

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05733

研究課題名（和文）小分子化合物と光によるタンパク質分解の時空間的制御

研究課題名（英文）Spatiotemporal regulation of protein degradation by small molecule compound and light

研究代表者

竹本 靖（Takemoto, Yasushi）

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：50453543

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の特定のタンパク質の発現量を低下させる技術は、これまでに様々に開発されてきた。その究極は、「特定のタンパク質を、望む時に、望む場所で、望む量を低下させる」ことであろう。一方、申請者は偶然にも、スクアレン合成酵素（SQS）の阻害剤として開発されたYM-53601が、SQSのC末領域を付加したタンパク質に対し、選択的に光分解を誘導することを見出した。そこで、本研究課題では、申請者が発見した知見を理解し、特定のタンパク質の分解を時空間的に制御する技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々のタンパク質の機能を理解する最良の方法は、細胞内のタンパク質の発現量を低下させ、その時に現れる表現型を解析することである。事実、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集によるノックアウト法やRNA干渉法によるmRNAレベルでのノックダウン法は、現在広く用いられている。さらに、タンパク質の機能を時空間的に解析する、すなわち、特定の時に、特定の空間に存在する目的のタンパク質を選択的に分解できる技術を開発することができれば、より詳細に生命現象の解明を行うことができる。本研究は、そのような技術の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Various techniques have been developed to decrease the expression of particular protein in cells. The last of this technique will be that the expression of a particular protein can be decreased anytime, anyplace, in any amount. We accidentally found that YM-53601, a known small-molecule inhibitor of squalene synthase (SQS), selectively depletes the protein fused with COOH terminal region of SQS upon UV irradiation. Based on our findings, we have developed the technique to control the degradation of specific protein spatiotemporally.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 小分子化合物 光照射 タンパク質分解

### 1. 研究開始当初の背景

個々のタンパク質の機能を理解する最良の方法は、細胞内のタンパク質の発現量を低下させ、その時に現れる表現型を解析することである。事実、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によるノックアウト法や RNA 干渉法による mRNA レベルでのノックダウン法は、現在広く用いられている。

PROTAC (proteolysis-targeting chimera) や AID (Auxin-Inducible Degron) 法といった、小分子化合物を用いて目的のタンパク質を分解する方法も開発されている。PROTAC では、目的とするタンパク質に結合する小分子化合物を取得し、サリドマイド等のユビキチン E3-リガーゼをリクルートする化合物を連結することで、目的タンパク質をプロテアソーム系への分解に誘導する。また、AID 法では、植物由来のオーキシン依存のデグロン配列を分解の目印として目的のタンパク質に付加し、オーキシン添加時にデグロン配列がユビキチン化されることで、やはりプロテアソーム系での分解へ誘導する。

これらの手法が現在の細胞生物学研究に大いに貢献していることは疑いない。しかし、上述の手法では、「細胞群の中のある特定の細胞に対し目的のタンパク質の発現量のみを低下させる」、あるいは、「1 細胞内の特定の場所に局在したタンパク質の発現量のみを低下させる」、といったヘテロな環境下でのタンパク質機能の解析は難しい。そこで、タンパク質の機能を時空間的に解析する、すなわち、特定の時に、特定の空間に存在する目的のタンパク質を選択的に分解できる技術を開発することができれば、従来の手法では解析が困難であった生命現象の解明を行うことができる。

### 2. 研究の目的

申請者は、ケミカルバイオロジー研究を行っている過程で、スクアレン合成酵素 (SQS) の酵素阻害剤である YM-53601 (図 1) を細胞に添加し、紫外線を照射すると、SQS が分解されることを偶然発見した。様々な SQS の欠損変異体を作製し検討したところ、SQS の C 末領域 (371-397 アミノ酸) が YM-53601 による光分解に重要であった。さらに、この領域を EGFP との融合タンパク質として細胞に発現させ、紫外線を照射すると、YM-53601 の存在下で分解された。そこで、本研究の目的は、この発見した知見を理解して、SQS の C 末領域を光分解性タグとして活用し、特定のタンパク質を選択的に分解する技術を確立することである (図 1)。

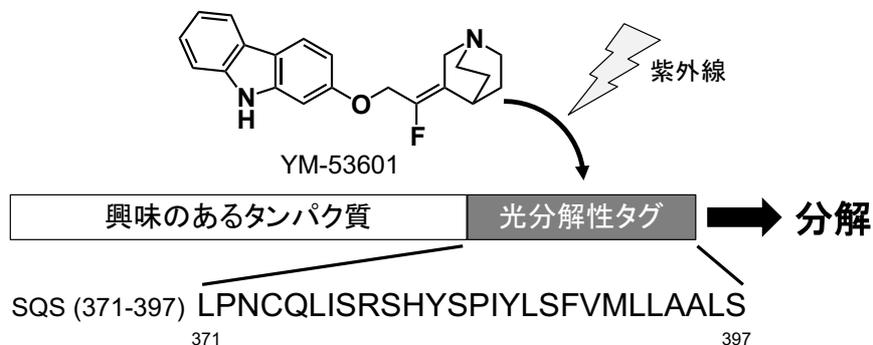


図 1 YM-53601 による任意のタンパク質の光分解

### 3. 研究の方法

#### (1) プラスミドの作製

SQS 遺伝子 (全長、及び欠損変異体) は、HEK293 細胞の cDNA ライブラリーから PCR で増幅し、pCMV-3Tag-1a にクローニングした。EGFP 遺伝子は、pEGFP-N1 をテンプレートとして PCR で増幅して、pCMV-3Tag-1a、あるいは pCMV-3Tag-3a にサブクローニングした。その後、EGFP との融合タンパク質として発現させるために、PCR で増幅した SQS の C 末領域を挿入した。欠損変異体、及び点変異体は、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて作製した。

#### (2) YM-53601 によるタンパク質の光分解

$1 \times 10^5$  個の細胞を 12 穴プレートにまき、翌日、プラスミドをトランスフェクションした。24 時間後、薬剤を添加し、さらに 1 時間培養した後、BIO-LINK® crosslinker (BLX-365) (Vilber-Loumat) で細胞に紫外線 (365 nm) を照射した。その後、回収した細胞を可溶化し、ウェスタンブロッティングにより目的のタンパク質を検出した。

### (3) 試験管内での YM-53601 によるタンパク質の光分解

3×FLAG タグの EGFP 及び SQS の C 末領域を融合した EGFP タンパク質は、HEK293 細胞に過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体を用いて精製して得た。得られたタンパク質を PBS に懸濁し、YM-53601 存在下、あるいは非存在下で紫外線を照射した。その後、ウェスタンブロッティングにより目的のタンパク質を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) YM-53601 による SQS の C 末領域が付加されたタンパク質の光分解機構の解析

#### ① YM-53601 の誘導体を用いた解析

まず、YM-53601 がどのようなメカニズムで、SQS の C 末領域が付加されたタンパク質に対し光分解を誘導するのか、誘導体を作製して解析した。YM-53601 には、紫外線照射にตอบสนองしそうな官能基として、カルバゾール、および二重結合が存在する。そこで、カルバゾールの窒素原子を炭素原子に置換した誘導体 1、および二重結合を還元した誘導体 2 を作製し、検討した (図 2)。

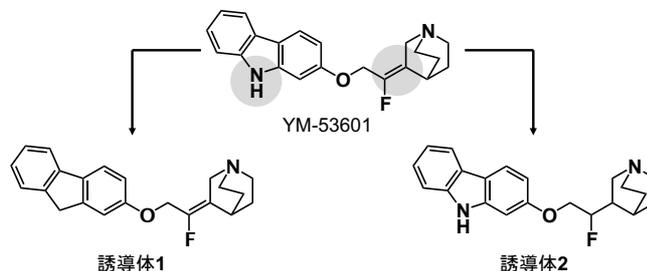


図 2 YM-53601 の誘導体

その結果、誘導体 2 は YM-53601 と同様に SQS に対し光分解を誘導したのに対し、誘導体 1 は光分解を誘導することができなかった。従って、YM-53601 のカルバゾール構造が光分解に重要であることが明らかとなった。

カルバゾールは紫外線照射によりラジカルを生成することが知られている。そこで、YM-53601 に紫外線を照射した際にもラジカルを生成しているか、Electron Spin Resonance (ESR) を測定することにより検討した。その結果、メタノール中で YM-53601 に紫外線を照射すると ESR のシグナルが検出され、確かにラジカルを生成していることが確認された。一方、誘導体 1 に紫外線を照射した際には、ESR のシグナルは観測されたものの、その強度は YM-53601 に比べて弱かった。従って、紫外線照射によるラジカルの生成能と光分解誘導活性に正の相関が存在することが明らかとなった。また、YM-53601 に紫外線を照射した後の反応物を解析したところ、化合物 3 の生成が認められた (図 3)。さらに、ESR の g 値から、生じたラジカルはフェノキシラジカルであると推定された。以上の結果より、紫外線照射により YM-53601 の C-O 結合が開裂し、ラジカルを生成していることが明らかとなった (図 3)。

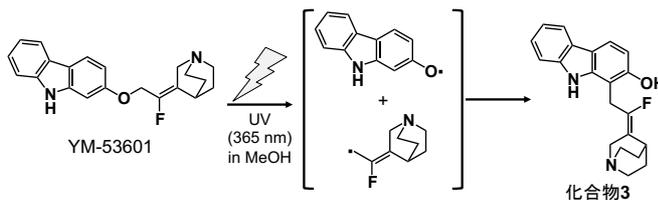


図 3 紫外線照射による YM-53601 の開裂

#### ② ラジカルの生成を介したタンパク質分解

細胞内での主なタンパク質分解経路は、ユビキチン/プロテアソーム系、オートファジー、およびプロテアーゼによる分解である。しかし、YM-53601 による SQS の光分解は、プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤、あるいはプロテアーゼ阻害剤存在下でも生じたことから、この光分解は細胞に備わった分解機構を利用していないと考えられた。そこで、試験管内で、SQS の C 末領域が付加されたタンパク質が YM-53601 の存在下で光分解されるか検討した。まず、SQS の C 末領域由来のペプチドについて検討したところ、YM-53601 の非存在下では紫外線を照射しても分解は全く誘導されないのに対し、YM-53601 の存在下で紫外線を照射すると速やかに分解された。また、精製タンパク質として得た SQS の C 末領域を付加した EGFP タンパク質も、試験管内で、紫外線照射により YM-53601 の存在下で分解が誘導された。さらに、この分解はラジカルスカベンジャーである DMPO の添加により抑制された。以上の結果より、紫外線照射により YM-53601 が開裂してラジカルが生成し、このラジカルの生成を起点として SQS の C 末領域からプロトンが引き抜かれ、これが引き金となってタンパク質全体が分解されることが示唆された。

### (2) YM-53601 による SQS の C 末領域が付加されたタンパク質の光分解法の改良

#### ① YM-53601 の誘導体展開

前述の通り、YM-53601 による SQS の光分解には、そのカルバゾール構造が重要である。そこで、このカルバゾール構造に着目し、更なる誘導体展開を行ったところ、YM-53601 よりもラジカルの生成能、及び光分解活性が高い誘導体を開発することができた。

#### ② YM-53601 及びその類縁体の SQS との結合能と光分解活性との関係

当初、YM-53601 による SQS の光分解には、YM-53601 の SQS に対する結合が重要ではな

いかと考えていた。実際、YM-53601がSQSに結合することは、cellular thermal shift assayにより確認することができた。さらに、C末領域を欠損したSQSの変異体とYM-53601との結合は認められなかった。しかし、SQSとの結合能が低い化合物**3**や、SQSとの結合能がほとんど認められない2-ヒドロキシカルバゾールも、SQSに対し光分解を誘導した。このことから、YM-53601とSQSとの結合以上に、SQSのC末領域のラジカルに対する高い感受性が、YM-53601による光分解に極めて重要な役割を果たしていることが強く示唆された。YM-53601はSQSの酵素活性を阻害するため、タンパク質の光分解を誘導する際には、SQSの酵素阻害活性を有さない誘導体を用いた方が好ましい。従って、この結果は今後の更なる誘導体展開において重要な知見になると考えられる。

### ③ SQSのC末領域について

SQSのC末領域(371-397)のアミノ酸を一つずつアラニンに置換した点変異体(アラニンスキャン)、あるいは数アミノ酸を欠損した変異体を作製して検討した結果、この領域の中で特にラジカルによる分解に重要な領域を同定することができ、その特徴を把握することができた。この知見は、光分解性タグの最小化や分解効率の向上に役立てられると考えられる。

以上の結果より、より短鎖のSQSのC末領域を光分解性タグとして活用し、高活性のYM-53601の誘導体を用いた光分解系を構築することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Louvly Lynn Punzalan, Lulu Jiang, Di Mao, Amarjyoti Das Mahapatra, Shinichi Sato, Yasushi Takemoto, Mari Tsujimura, Kosuke Kusamori, Makiya Nishikawa, Lu Zhou, Motonari Uesugi	4. 巻 27
2. 論文標題 Chemoproteomic Profiling of a Pharmacophore-Focused Chemical Library	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 708-718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2020.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasushi Takemoto, Di Mao, Louvy Lynn Punzalan, Sebastian Goetze, Shin-ichi Sato, Motonari Uesugi	4. 巻 142
2. 論文標題 Discovery of a Small-Molecule-Dependent Photolytic Peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1142-1146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b09178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto Yasushi, Kadota Shin, Minami Itsunari, Otsuka Shinya, Okuda Satoshi, Abo Masahiro, Punzalan Louvy Lynn, Shen Yan, Shiba Yuji, Uesugi Motonari	4. 巻 60
2. 論文標題 Chemical Genetics Reveals a Role of Squalene Synthase in TGF Signaling and Cardiomyogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 21824-21831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202100523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹本 靖、Di Mao、Louvly Punzalan、Sebastian Goetze、上杉 志成
2. 発表標題 YM-53601によるスクアレン合成酵素の光分解機構の解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasushi Takemoto, Di Mao, Louvy Lynn Punzalan, Sebastian Goetze, Shin-ichi Sato, Motonari Uesugi
2. 発表標題 Discovery of a Small-Molecule-Dependent Photolytic Peptide
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本 靖
2. 発表標題 光反応性プローブを用いた生理活性小分子化合物の標的同定
3. 学会等名 JT講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔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