、アジド基と特異的に反応するアルキン基をもつ蛍光分子によって任意箇所を修飾する方法である。まず、DNMT1 および USP7 へのアジド基の導入位置の選出を行った。選出方法としては、既知の DNMT1-USP7 複合体構造情報をもとに蛍光分子および消光分子が FRET 効率のよい数 nm 以内に位置するよう蛍光分子導入位置を 3 ペア設計し、DNMT1 は 3 残基、USP7 は 3 残基をアジド基導入箇所とした。

蛍光基および消光基を付加可能な DNMT1 および USP7 発現ベクターの作製

設計した位置にアジド基を導入可能な DNMT1 および USP7 変異体発現プラスミドの構築を行った。DNMT1 および USP7 にはタンパク質精製に利用する FLAG タグ配列を付加した。また、構築した変異体発現プラスミド 293 細胞に導入し、人工アミノ酸であるアジドフェニルアラニン (AzF) を添加することで、アジド基を導入した DNMT1 および USP7 が発現させ、各タンパク質が発現することを Western blotting で確認した。次に、精製したタンパク質に対して、Click 反応を用いて、蛍光基 Alkyne-5-FAM を付加し、付加後のタンパク質を SDS-PAGE 後、イメージアナライザーによってタンパク質に 5-FAM が付加されていることを確認した。

(2) スクリーニング系の検証

アジド基を導入した DNMT1 および USP7 を 293 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により各タンパク質を精製し、Click 反応によって Alkyne-5-FAM および消光基 Alkyne-

BXQ-1 の付加を行った。5-FAM もしくは BXQ-1 を付加したタンパク質を透析法で精製し、相互作用が解析可能なマイクロプレートリーダーを用いて検証した。

4. 研究成果

(1) スクリーニング系の構築

図 1 A に示すアミノ酸残基のペアをアジド基導入位置とした。設計した位置にアジド基を導入可能な DNMT1 および USP7 変異体発現プラスミドによって、各タンパク質を発現させることが可能であることを確認した(図 1 B)。また、Click 反応によって、精製したタンパク質へ蛍光基 5-FAM が付加されていることを確認した(図 1 C)。

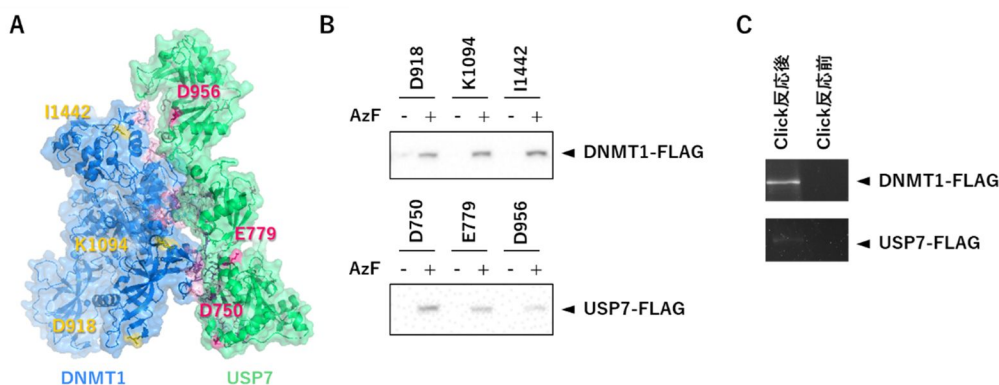


図 1 スクリーニング系の構築 (A) DNMT1-USP7 複合体構造 (*Nat. Commun.* 2015)。DNMT1 を青色、USP7 を黄緑、相互作用表面をピンク色で示した。黄色は DNMT1、マゼンダは USP7 へのアジド基導入位置を示す。(B) アジド基導入タンパク質の発現確認。DNMT1 および USP7 変異体発現プラスミドを導入した 293 細胞に AzF を添加することでアジド基が導入されたタンパク質を発現させることが出来た。(C) 蛍光修飾の確認。アジド基導入タンパク質に対して Click 反応により Alkyne-5-FAM を付加することに成功した。

(2) スクリーニング系の検証

蛍光基 5-FAM を付加した DNMT1 に消光基 BXQ-1 を付加した USP7 を添加した場合に蛍光が減弱するか検証した。蛍光分子導入位置として設計した 3 ペア全てにおいて蛍光の減弱が確認できた(図 2)。また、最も強い減弱が確認できたペアは DNMT1D918FAM : USP7D750BXQ1 であり、スクリーニング系には DNMT1D918FAM : USP7D750BXQ1 ペアを用いることが最適であることが明らかになった(図 2)。

今後、上記ペアを利用したスクリーニングを用いて DNMT1-USP7 相互作用阻害物質を同定することによって、新規作用機序の DNA メチル化調節薬の取得をする予定である。また、本研究で開発したタンパク質間相互作用阻害物質のスクリーニング系は他のタンパク質間相互作用にも応用可能であり、医薬品等を開発する上で有用なツールなりうることを期待される。

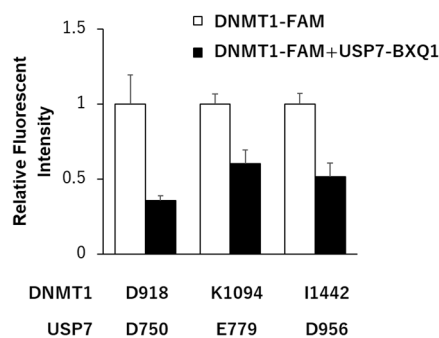


図 2 スクリーニング系の検証

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------