

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22564

研究課題名(和文)疾患特異的タンパク質の分解誘導システムの開発・応用

研究課題名(英文)Development and application of disease-specific protein targeting system

研究代表者

東山 繁樹(Higashiyama, Shigeki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：CUL3-SPOP UbE3リガーゼを任意の標的タンパク質に指向性を持たせる基質指向性変換モジュレーターの開発を、DNAアプタマーを基盤として行った。SPOPに特異的に結合する低分子化合物として#14607を取得し、これにN-ヒドロキシスクシイミド基を導入した。一方、標的基質 CBF1に特異的に結合する分子としてDNAアプタマー15種を取得し、この5'末端にアミノ基を導入し、両者を架橋した。これを基質指向性変換モジュレーターとして、まずインビトロユビキチン化反応にて、CUL3-SPOPによるCBF1のUb化と分解を検討した。その結果、CBF1のUb化の検出には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子解析技術の進歩は、様々な疾患特異的遺伝子変異を明らかにしてきているが、治療目的の個体内で遺伝子修復は極めて遠い道のりである。では、「遺伝子変異によって産生される変異タンパク質を標的とする治療薬開発は可能か?」という、個々の変異タンパク質に対して個別に創薬を進める必要があることから、極めて困難な道筋である。しかし、個々の変異タンパク質に対する創薬に、一つの共通技術プラットフォームができれば、この戦略は飛躍的に前進する。本研究の成果は、その共通技術プラットフォームの創出を可能にするものであり、従来法より作成時間と労力を大幅に短縮でき、その社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Mutated proteins are promising therapeutic targets in various diseases including cancers. Bi-functional protein-targeting chimeric molecules PROTACs which cross-link ubiquitin (Ub) E3 ligases and non-substrate proteins have been developed. However, successfully developed PROTACs are quite limited, because they consist of chemical compounds. On the other hand, it has been shown that single strand DNA aptamers are able to recognize specifically even single amino-acid mutated proteins. In this study, we tried to develop disease specific protein targeting modulators based on CUL3-SPOP and DNA aptamers. We successfully identified a SPOP-binding chemical compound #14607 and isolated 15 kinds of DNA aptamers for CBF1 (a target protein) with high affinity (Kd: 10-300 nM), and developed CBF1 targeting modulators, #14607-CBF1-DNA aptamers. We tested them in an in vitro Ub-ligation assay system. Unfortunately, we have not detected CBF1 Ub-ligation in this system yet.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：DNA aptamer protein targeting SPOP CUL3 CBF1

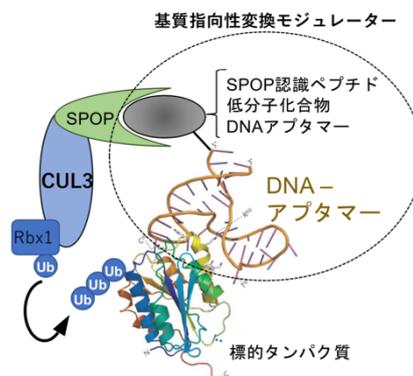
1. 研究開始当初の背景

遺伝子解析技術の簡易・高速化は、様々な疾患特異的な遺伝子変異を明らかにし、変異遺伝子由来タンパク質の機能変換や治療標的分子としての有用性検証に道を開いた。また、昨今のゲノム編集技術の創出と改良は、「変異遺伝子の修復による正常化」という夢のような話を現実のものにしつつあるが、オフターゲット効果による非特異的遺伝子改変が予想以上に頻発することや、個体内で遺伝子改変ができる細胞数が極端に少ないなど技術的に解決すべき課題の壁は大きい。では、「変異タンパク質を標的とする治療薬開発は可能か?」という、個々の変異タンパク質に対して個別に創薬を進める必要があることから、極めて困難な道筋である。しかし、個々の変異タンパク質に対する創薬に、一つの共通技術プラットフォームができれば、この戦略は飛躍的に前進する。本研究において提案するのは、その共通技術プラットフォームの創出である。

ユビキチン(Ub)-プロテアソーム経路やオートファジー経路を利用して標的タンパク質を特異的に分解する「プロテインノックダウン法」の開発は、タンパク質の機能解析ツール及び分子標的創薬の2つの側面において大きな学術的意義を有する。既存の Ub-プロテアソーム経路によるプロテインノックダウン法は、ユビキチン E3 リガーゼ(UbE3)と標的タンパク質を1分子化合物で架橋させる PROTAC 開発が中心となって進んでいる。しかし、これまでに開発されている PROTAC は、利用できる UbE3 が CRBN、DCAF、VHL、IAP 等極めて限定的で、さらに他の有用な E3 や標的タンパク質に対する低分子化合物リガンドの取得に困難を極めているのが現状である。その大きな原因は、取り扱える化合物ライブラリーの規模が小さすぎる($<10^6\sim 10^7$) ことと、スクリーニングが大規模で、時間と労力がかかりすぎることである。

申請者はこれまでに、CUL3 をプラットフォームとする UbE3 の血管内皮細胞 (*Blood* 2012, *Sci. Rep* 2017, *Biol. Open* 2017, *J. Cell Biol.* 2018) 並びに前立腺がんや乳がん等のがん細胞における機能破綻に関して研究を進める中で、基質受容体として機能する SPOP の重要性を明らかにし (*Sci. Rep* 2017)、さらにはその基質探索と、基質との結合を阻害する化合物の探索を目的として、研究を進めてきた。これまでに、SPOP 特異的基質の探索を、ビオチン化 SPOP タンパク質をプローブとして当センターが独自に開発し保有する Flag-タグ 20000 プロテインアレイを用いて行い 189 種を同定した。そのアミノ酸配列解析から、SPOP が嗜好する結合配列 ϕ - π -S-S/T-S/T を含む配列を抽出し、この情報に基づき高親和性 SPOP 結合ペプチド(SPOP-Recognition Peptide : SRP)を単離・開発した。一方、標的基質タンパク質に結合する低分子化合物を単離するのは容易ではないが、DNA アプタマーを調製することは、大学の実験室レベルで可能である。そこで、標的基質に対する DNA アプタマーを単離し、これを上記 SRP と結合させることで CUL3-SPOP を UbE3 として用いる「DNA アプタマーを基盤とした基質指向性変換モジュレーター」の開発を考えた。

【図1：SPOP-結合分子を付加した標的タンパク質特異的 DNA アプタマー (基質指向性変換モジュレーター) の概略図】



2. 研究の目的

CUL3-SPOP-UbE3 リガーゼを、任意に標的としたいタンパク質、特に遺伝子変異によって恒常的活性化を起こすような癌遺伝子タンパク質とを橋渡しし、これらを分解に導くような架橋剤「基質指向性変換モジュレーター」を創出する。これにより、疾患特異的変異タンパク質を任意に標的・分解する共通技術プラットフォームを提案・創出し、その有用性と汎用性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 標的タンパク質に特異的に結合する一本鎖 DNA アプタマーの選別 (SELEX)

ビオチンリガーゼ認識部位を導入した標的変異型タンパク質 (変異 Ras (mRas)と変異 EGFR (mEGFR) 及びそれらの野生型タンパク質、また前立腺癌特異的変異 SPOP (SPOP^{F133V})と野生型 SPOP、及び血管新生制御因子 CBF1 タンパク質) を小麦胚芽無細胞系で合成後、部位特異的にビオチン化する。また、30 塩基長のランダム配列およびその両脇に 20 塩基長の固定配列 (PCR プライマーの結合領域) を有する一本鎖 DNA (70 塩基長) のライブラリーを化学合成する (約 5 nmol、多様性は 3×10^{15} 程度)。一本鎖 DNA のライブラリーをストレプトアビジン (SAv) ビーズと混合し、ビーズに結合する DNA を取り除く (ネガティブセレクション)。この操作を 3 回繰り返す。ビーズに結合しなかった DNA ライブラリーを、変異型タンパク質を固定させた SAv ビーズと数分間混合する。ビーズを数回洗浄後、変性溶液を加えて加熱することにより、ビーズ上の

タンパク質-DNA (アプタマー) 複合体を解離して、DNA (アプタマー) を遊離させる。遊離 DNA (アプタマー) をスピнкаラムで精製し、5'末端がリン酸化されたリバースプライマーおよび未修飾のフォワードプライマーを用いて、PCR 法により増幅する。増幅された二本鎖 DNA を λ エキソヌクレアーゼで処理することで、鋳型鎖 (5'リン酸化鎖) を消化し、さらにスピнкаラムで精製することによって、一本鎖 DNA (アプタマーのライブラリ) を得る。より強力に標的タンパク質に結合するアプタマーを得るために、一連の作業 (ネガティブセレクションから λ エキソヌクレアーゼ処理・精製まで) を、結合条件を厳しくしながら (標的タンパク質濃度を薄めながら) 数ラウンド繰り返す。また、標的の変異型タンパク質のみに特異的に結合するアプタマーを獲得するため、後方のラウンドでは、野生型タンパク質を固定化させた SAv ビーズを用いてネガティブセレクションを行い、野生型に結合する DNA を取り除く。最終的に、解離定数 (K_D) が標的 (変異型) タンパク質に対して 1nM 以下、野生型タンパク質に対して 1 μ M 以上となるまで標的変異アプタマーを濃縮する。濃縮したアプタマーライブラリのランダム領域の塩基配列を読み、リード数の多いアプタマーを数十個ピックアップする。また、それぞれのアプタマーの 5'末端にチオール基導入したもの (SH-アプタマー) とアミノ基を導入したもの (NH_2 -アプタマー) を化学合成する。

(2) SPOP 結合分子 (SRP、低分子化合物、DNA アプタマー) の単離・調製

SPOP 結合分子として、既に SPOP 認識ペプチド SRP を単離している。SPOP に結合する低分子化合物の単離は、SPOP-SRP の結合測定システムを ELISA 法で構築し、これを用いて SPOP-SRP の結合阻害、または結合増強を誘導する化合物をスクリーニングし、SPOP との直接的結合は BIACORE 解析により確認する。また、SPOP に結合する DNA アプタマーは既述の方法により単離する。

(3) 基質指向性変換モジュレーター の作成と評価

SPOP の認識するペプチド SRP を N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 活性化マレイミドと反応させて、C 末端のリジン残基にマレイミド基を導入する (SRP-Mal)。各 SH-アプタマーと SRP-Mal をマイケル付加反応で結合させ、アプタマー-SRP 架橋体を調製する。SPOP 結合低分子化合物は、マレイミド基導入化合物を化学合成し、各 NH_2 -アプタマーと結合反応させ、アプタマー-SPOP 結合低分子化合物架橋体を調製する。SPOP 結合 DNA アプタマーと標的基質認識 DNA アプタマーを一本鎖とするバイバレント・アプタマーの化学合成により調製する。得られる各架橋分子を試験管内再構成系 Ub 化アッセイ (in vitro アッセイ) および培養細胞系での Ub 化アッセイ (in vivo アッセイ) で機能評価を行う。

4. 研究成果

(1) DNA アプタマーの単離および特性解析

標的タンパク質として先行して準備済みの前立腺癌特異的変異 SPOP ($\text{SPOP}^{\text{F133V}}$) 及び血管新生制御因子 CBF1 を標的とし、これらのビオチン化リコンビナントタンパク質を小麦胚芽無細胞系で合成を開始した。一方、30 塩基長のランダム配列およびその両脇に 20 塩基長の固定配列 (PCR プライマーの結合領域) を有する一本鎖 DNA (70 塩基長) のライブラリを化学合成した (約 5 nmol、多様性は 3×10^{15} 程度)。この一本鎖 DNA のライブラリから、 $\text{SPOP}^{\text{F133V}}$ 及び CBF1 に結合する DNA アプタマーを、SELEX 法を 10~14 ラウンド繰り返すことにより、それぞれ 5 種及び 15 種の候補 DNA アプタマーを単離した。また、5 種の $\text{SPOP}^{\text{F133V}}$ DNA アプタマーから、特異的なものは、野生型 SPOP との結合比較から、1 種 $\text{SPOP}^{\text{F133V}}$ に特性を示す DNA アプタマーを得た。得られた DNA アプタマーの解離定数 (K_D) は 12 nM ~ 296 nM の範囲であった。Table1 および 2 に CBF1 DNA アプタマーのスクリーニング条件並びに塩基配列を示す。

TABLE 1. THE CONCENTRATIONS OF BIOTIN-CBF1 AND ssDNA AND PCR CONDITIONS FOR AMPLIFICATION OF THE ssDNA POOL IN EACH SELEX ROUND

Round	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Biotin-CBF1 (nM)	2,000	400	50	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ssDNA (nM)	92,600	568	38	35	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Volume of PCR template (μ L) in a total 50 μ L of PCR	14	14	14	14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of PCR cycle	15	15	15	10	15	15	15	12	10	10	9	9	9	9

CBF1, C promoter binding factor 1; PCR, polymerase chain reaction; SELEX, systematic evolution of ligands by the exponential enrichment; ssDNA, single-stranded deoxyribonucleic acid.

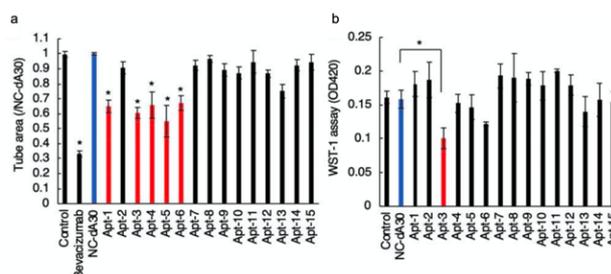
TABLE 2. LIST OF THE CBF1-BOUND ssDNA APTAMERS DEVELOPED IN THIS STUDY

Aptamer	Sequence and length (nt)	K_d (nM)	Abundance in 14th pool (%) [No. of reads]
Apt-1	ATAGGAGTCGACCGACCAGACAACCCCTACGCGACCAACC AGATGACCTACGTGCGTCTACATCTAGACTC (70)	256	28.7 [4,912]
Apt-2	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCCGCTCTCCTTTTCATG TGACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (70)	153	19.1 [3,272]
Apt-3	ATAGGAGTCGACCGACCAGACAACCCCTACGCGACCAACC CCAGATGACCTACGTGCGTCTACATCTAGACTC (72)	34	1.28 [220]
Apt-4	ATAGGAGTCGACCGACCAGAGACCCCGCTATCTAAATTT ATAGGCAATAAGTGCCTTACATCTAGACTC (70)	162	1.07 [184]
Apt-5	ATAGGAGTCGACCGACCAGAACCCGTCCCATACTTCTCC AGCGATACTTAGTGCGTCTACATCTAGACTC (70)	296	0.86 [148]
Apt-6	ATAGGAGTCGACCGACCAGACAACCCCTACGCGTACCAA CCAGATGACCTACGTGCGTCTACATCTAGACTC (71)	25	0.57 [98]
Apt-7	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCCGCTCTCCTTTTCATG GACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (68)	61	0.44 [75]
Apt-8	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCCGCTCTCCTTTTCATG TGACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (69)	21	0.38 [65]
Apt-9	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCGACTCTCTTTTACTG TGACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (69)	17	0.29 [50]
Apt-10	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCGACTCTCCTTTTCATG TGACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (69)	24	0.27 [47]
Apt-11	ATAGGAGTCGACCGACCAGACAACCTTGTCTTAGGAGTTTA CGGTGGGAATAGTGCGTCTACATCTAGACTC (70)	233	0.22 [38]
Apt-12	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCGACTCTCTTTTCATG GACACAATGGTGCCTTACATCTAGACTC (68)	10	0.18 [30]
Apt-13	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCATCCACGCCAAGACC AATTTTCCCTGTGCGTCTACATCTAGACTC (69)	12	0.15 [26]
Apt-14	ATAGGAGTCGACCGACCAGACAACCCCTACGCTCGTACC AACCAGATGACCTACGTGGCGTCTACATCTAGACTC (75)	33	0.15 [26]
Apt-15	ATAGGAGTCGACCGACCAGACCCGCTCGTCTACCAA CTGATGACCTAGTGCGTCTACATCTAGACTC (71)	44	0.087 [15]
NC-dA30	ATAGGAGTCGACCGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAGTGCCTTACATCTAGACTC (70)	n.d.	n.d.

The sequence of negative control-dA30 (NC-dA30) aptamer used in this study is also shown. The percentage of abundance in 14th pool is a ratio for the number of reads/total reads (17,140 reads). n.d., not detected.

得られた CBF1-DNA アプタマーの機能評価を、血管内皮細胞を用いて、管腔形成及び細胞増殖アッセイで行った。その結果、Apt-1,3,4,5,6 に管腔形成抑制活性を(図 2 a)、また、Apt-3 に細胞増殖抑制活性を(図 2 b)確認した。また、Apt-3 が CBF1 の転写標的遺伝子である HEY2 の遺伝子発現を促進することを確認した。これらのことから、Apt-1,3,4,5,6 は CBF1 活性を正に制御することで血管内皮細胞増殖及び血管新生活性を抑制することが示された。

【図 2： CBF1-DNA アプタマーの血管内皮細胞 (HUVEC) 管腔形成 (a) 及び細胞増殖 (b) に及ぼす効果】



(2) SPOP 結合低分子化合物および DNA アプタマーの単離と特性解析

SPOP 結合ペプチド SRP は既に単離済みである。SPOP に結合する低分子化合物の単離に用いるアッセイ系として、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系で合成したリコンビナント SPOP タンパク質を 96 ウェルプレートに固相化後、合成ビオチン化 SRP を反応させ、洗浄後、結合したビオチン化 SRP をアビジン HRPO で検出する ELISA 系を構築した。この系を用いて保有する低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、SPOP と SRP の結合を増幅する低分子化合物#533 を単離した。また、興味深いことに#533 は、既知の基質並びに SRP との結合能を失っている SPOP 変異体 SPOP^{F133V} と SRP との結合を回復させる活性を示した。また、SPOP に結合する DNA アプタマーの単離については、前項に記載した。得られた SPOP-SRP、#533、および SPOP-DNA アプタマー (5 種) の SPOP に対する結合特性を Biacore 解析した結果、それぞれ 3700 nM、70 nM および ~ 200 nM の K_D であった。また、SPOP-DNA アプタマーの SPOP 結合領域を解析するために、MATH、BACK、BTB 各ドメイン欠損変異体リコンビナント SPOP との結合をアルファスクリーン法で解析した結果、BACK および BTB ドメインに結合することが明らかとなった。BTB ドメイン CUL3 との結合ドメインであることから、得られた SPOP-DNA アプタマーが CUL3 との複合体形成を阻害する可能性がある。よってこれらの結果から、低分子化合物#533 を基盤として解析を進め、#533 に *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 基導入に適した類縁化合物#14607 化合物を取得した。以降、基質指向性変換モジュレーター作成は#14607 と DNA アプタマーを用い

て作成することとした。

(3) 基質指向性変換モジュレーター の作成と評価

得られた SPOP 結合低分子化合物#14607 の両化合物に NHS 基を導入した NHS-#14607 を化学合成した。またこれまでに取得した NHS-14607 と NH₂-CBF1-DNA アプタマーとを中性条件下で反応させることで、#14607-CBF1-DNA アプタマーを作製した。まず、CBF1-DNA アプタマーへの#14607 化合物の導入確認は、His-SPOP と Flag-CBF1 の#14607-CBF1-DNA アプタマーの介在による結合の有無を AlphaScreen 法により検証し、その結合を確認した。この結果から#14607-CBF1-DNA アプタマーが調製できたと判断した。

次にインビトロユビキチン化反応系を、既報 (*Molecular Cell* 2009, 36, 39)に準じ、ヒト E1: UBE1 (UBA1) (250 nM) / E2: UbcH5A (2 μM) / E3: NEDD-8-CUL3-Rbx1 (2 μM) / SPOP (2 μM) / ubiquitin (75 μM) / BSA, (2mg/ml) の各成分を 50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP and 1 mM DTT 緩衝液で調製し、構築した。ユビキチン化反応は上記反応液に 20 uM GST-CBF1 と 20 uM #14607-CBF1-DNA アプタマーを加え、5、10、20、30 分の各時間、室温で反応させ、1% SDS-PAGE 緩衝液を加えることで反応を停止した。抗 GST-抗体及び抗ユビキチン抗体を用いた Western blot により解析した結果、CBF1 のユビキチン化を検出するには至らなかった。今後、培養細胞を用いた検討も行う。

5. 今後の課題

CUL3-SPOP を用いて標的とする任意タンパク質の Ub 化と分解を誘導する基質指向性変換モジュレーターを構成する SPOP 結合低分子化合物のバリエーションを増やすために、SPOP の MATH、BACK ドメインを用いてスクリーニングを行う。また、当初予定の変異 Ras と変異 EGFR 特異的に結合する DNA アプタマーの調整を継続して行う。

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 Mari Tezuka-Kagajo, Masashi Maekawa, Atsushi Ogawa, Yoshiko Hatta, Eiichi Ishii, Mariko Eguchi, Shigeki Higashiyama	4. 巻 30
2. 論文標題 Development of Human CBF1-Targeting Single-Stranded DNA Aptamers with Antiangiogenic Activity In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 365-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/nat.2020.0875	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 C B F 1 結合核酸分子およびその用途	発明者 東山繁樹、小川敦、 前川大志、八田佳 子、加賀城真理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-59546	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	小川 敦司 (Ogawa Atsushi) (30442940)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授 (16301)	
研究 分担者	福田 信治 (Fukuda Shinji) (70398238)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師 (16301)	

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