

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15076

研究課題名（和文）近接ピオチン化酵素を用いたサリドマイドのインタラクトーム解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of analysis method for thalidomide-dependent interactome using proximity-dependent biotinylation enzyme

研究代表者

山中 聡士 (Yamanaka, Satoshi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・特定助教

研究者番号：50853884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：近接ピオチン化酵素AirIDをE3ユビキチンリガーゼに融合することで、分子糊型のタンパク質分解誘導剤依存的な相互作用解析系を構築した。サリドマイド誘導体の標的E3ユビキチンリガーゼであるCRBNへAirIDを融合することで、サリドマイドやサリドマイド誘導体依存的にネオ基質がピオチン標識可能であることを示した。さらに、質量分析を組み合わせることで網羅的に相互作用解析が評価可能であることを示し、サリドマイド誘導体のネオ基質選択性が可能であることを示した。本評価系を用いることで、サリドマイド誘導体の新たなネオ基質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サリドマイド誘導体であるレナリドミドやボマリドミドは、血液がんの治療薬として年間約2兆円の規模で使用される代表的な低分子薬剤である。過去10年の研究から、サリドマイド誘導体はネオ基質のタンパク質分解を誘導するタンパク質分解薬であることが明らかとなった。タンパク質分解薬は強力かつ新規な薬剤の作用機序であることから、世界中のメガファーマが研究を行っている。さらに、サリドマイド誘導体の臨床的な成功から新たなサリドマイド誘導体の開発が進められている。したがって、本研究で開発された解析技術は将来のタンパク質分解薬の開発・利用において極めて重要な技術となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established analysis method for analysing molecular glue degrader-dependent interaction by fusing AirID, proximity-dependent biotinylation enzyme, to E3 ubiquitin ligase. We also showed that AirID-CRBN thalidomide- or thalidomide derivatives-dependently biotinylated neosubstrates. Furthermore, we showed that combination AirID and mass spectrometry enable us to comprehensive analysis, and that this method reflected well-known neo-substrate selectivity of thalidomide derivatives. Importantly, we identified novel neosubstrates involved in haematological cancer using this method.

研究分野：医歯薬学 / 薬学

キーワード：サリドマイド 近接ピオチン化酵素 CRBN タンパク質分解 ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1. サリドマイドは半世紀以上前に世界規模の薬害を引き起こしたが、サリドマイド誘導体/IMiDsは多発性骨髄腫などの血液がんに対して年間1兆円規模で広く利用されている。過去10年間の研究から、IMiDsはE3リガーゼヘネオ基質タンパク質を近接させ分解誘導する“分子のり”の様な働きにより、その薬効および副作用を発揮することが報告されている。現在、新たな疾患を標的にした新規なサリドマイド誘導体の開発が行われており、いくつかの誘導体は既に臨床段階にある。しかしながら、IMiDsに起因する薬効および副作用における作用機序に関しては未解明な点が多く残されている。そのため、IMiDsの薬効解明には、新たなネオ基質の探索・同定とその機能解析は喫緊の重要な研究課題である。実際に、これらのIMiDs応答に関する研究は、現在、大手製薬企業も巻き込んだ世界中で精力的に研究されている非常に競争が激しい分野である。
2. 研究代表者らはこれまでに、IMiDs依存性のCRBN-ネオ基質間の相互作用を検出可能な生化学的な評価系を構築し、サリドマイド催奇性に関与する新規ネオ基質としてPLZFを見出した。また、近接ピオチン化酵素を改良することによって相互作用タンパク質をピオチン化ラベルすることが可能な酵素AirIDを開発した。これまでの研究から、ストレプトアビジンビーズを用いたPull-downアッセイによって、既報のネオ基質であるIkarosやSALL4のピオチン化が可能であることを確認している。

2. 研究の目的

1. 2020年に研究代表者らが開発した新規近位依存性ピオチン化酵素AirIDを用いることで、サリドマイドやその誘導体のネオ基質探索に有用な新たな評価系の構築を目的とする。
2. 構築した評価系を用いた網羅的な解析を行い、サリドマイド誘導体の作用メカニズムに関与する新たなネオ基質を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

1. 質量分析を用いたIMiD依存性CRBN相互作用タンパク質の探索
近接ピオチン化酵素AirIDをサリドマイド標的タンパク質であるCRBNへ融合し、サリドマイド依存的にピオチン化されるタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。次に、本評価系がサリドマイド誘導体のネオ基質選択性の評価に利用可能であるかを質量分析およびストレプトアビジンプルダウン法により評価した。
2. 組み換えタンパク質・培養細胞を用いたネオ基質候補タンパク質の解析
1.の解析によって見出された相互作用タンパク質候補を対象に、組み換えタンパク質を用いた生化学的な解析を行った。最後に、見出された相互作用タンパク質を対象に、サリドマイド依存的なタンパク質分解やIMiDs応答における関与を解析した。
3. マウス個体内におけるサリドマイド依存的な相互作用解析
CRBN-AirIDを全身に発現するマウス個体へピオチン飲料水を与え、サリドマイドおよびサリドマイド誘導体を腹腔内投与した。投与6時間後に脾臓および胸腺をサンプリングし、ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウンを行い、ネオ基質のピオチン化を解析した。

4. 研究成果

1. AirID-CRBNを安定発現する培養細胞を用いて、サリドマイドやサリドマイド誘導体依存的にピオチン化されるタンパク質の網羅的な探索系を構築した。
2. 様々なピオチン化タンパク質およびペプチドの濃縮法を検討し、Tamavidin 2-REVを用いた濃縮法がサリドマイド依存的な相互作用タンパク質のピオチン化解析に適していることを明らかにした(図1)。

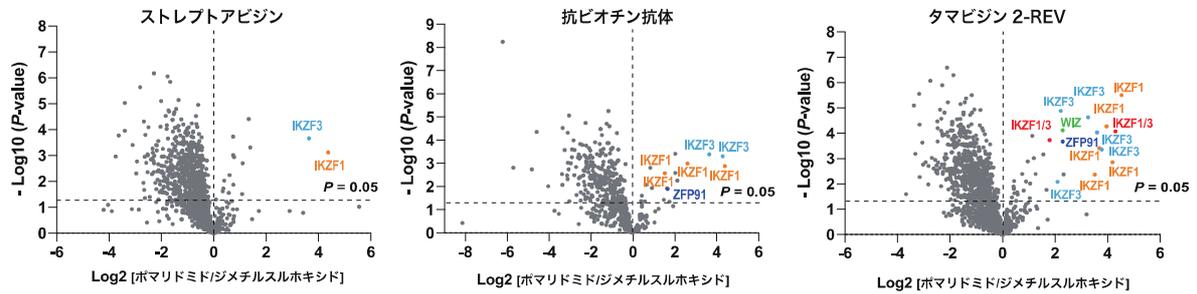


図 1. サリドマイド依存的な相互作用解析におけるビオチン化タンパク質・ペプチドの濃縮法の比較

3. サリドマイド誘導体はその化学構造に依存して全く異なるネオ基質選択性を示すことが報告されている。重要なことに、本アプローチを用いることでサリドマイド誘導体のネオ基質選択性を評価することが可能であることが明らかとなった(図 2)。

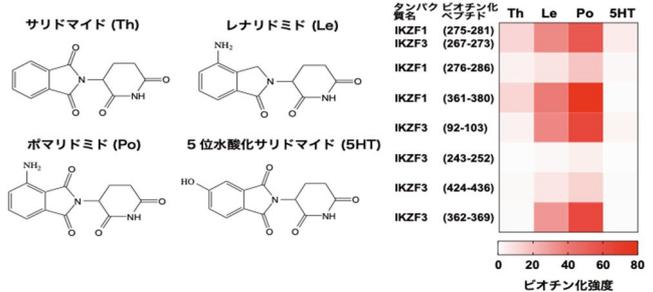


図 2. サリドマイド誘導体の化学構造(左)および特異性の評価(右)

4. 様々な培養細胞を用いた質量分析の結果から、サリドマイド誘導体のネオ基質候補を複数見出した。見出したネオ基質候補を対象にした生化学的な相互作用解析の結果、これまでに報告のないサリドマイド誘導体依存的な CRBN 相互作用タンパク質を見出した。
5. 培養細胞を用いた詳細な解析から、ポマリドミド依存的に分解誘導されるネオ基質として ZMYM2 を見出した(図 3)。さらに、血液がんに関連する融合タンパク質である ZMYM2-FGFR1 もまたポマリドミドのネオ基質であることを見出した(図 4)。これらの成果は、本評価系がサリドマイド誘導体の相互作用解析に有用であることを強く示唆している。

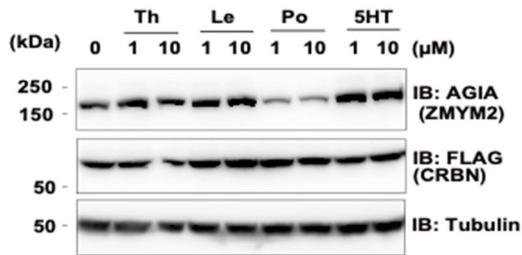


図 3. ポマリドミドによる ZMYM2 の分解解析

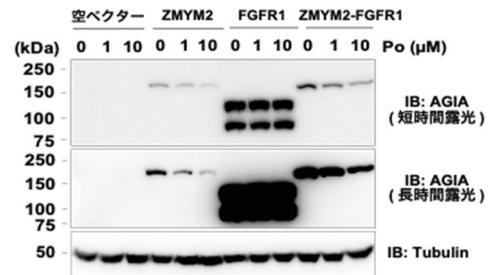


図 4. ZMYM2-FGFR1 の分解解析

6. マウス個体サンプルを用いた解析から、サリドマイド誘導体依存的なネオ基質 IKZF1 および IKZF3 のビオチン化を確認した。さらに、ビオチン化強度を比較した結果、サリドマイド誘導体のネオ基質選択性を反映していた。これらの結果は、本評価系がマウス個体へと応用可能であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Horiuchi Yuto, Matsuoka Saya, Kido Kohki, Nishino Kohei, Maeno Mayaka, Shibata Norio, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27818-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中 聡士、堀内 雄斗、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也
2. 発表標題 新規近接ビオチン化酵素AirIDを用いたタンパク質分解誘導剤依存的なインタラクトーム解析技術の開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中 聡士、堀内 雄斗、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也
2. 発表標題 近位依存性ビオチン化酵素を用いたタンパク質分解誘導剤依存的な相互作用解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀内雄斗, 山中聡士, 西野耕平, 小迫英尊, 澤崎達也
2. 発表標題 近位依存性ビオチン化酵素AirIDを用いたタンパク質分解誘導剤依存的なビオチン標識解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

低分子化合物依存な相互作用解析技術の開発
https://www.ehime-u.ac.jp/data_release/data_release-190039/

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
---------	---------