

令和 4 年 7 月 7 日
愛 媛 大 学
株式会社セルフリーサイエンス

ヒトタンパク質間相互作用をゲノムワイドに探索できる新しい技術を開発 —約 20,000 種類のヒトタンパク質から目的タンパク質が作用するタンパク質を明らかに—

このたび、株式会社セルフリーサイエンス 杉山修世 研究員、森下了 研究開発部長および愛媛大学プロテオサイエンスセンター 山田航大 大学院生、澤崎達也 教授らの研究グループは、タンパク質間の相互作用解析を簡便かつ鋭敏に検出できる技術として、約 20,000 種類のヒトタンパク質から目的タンパク質と相互作用するタンパク質を同定する新しい技術の開発に成功しました。

本技術は、セルフリーサイエンス社が開発したタンパク質アレイ技術と愛媛大学が開発した新しい酵素を使用し、CF-PPiD と名付けられました。遺伝子発現に関わる $I\kappa B\alpha$ タンパク質の相互作用解析を行ったところ、既知以外に相互作用する複数のヒトタンパク質を新たに発見し、それらは細胞内で生物学的相互作用を示すことが初めて確認されました。

網羅的な生体分子間相互作用(インタラクトーム)の解析は、近年課題となっている創薬ターゲット枯渇を解決する有用な情報の一つです。特定のタンパク質に対して相互作用するタンパク質を探索する技術の重要性は年々高まっており、本技術の CF-PPiD は約 20,000 種類のヒトタンパク質を使用して相互作用タンパク質を探索できるため、創薬開発、特に分子標的薬開発の研究に有用であると期待されます。

この研究成果に関する論文は、2022 年 6 月 22 日付けで『Scientific Reports』誌に掲載されました。

つきましては、以下のとおり記者説明会を実施いたしますので、ぜひご取材くださいますようお願いいたします。

■開催日時: 令和 4 年 7 月 12 日(火) 13:00~(受付開始:12:30~)

説明会終了後、研究室見学を予定しております。

■開催場所: 愛媛大学学術支援センター応用タンパク質研究支援部門 4 階 会議室

■発表者: 澤崎 達也 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター無細胞生命科学部門 教授)

森下 了 (株式会社セルフリーサイエンス 研究開発部長)

杉山 修世 (株式会社セルフリーサイエンス 研究員)

※取材いただける場合は、別紙 取材申込書を7月11日(月)17:00までにご提出ください。

※送付資料9枚(本紙を含む)

本件に関する問合せ先

愛媛大学プロテオサイエンスセンター

教授 澤崎 達也

TEL:089-927-8530

Mail:sawasaki@ehime-u.ac.jp

令和4年7月7日

愛媛大学
株式会社セルフリーサイエンス

ヒトタンパク質間相互作用をゲノムワイドに探索できる新しい技術を開発

— 約 20,000 種類のヒトタンパク質から目的タンパク質が作用するタンパク質を明らかに —

・概要

株式会社セルフリーサイエンス 杉山 修世 研究員、森下 了 研究開発部長および愛媛大学プロテオサイエンスセンター 山田 航大 大学院生、澤崎 達也 教授らの研究グループは、タンパク質間の相互作用解析を簡便かつ鋭敏に検出できる技術として、約 20,000 種類のヒトタンパク質から目的タンパク質と相互作用するタンパク質を同定する新しい技術の開発に成功しました。本技術は、セルフリーサイエンス社が開発したタンパク質アレイ技術と愛媛大学が開発した新しい酵素を使用し、CF-PPiD と名付けられました。遺伝子発現に関わる $I\kappa B\alpha$ タンパク質の相互作用解析を行ったところ、既知以外に相互作用する複数のヒトタンパク質を新たに発見し、それらは細胞内で生物学的相互作用を示すことが初めて確認されました。論文は、2022年6月22日に『Scientific Reports』誌に掲載されました。

1. 背景

多くのタンパク質は他のタンパク質と複合体を形成し、細胞内で適切に機能しています。そのため、タンパク質間相互作用(PPI)¹⁾の解析は、標的タンパク質の生物学的機能を理解するための重要なプロセスです。特定のヒトタンパク質に対する相互作用タンパク質の探索には、数万に及ぶ高次構造を保持したすべてのヒトタンパク質群を用意することが必要ですが、細胞または組織からすべてのヒトタンパク質を収集することは容易ではありません。そのため、一般的な PPI 解析は、選択されたごく限られた細胞または組織からの数種類の抽出物を使用した限定的なデータに基づいています。したがってゲノムワイドにヒトの全タンパク質を揃えることができ、それらを使用した簡便な PPI 解析技術が開発できれば、幅広い、特に創薬開発に関わる研究者に有用な情報を提供することが出来ます。

2. 研究成果

愛媛大学発バイオベンチャー企業のセルフリーサイエンス社は、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが独自に開発してきたコムギ無細胞タンパク質合成系²⁾を改良し、合成したヒト 20,000 種類タンパク質ライブラリー(ヒトプロテインアレイ)³⁾を 1,536 ウェルの磁気プレート上に構造を保持した状態で固定化できるプロテインビーズアレイ(PBA)⁴⁾を開発しています。この PBA は PPI 解析のために最適なりソースですが、微弱な相互作用の解析には検出感度が不十分でした。そこで本研究グループでは、愛媛大学が開発した近接

するタンパク質のリジン残基をビオチン標識する酵素を利用した近接依存性ビオチン標識(AirID)⁵⁾とPBAを組み合わせて利用することで、ヒトタンパク質間の相互作用を簡便かつ鋭敏に検出できるCF-PPiD (Cell-free Protein array technology for Proximity biotinylation-based PPI identification、図1)の開発に成功しました。

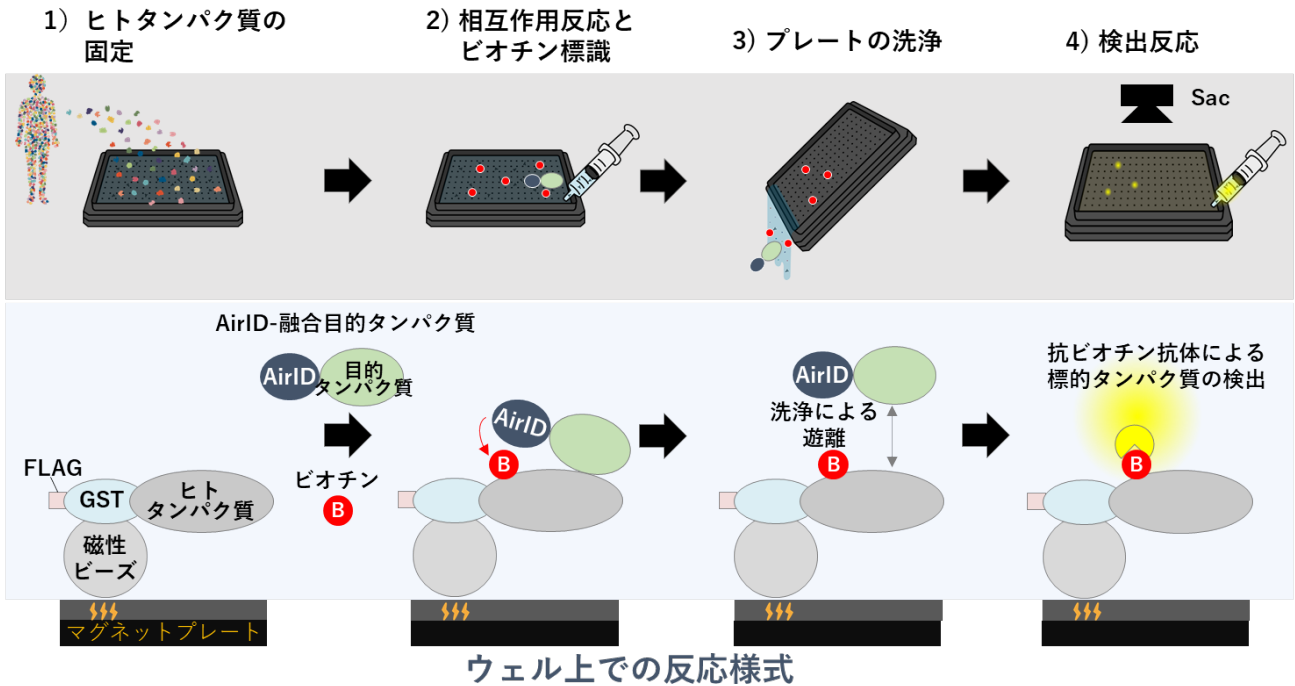


図1. 本研究で開発したCF-PPiD概要

今回開発したCF-PPiDを用いることで、既知のPPI(TP53-MDM2、I κ B α -RelA)の検出(図2a)はもちろん、新たに発見した相互作用タンパク質が細胞内でも相互作用を示したことが確認されました。また化合物依存的なPPIとしてサリドマイド/セレブロン(CRBN)とネオ基質との相互作用(図2b)や、二機能性化合物(PROTACs)を介したPPIもPBA上で特異的に検出可能となりました。

a) タンパク質間相互作用

- 1) TP53 x MDM2
- 2) I κ B α x RelA

b) 化合物依存的なタンパク質間相互作用

- Cereblon-Pomalidomide (低分子化合物)
- x IKZF1 or SALL4

	Mdm2	RelA	Venus
AirID-TP53	● ●		
AirID-I κ B α		● ●	
AirID			

	IKZF1	SALL4	Venus
Pomalidomide	● ●	● ●	
AirID-CRBN			
AirID-CRBN_YW/AA			
AirID			
DMSO			
AirID-CRBN			
AirID-CRBN_YW/AA			
AirID			

図2. CF-PPiDを使用したタンパク質間相互作用検出

- a. タンパク質間相互作用
- b. 化合物依存的なタンパク質間相互作用

これらの結果は、この CF-PPiD システムが、ゲノムワイドな相互作用タンパク質の同定に有用な生化学的スクリーニング手法であることを示唆しています。

3. 波及効果

網羅的な生体分子間相互作用(インタラクトーム)の解析は、近年課題となっている創薬ターゲット枯渇を解決する有用な情報の一つです。最近、多発性骨髄腫の治療薬として使用されているサリドマイド/セレブロンとネオ基質のように、化学物質によって誘導される PPI もタンパク質の制御のための重要な相互作用であることが明らかになりました。このように特定のタンパク質に対して相互作用するタンパク質を探索する技術の重要性は年々高まっています。本技術の CF-PPiD は約 20,000 種類のヒトタンパク質を使用して相互作用タンパク質を探索できるため、創薬開発、特に分子標的薬⁶⁾開発の研究に有用であると期待されます。今後は、タンパク質以外のモダリティ分子⁷⁾(低分子化合物、中分子化合物、核酸、次世代型抗体、細胞等)を使った相互作用解析への応用を検討していく予定です。

4. 研究体制と支援について

本研究は、株式会社セルフリーサイエンス、愛媛大学プロテオサイエンスセンターとの共同研究として行われました。

また、本研究の実施にあたっては、日本医療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(BINDS)「コムギ無細胞系による構造解析に適した複合体タンパク質生産・調製技術と低分子抗体作製技術の創出」、日本学術振興会(JSPS)科学研究費助成事業 新学術領域研究「数理解析に基づく生体シグナル伝達システムの統合的理解」、武田科学振興財団、公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団の支援を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル: CF-PPiD technology based on cell-free protein array and proximity biotinylation enzyme for in vitro direct interactome analysis

(和訳) 無細胞プロテインアレイと近接依存性ビオチン化酵素を用いた CF-PPiD 技術による試験管内直接インタラクトーム解析

著者: Shusei Sugiyama, Kohdai Yamada, Miwako Denda, Satoshi Yamanaka, Satoshi Ozawa, Ryo Morishita & Tatsuya Sawasaki

掲載誌 : Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-022-14872-w

掲載日: 2022 年 6 月 22 日(日本時間)

本件に関する問い合わせ先

担当部署: 愛媛大学プロテオサイエンスセンター

担当者名: 教授 澤崎 達也

TEL: 089-927-8530

Mail: sawasaki@ehime-u.ac.jp

用語説明

1) タンパク質間相互作用(PPI)

タンパク質には単独で機能するものもありますが、多くのタンパク質は他のタンパク質や生体高分子と相互作用することによってその機能を発揮します(例えば、転写因子、構造タンパク質、シグナル伝達に関わるタンパク質など)。そのため、タンパク質間相互作用の情報は、タンパク質の機能を解明するために不可欠です。これまでに酵母ツーハイブリッド法、免疫沈降など、様々な手法が用いられてきており、多くの重要なタンパク質が見つかっています。複数の異なる手法を用いることで、細胞内タンパク質の制御をより深く理解することができるので、常に新たな相互作用解析技術が求められています。

2) コムギ無細胞タンパク質合成系

愛媛大学の遠藤弥重太特別栄養教授らによって開発されたコムギ胚芽抽出液を用いた *in vitro* タンパク質合成システムのこと。タンパク質合成阻害物質を除去したコムギ胚芽抽出液に、アミノ酸などの基質と目的 mRNA を加えるだけで、微生物から高等生物、さらに人工タンパク質に至るまで安定して高効率にタンパク質を合成する技術です。

3) ヒト 20,000 種類タンパク質ライブラリー(ヒトプロテインアレイ)

ヒト全遺伝子の75%以上をタンパク質として人工的に合成したライブラリー。ヒトのタンパク質は細胞や組織で発現している種類や量が大きく異なり、ヒトの全タンパク質を収集して(ゲノムワイド)研究を行うことは不可能でした。

本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系を利用することで、20,000 種類のタンパク質を一定の範囲内の合成量で調製することが出来、抗体が結合する可能性のあるタンパク質をゲノムワイドに研究することが可能となりました。

4) プロテインビーズアレイ(PBA)

上述のヒトプロテインアレイを磁気プレート上の各穴(ウェル)に並べた様式。基本フォーマットは、1,536 種類のタンパク質を1枚の磁気プレート上に固定させている。今回の試験では約 20,000 種類のタンパク質を 27 枚の磁気プレート上に搭載し、1 ウェル内には 1 種類のタンパク質が固定されている。各モダリティ分子と相互作用するタンパク質の探索に利用できると期待されています。

5) 近接依存性ビオチン標識(AirID)

タンパク質間相互作用解析技術の一つ。近接依存性ビオチン標識酵素を融合したタンパク質とビオチンを共存するだけの簡便な反応により、鋭敏な相互作用解析を可能にします。簡便かつマイルドな条件での解析が可能であり、生きた細胞や生物個体を用いた解析も可能なため、大変注目されている。

AirID は従来用いられているビオチン化酵素 BirA を基に、進化工学的手法を用いて愛媛大学で開発された新規酵素です(Kido, et al., eLife 2020)。従来の酵素と比較して高いビオチン化活性を有することが報告されています。

6) 分子標的薬

体内の特定の分子を標的とし、その機能(活性や他分子との相互作用)を抑えることによって、病気を治療する目的で開発された薬剤のこと。この薬剤は標的に対する結合特異性が極めて重要になりますが、ヒト全タンパク質に対する特異性評価技術の実現はこれまで困難でした。本研究の CF-PPiD はこの課題を解決する手段の一つになると考えられています。

7) モダリティ分子

モダリティとは、医薬品の素材や機序・治療手段を総称します。従来、低分子化合物を治療手段とする創薬が大半を占めていましたが、1990 年代以降、抗体医薬を含むタンパク質医薬の創薬が台頭し、さらに近年では、中分子医薬やペプチド医薬、核酸医薬や細胞医薬、再生医療の研究開発も活発化しています。このような治療手段の選択肢の幅が広がることで、相互作用タンパク質探索技術の需要もますます高まると考えられています。

ヒトタンパク質間相互作用をゲノムワイドに探索できる新しい技術を開発

—約 20,000 種類のヒトタンパク質から目的タンパク質が作用するタンパク質を明らかに—

記者説明会 取材申込書

愛媛大学 研究支援部 研究支援課 研究拠点第三チーム 宛

標記記者説明会の取材を申込みます。
参加人数、代表者名は以下のとおりです。

日時:令和4年7月12日(火)13:00~

場所:愛媛大学学術支援センター応用タンパク質研究支援部門 4階 会議室

参加人数()名

研究室見学希望の有無: 有 ・ 無

【代表者連絡先】

会社名・所属: _____

氏名: _____

TEL: _____

E-mail: _____

※新型コロナウイルス感染症対策のため、参加人数及び研究室見学の希望の有無について記載いただき、メールまたは FAX にて下記連絡先までご提出ください。

(取材申し込み受付:7月11日(月)17:00まで)

愛媛大学研究支援部研究支援課研究拠点第三チーム
TEL:089-927-8284 FAX:089-927-8528
Mail:saiboss@stu.ehime-u.ac.jp

城北キャンパス

〒790-8577 松山市文京町3番 TEL 089-927-9000(代)

アイコン凡例

- ▲ 出入口
- P 身体障害者用駐車場
- P 駐車場
- ♿ 転輪場
- ☺ 食堂・カフェ

キャンパス内全面禁煙



J O H O K U
C A M P U S