

Title	光反応によるWD40タグ化人工天然物エキスからの新規分子糊の開発
Sub Title	Development of new molecular glue from WD40 tagged artificial natural product extract by photoreaction
Author	荒井, 緑(Arai, Midori A.)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>分子糊は本来結合しないタンパク質同士を相互作用させる小分子であり、なかでもユビキチンリガーゼが関与する分子糊は疾患の原因タンパク質分解を誘導する。ユビキチンリガーゼ複合体中の基質認識タンパク質であるF-box and WD repeat domain containing 7 (FBW7)は、ユビキチン-プロテアソーム系による様々な腫瘍性タンパク質の分解促進を調節する役割を担う。またFBW7は脳において発現量が高いことから、FBW7による分解を目指す標的としてアルツハイマー病 (AD)の原因となるtauに着目した。本研究ではtauを分解する手法として分子糊に着目した。FBW7とtauの両方に結合することでtauの強制的ユビキチン化に続くプロテアソーム分解を誘導する「分子糊」の探索を目指した。今年度はFBW7を96穴プレートの底に担持したFBW7プレートを作成し、蛍光化Tauを加えて、分子糊活性を評価できる蛍光プレートアッセイの構築を行った。FBW7との結合が報告されているc-MycをFBW7に結合するタンパク質のポジティブコントロールとして蛍光プレートアッセイの構築を試みた。pGEX-6P-3ベクターにFBW7, tau, c-Mycの遺伝子を導入し、GST融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。作製したGST融合プラスミドを用いて大腸菌からタンパク質を発現・精製した。また、GSK3βを用いてリン酸化c-Mycを調整した。96穴プレートの底にFBW7を固定して、精製したc-Mycとtau, リン酸化c-MycをCy5により蛍光化したうえで添加し、それぞれの蛍光量を検討した。FBW7プレートにc-Mycを添加すると、ネガティブコントロールであるtauを添加した場合と比較して蛍光量の増加が認められた。今後はFBW7プレートに蛍光(Cy5)tauと当研究室が保有する放線菌エキスを添加し、FBW7とtauを結合させる(つまり蛍光量を上昇させる)エキスのスクリーニングを進める。</p> <p>Molecular glue is a small molecule that interacts with proteins that do not bind to each other, and among them, molecular glue involving ubiquitin ligase induces the decomposition of the causative protein of the disease. F-box and WD repeat domain containing 7 (FBW7), a substrate recognition protein in the ubiquitin ligase complex, plays a role in regulating the promotion of degradation of various neoplastic proteins by the ubiquitin-proteasome system. Since FBW7 is highly expressed in the brain, we focused on tau, which causes Alzheimer's disease (AD), as a target for degradation by FBW7. In this study, we focused on molecular glue as a method for decomposing tau. We aimed to search for a "molecular glue" that induces proteasome degradation following forced ubiquitination of tau by binding to both FBW7 and tau. This year, we created an FBW7 plate with FBW7 supported on the bottom of a 96-well plate, and added fluorescent Tau to construct a fluorescent plate assay that can evaluate molecular glue activity. We attempted to construct a fluorescence plate assay as a positive control for the protein that binds c-Myc to FBW7, which has been reported to bind to FBW7. The FBW7, tau, and c-Myc genes were introduced into the pGEX-6P-3 vector to prepare a plasmid expressing the GST fusion protein. Proteins were expressed and purified from Escherichia coli using the prepared GST fusion plasmid. In addition, phosphorylated c-Myc was adjusted using GSK3β. FBW7 was fixed to the bottom of the 96-well plate, and purified c-Myc and tau and phosphorylated c-Myc were fluorescentized with Cy5 and then added, and the fluorescence amount of each was examined. When c-Myc was added to the FBW7 plate, an increase in the amount of fluorescence was observed as compared with the case where tau, which is a negative control, was added. In the future, we will add fluorescent (Cy5) tau and actinomycete extract possessed by our laboratory to the FBW7 plate, and proceed with the screening of the extract that binds FBW7 and tau (that is, increases the amount of fluorescence).</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20210002-0036

研究代表者	所属	理工学部	職名	教授	補助額	1,500 千円
	氏名	荒井 緑	氏名 (英語)	Midori A. Arai		
研究課題 (日本語)						
光反応による WD40 タグ化人工天然物エキスからの新規分子糊の開発						
研究課題 (英訳)						
Development of new molecular glue from WD40 tagged artificial natural product extract by photoreaction						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
荒井 緑 (Midori A. Arai)		理工学部・生命情報学科・教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>分子糊は本来結合しないタンパク質同士を相互作用させる小分子であり、なかでもユビキチンリガーゼが関与する分子糊は疾患の原因タンパク質分解を誘導する。ユビキチンリガーゼ複合体中の基質認識タンパク質である F-box and WD repeat domain containing 7 (FBW7)は、ユビキチン-プロテアソーム系による様々な腫瘍性タンパク質の分解促進を調節する役割を担う。また FBW7 は脳において発現量が高いことから、FBW7 による分解を目指す標的としてアルツハイマー病 (AD)の原因となる tau に着目した。本研究では tau を分解する手法として分子糊に着目した。FBW7 と tau の両方に結合することで tau の強制的ユビキチン化に続くプロテアソーム分解を誘導する「分子糊」の探索を目指した。今年度は FBW7 を 96 穴プレートの底に担持した FBW7 プレートを作成し、蛍光化 Tau を加えて、分子糊活性を評価できる蛍光プレートアッセイの構築を行った。FBW7 との結合が報告されている c-Myc を FBW7 に結合するタンパク質のポジティブコントロールとして蛍光プレートアッセイの構築を試みた。pGEX-6P-3 ベクターに FBW7, tau, c-Myc の遺伝子を導入し、GST 融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。作製した GST 融合プラスミドを用いて大腸菌からタンパク質を発現・精製した。また、GSK3β を用いてリン酸化 c-Myc を調整した。96 穴プレートの底に FBW7 を固定して、精製した c-Myc と tau, リン酸化 c-Myc を Cy5 により蛍光化したうえで添加し、それぞれの蛍光量を検討した。FBW7 プレートに c-Myc を添加すると、ネガティブコントロールである tau を添加した場合と比較して蛍光量の増加が認められた。今後は FBW7 プレートに蛍光(Cy5)tau と当研究室が保有する放線菌エキスを添加し、FBW7 と tau を結合させる(つまり蛍光量を上昇させる)エキスのスクリーニングを進める。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Molecular glue is a small molecule that interacts with proteins that do not bind to each other, and among them, molecular glue involving ubiquitin ligase induces the decomposition of the causative protein of the disease. F-box and WD repeat domain containing 7 (FBW7), a substrate recognition protein in the ubiquitin ligase complex, plays a role in regulating the promotion of degradation of various neoplastic proteins by the ubiquitin-proteasome system. Since FBW7 is highly expressed in the brain, we focused on molecular glue as a method for decomposing tau. We aimed to search for a "molecular glue" that induces proteasome degradation following forced ubiquitination of tau by binding to both FBW7 and tau. This year, we created an FBW7 plate with FBW7 supported on the bottom of a 96-well plate, and added fluorescent Tau to construct a fluorescent plate assay that can evaluate molecular glue activity. We attempted to construct a fluorescence plate assay as a positive control for the protein that binds c-Myc to FBW7, which has been reported to bind to FBW7. The FBW7, tau, and c-Myc genes were introduced into the pGEX-6P-3 vector to prepare a plasmid expressing the GST fusion protein. Proteins were expressed and purified from Escherichia coli using the prepared GST fusion plasmid. In addition, phosphorylated c-Myc was adjusted using GSK3β. FBW7 was fixed to the bottom of the 96-well plate, and purified c-Myc and tau and phosphorylated c-Myc were fluorescentized with Cy5 and then added, and the fluorescence amount of each was examined. When c-Myc was added to the FBW7 plate, an increase in the amount of fluorescence was observed as compared with the case where tau, which is a negative control, was added. In the future, we will add fluorescent (Cy5) tau and actinomycete extract possessed by our laboratory to the FBW7 plate, and proceed with the screening of the extract that binds FBW7 and tau (that is, increases the amount of fluorescence).</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			