

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22496

研究課題名(和文)細胞内光クロスリンク法によるがん特異的シグナルカスケードの解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer specific signaling cascade by in vivo protein photo-cross-linking approach

研究代表者

土井 健史(DOI, Takefumi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00211409

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)：遺伝子融合型プロテインキナーゼは、異常な細胞内局在を示し、本来とは異なるシグナルカスケードを活性化してがんの悪性化に寄与する。本課題では、細胞内での一過的な相互作用を捕捉できる「細胞内光クロスリンク法」を用い、融合型キナーゼの直接の基質となるタンパク質を同定することで、異常なシグナル経路を明らかにすることを試みた。EGFRキナーゼの基質認識領域に光架橋性人工アミノ酸を導入し、クロスリンクによってその基質を捉えられるか解析したところ、何らかの内在性因子との結合を示唆する結果を得た。これと並行して、クロスリンクで捕捉した基質タンパク質を特異的にラベルし、同定効率を向上させる手法の開発を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

融合型キナーゼにより惹起される異常なシグナルカスケードの解明は、過去20年以上に渡り世界的に取り組まれてきた課題である。本研究では、特定のキナーゼの基質を細胞内における両者の直接的な相互作用をもとに同定するという新規アプローチを提案し、基質の同定効率向上に資する技術開発も行なった。これらを元に、融合型キナーゼの下流カスケードを特異的に明らかにできれば、がん征圧に向けた重要な布石になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Most fusion protein kinases, which are generated by cancer genome instability, show abnormal subcellular localization and contribute to malignant transformation of cancer by activating unusual signaling cascades. In this study, we employed unique in vivo protein photo-cross-linking approach to identify proteins that are direct substrates of fused protein kinases and reveal the abnormal signaling pathway. We introduced a photo-cross-linkable amino acid into the substrate recognition region of EGFR kinase and analyzed whether it could capture the substrate by cross-linking, suggesting binding to some endogenous proteins. In parallel, we developed a method to specifically label the proteins captured by the cross-linking to improve the efficiency of substrate identification.

研究分野：ケミカルバイオロジー、細胞生物学

キーワード：がんゲノム 融合型キナーゼ タンパク質間相互作用 クロスリンク 人工アミノ酸

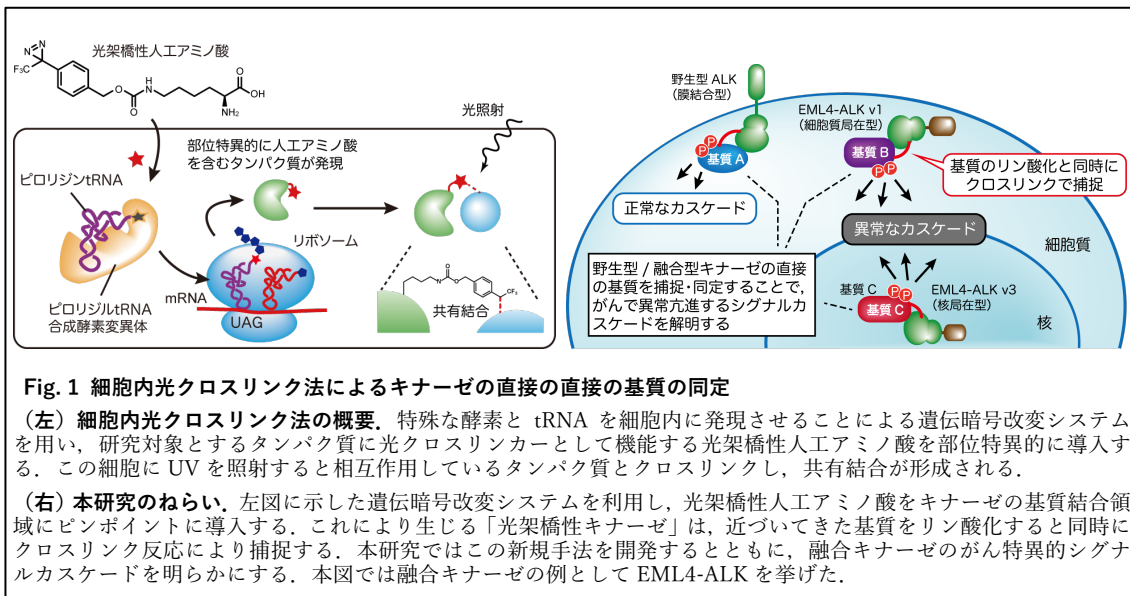
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん組織中ではゲノムの不安定化により様々な融合遺伝子が生じるが、特に、細胞増殖に係るプロテインキナーゼの融合遺伝子はがんの悪性化に深く関与している。多くの融合型キナーゼは、野生型キナーゼとは異なる細胞内局在を示し、本来活性化しないはずのシグナル経路を亢進させる。このことは、融合型キナーゼの特異的な下流カスケードを明らかにすれば、それを標的とした新たながん治療薬が開発できる可能性を示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、野生型および融合型それぞれのキナーゼが細胞内で直接基質とするタンパク質を「細胞内光クロスリンク法」という独自手法を用いて捕捉・同定することにより、融合型キナーゼのみが活性化する下流カスケードを明らかにする (Fig. 1)。この手法の利点は、細胞内で標的とするタンパク質にクロスリンカーを部位特異的に組み込むことにより、生細胞内での実際の局在に応じた一過的なタンパク質間相互作用を鋭敏に捉えることができることにある。これにより、従来の共免疫沈降法による相互作用解析やリン酸化プロテオーム解析による間接的な基質探索では捉えきれなかった「特定のキナーゼがダイレクトに活性化するシグナルカスケード」を明確に捉える全く新しいアプローチが可能となる。



### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞内光クロスリンク法によるキナーゼ-基質間相互作用の捕捉

##### ①EGFR-SHC 複合体をモデルとした

光架橋性人工アミノ酸として広域なクロスリンクが可能な mTmdZ を用いた。タンパク質への部位特異的導入は既報に従った (Fig. 1, Yanagisawa et al. Mol. Biosys. 2012, Kita et al. 2016)。EGFR に対する mTmdZ 導入部位は、EGFR-SHC 複合体結晶構造 (Beglay et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2015) に基づいて SHC ペプチド認識領域周辺に導入されるよう設計した。細胞内光クロスリンクの実施および検証は既報に従った (Hino et al. Nat. Methods 2005)。

#### (2) 基質タンパク質の同定効率を飛躍的に高める新規人工アミノ酸の開発

##### ①新規光架橋性人工アミノ酸 mAA の開発

相互作用タンパク質のラベル化に適した光反応基と標識導入が可能な官能基とを合わせ持つ、新規人工アミノ酸を設計した。設計した人工アミノ酸は、市販の化合物から 4 工程にて合成を達成した。

##### ②mAA のタンパク質への導入と機能の検証

mAA のタンパク質への導入は、人工アミノ酸が導入されると蛍光を発する GFP を用いたアッセイ系により検証した (Kita et al. Sci. Rep. 2016)。mAA のクロスリンク能力は、転写因子 HeyL-Hes1 複合体をモデルとして検証した (Noguchi et al. Development 2019)。具体的には、mAA を導入した HeyL を 293 細胞に発現させ、共発現させた Hes1 との間にクロスリンクが形成されるかを、光照射に依存したシフトバンドの検出を指標に検証した。mAA 導入タンパク質の選択的ビオチンラベル化は既存の方法に従った (Yamaguchi et al. Bioconj. Chem.)。具体的には、精製した mAA 含有 GFP をビオチンアルデヒドとピコリンボラン存在下、pH4 で反応させることでフェニルアミノ基をビオチン化した。検出は Streptavidin-HRP を用いたウエスタンブロットにより行った。

#### 4. 研究成果

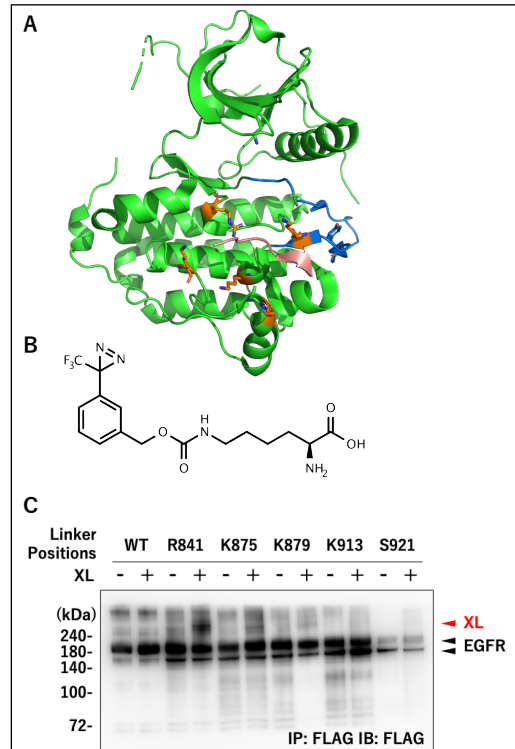
##### (1) 細胞内光クロスリンク法によるキナーゼ-基質間相互作用の捕捉

まず、相互作用様式について多くの知見がある EGFR キナーゼとその基質 SHC をモデルとし、両者の相互作用が細胞内光クロスリンク法により検出できるかを検討した。まず、EGFR キナーゼドメインと SHC 由来ペプチドの複合体構造をもとに、基質認識領域周辺の複数の残基をそれぞれ光架橋性アミノ酸 mTmdZ に置換した 5 つの EGFR 変異体を作製した。これらを FLAG タグ融合体として 293 細胞に発現させ、共発現させた myc タグ融合 SHC との間にクロスリンクが形成されるかをウエスタンブロット法により調べた。その結果、R841 を mTmdZ に置換した場合に抗 FLAG 抗体により検出される約 240kDa のバンドを得た。しかし、このバンドは抗 myc 抗体では検出されなかった。従って、R841mTmdZ 変異体は、SHC 以外の何らかの内在性因子とクロスリンクした可能性が考えられた。

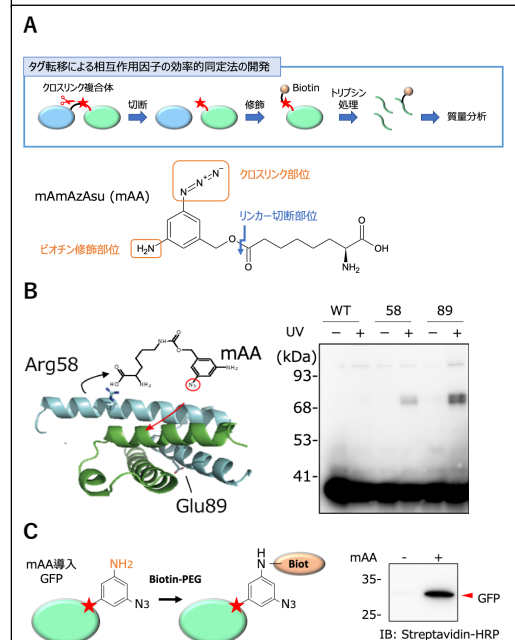
EGFR はその活性化状態に応じて構造を変化させ、基質と結合し得るコンフォメーションを取る。そこで、EGFR に対して活性欠損変異 K745R、活性化変異 L858R を加え、さらに R841 を mTmdZ に置換して基質との結合が捕捉できるかを調べた。しかし、これら変異体を用いても SHC とのクロスリンク複合体は検出されず、約 240kDa のバンドは全ての変異体で検出されたものの、その強度に変化は無かった。以上の結果から、EGFR キナーゼドメインに対する光架橋性アミノ酸の導入により、基質を効果的に捕捉するには至らなかった。

##### (2) 基質タンパク質の同定効率を飛躍的に高める新規人工アミノ酸の開発

上記研究と並行して、クロスリンクで捕捉した基質タンパク質を特異的にラベルし、その同定効率を飛躍的に向上させる新規光架橋性人工アミノ酸を開発した (Fig. 3)。新規に合成したアミノ酸 mAA は分子内に光反応性基としてのフェニルアジド基、特異的付加反応基としてのフェニルアミノ基、リンカー切断部位としてのエステル基を併せ持つ人工アミノ酸である (Fig. 3A)。設計上は、クロスリンク複合体の単離後、特定条件下でリンカーを切断することにより、相手側の相互作用部位に特異的付加反応基を転移させ、ビオチン等で修飾することができる。まず、既存の人工アミノ酸導入系 (Kita et al. Sci. Rep. 2016) を用いて、293 細胞内で mAA を GFP に導入可能であることを確認した。次に、mAA がクロスリンカーとして機能するかを検証した。転写因子 HeyL/Hes1 複合体 (Noguchi et al. Development 2019) をモデルとし、mAA の導入により細胞内で両者をクロスリンクできるかを調べた。その結果、mAA を HeyL の Orange ドメインもしくは bHLH ドメインに導入することで、共発現させた Hes1 とクロスリンクさせることに成功した。最後に、mAA に導入したフェニルアミノ基を介してタンパク質が特異的に標識可能かどうかを検証した。その結果、mAA を導入したタンパク質をビオチンアルデヒドとピコリンボラン存在下、pH4 で反応させることで、特異的にビオチン標識できることがわかった (Fig. 3C)。以上より、当初のねらい通り、mAA はタンパク質への導入、標識の可能な新規光架橋性人工アミノ酸として機能することが示された。



**Fig.2 EGFR への光架橋性アミノ酸導入とクロスリンク実験.** (A) EGFR キナーゼドメインへの光架橋性アミノ酸導入。導入部位をオレンジ、SHC 由来ペプチドをピンク、活性化ループを青で示す。 (B) 光架橋性アミノ酸 mTmdZ の構造。 (C) ウエスタンブロットによるクロスリンク (XL) 形成の検証。アミノ酸導入に依存して赤で示すシフトバンドが検出された (XL+)。



**Fig.3 新規光架橋性アミノ酸の開発** (A) タグ転移による相互作用因子のラベル化。 (上) クロスリンク後にリンカー部分を切断し、選択的ラベル化タグを転移させることで、相互作用因子を特異的にビオチン化する。 (下) 新規アミノ酸 mAA の構造と機能部位。 (B) mAA のクロスリンク能の検証。 (左) HeyL-Hes1 複合体モデル構造 (Orange domain)。 (右) クロスリンク能の検証。光照射依存的にクロスリンク形成を示すシフトバンドが検出された。 (C) mAA を導入した GFP のビオチン修飾。フェニルアミノ基を持つ mAA を導入した GFP が選択的にビオチンラベル化された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Zhang L, Noguchi YT, Nakayama H, Kaji T, Tsujikawa K, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Okada Y, Doi T, Watanabe S, Braun T, Fujio Y, Fukada SI.	4. 巻 29
2. 論文標題 The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2154-2163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.057.	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 Sugiyama A, Kawamura T, Tanaka T, Doi H, Yamashita T, Shinoda K, Fujitani H, Yamatsugu K, Shimizu Y, Tatsumi T, Takahashi K, Kanai M, Mizohata E, Kawato T, Doi T, Inoue T, Kodama T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Cupid and Psyche system for the diagnosis and treatment of advanced cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings Japan Academy. Series B Physical and Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 602-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.95.041.	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 Izawa K., Shirakura K., Kakiuchi K, Funahashi N, Maekawa N, Hino N, Tanaka T, Doi T, Okada Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 PRC2 Components Maintain DNA Hypermethylation of the Upstream Promoter and Regulate Robo4 Expression in Endothelial Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 742-746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-01014.	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 Kashio T, Shirakura K, Kinoshita M, Morita M, Ishiba R, Muraoka K, Kanbara T, Tanaka M, Funatsu R, Hino N, Koyama S, Suzuki R, Yoshioka Y, Aoshi T, Doi T, Okada Y.	4. 巻
2. 論文標題 HDAC inhibitor, MS-275, increases vascular permeability by suppressing Robo4 expression in endothelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers.	6. 最初と最後の頁 1911195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1911195.	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18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和島壮一, 喜多絢海, 谷口健吾, Jeremia Febrian, 齋藤里緒, 高島成二, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法によるDNA脱メチル化酵素TET1の活性調節因子の探索
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 山本紘義, 向山樹, 鳴海良平, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を利用した新規肺がん治療標的の探索
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 樋野展正, 向山樹, 鳴海良平, 川端猛, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 栗栖 源嗣, 足立淳, 土井健史
2. 発表標題 変異集積表面への光クロスリンカー導入によるがん特異的蛋白質間相互作用の同定
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 福田昭平, 橘 敬祐, 福島 純, 阪田昌弘, 西森康友, 土井健史
2. 発表標題 皮膚機能を改善する核内受容体PPAR 活性化成分の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeremia Febrian, 喜多絢海, 谷口健悟, 和島壮一, 斎藤里緒, 高島成二, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 DNA脱メチル化関連酵素TET1の活性調節機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山樹, 廣田康二, 鳴海良平, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を用いたがん特異的タンパク質間相互作用の効率的な解析系の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地弘幸, 布村一人, 林 邦忠, 土井健史, 橘 敬祐
2. 発表標題 新規PPAR 作動薬の創出とその構造展開
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を用いたがん変異に影響されるタンパク質間相互作用の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 薬物標的タンパク質の同定を志向した新規アフィニティーラベル化法の開発
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田匠、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 リガンド結合型オリゴ核酸と相補的オリゴ核酸プローブの二重鎖形成を利用した標的タンパク質同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本紘義，重松知沙，川端猛，栗栖源嗣，土井健史，樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を利用したSTK11のがん関連相互作用の探索
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和島壮一，喜多絢海，谷口健悟，原田和生，土井健史，樋野展正
2. 発表標題 DNA脱メチル化関連酵素TET1の刺激依存的活性調節機構の解明
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重松知沙, 山本紘義, 川端猛, 栗栖源嗣, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を用いたがん関連因子FBXW7 の相互作用解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田理彩, 樋野展正, 山口卓男, 深田宗一朗, 土井健史
2. 発表標題 タンパク質間相互作用界面の同定を可能にする新規光架橋性人工アミノ酸の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本真実, 重松知沙, 山本紘義, 川端猛, 鳴海良平, 足立淳, 栗栖源嗣, 樋野展正, 土井健史
2. 発表標題 がん変異に影響されるFBXW7 の新規タンパク質間相互作用の探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田莉子, 喜多絢海, 谷口健吾, 和島壮一, 斎藤里緒, 原田和生, 樋野展正, 土井健史
2. 発表標題 DNA脱メチル化関連酵素TET1の刺激依存的活性調節の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 齋藤里緒, 喜多絢海, 谷口健吾, 和島壮一, 石田莉子, 原田和生, 樋野展正, 土井健史
2. 発表標題 DNA脱メチル化関連酵素TET1の刺激依存的翻訳後修飾による活性調節
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法のがん関連タンパク質間相互作用解析への応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野ホームページ  <a href="https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku">https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku</a></p>
---

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	樋野 展正  (HINO Nobumasa)  (90469916)	大阪大学・薬学研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山口 卓男  (YAMAGUCHI Takao)  (80596601)	大阪大学・薬学研究科・講師    (14401)	

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