

Title	基礎研究と創薬研究を加速させる自由自在にタンパク質を分解に導く革新的手法の開発
Sub Title	A novel method of the protein degradation that contributes to clinical research and basic science
Author	前川, 大志(Maekawa, Masashi)
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 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>疾患関連タンパク質を強制的に分解に導く「プロテインノックダウン」が臨床応用と基礎研究の両側面から注目されている。現行のプロテインノックダウンでは、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とを近接させることで、標的タンパク質を強制的にユビキチン化し、プロテアソーム依存的に分解させる。即ち、ユビキチンリガーゼおよび、標的タンパク質に対して、高い特異性と親和性を有するリガンドを取得することが重要である。しかし、プロテインノックダウンに利用されて、成功しているリガンドは未だに限定的であり、そのレパートリーを拡充する必要がある。</p> <p>そこで本研究は、リガンドとして特異性と親和性が高く担保されるDNAアプタマーを採用し、新しいプロテインノックダウン法を開発することを目的とした。本研究では、ユビキチンリガーゼとしてcullin-3型ユビキチンリガーゼの基質認識受容体であるSPOPを、標的基質タンパク質としてノッチシグナルの転写因子であるCBF1を採用した。研究代表者らはすでにSPOPとCBF1に結合するアプタマーをそれぞれ6種、15種、取得している。そこでまず、それぞれのアプタマーの配列の最小化を行った。上記のアプタマーはプライマー配列が両端に20 mer、ランダム配列が中央に30 mer存在している。プライマー配列の除去などの検討を行った結果、ランダム配列のみでもSPOPと高い結合能を有するSPOPアプタマーを2種類、ランダム配列と一部のプライマー配列でCBF1と結合できるCBF1アプタマーを1種類、最適化することに成功した。次に、両者のアプタマーを繋げたアプタマーを合成した。当該アプタマーは、SPOPまたは、CBF1と結合能は維持していたものの、片方のタンパク質が結合すると立体障害により、もう一方のタンパク質が結合できなくなることが分かった。今後は、SPOPアプタマーに分解タグを付加する形で、SPOPを分解に導くシステムの開発を計画している。</p> <p>Protein-knockdown is a method of the enforced degradation of disease-related proteins. The principle of the method is ubiquitination of target protein by a ubiquitin ligase through the enforced proximal positioning each other followed by the proteasomal degradation of target proteins. To this end, ligands which bind to a target protein or a ubiquitin ligase specifically and strongly are essential. However, the ligands currently used in protein-knockdown is still limited. In this study, we challenged to establish a novel protein-knockdown by making use of DNA aptamers because aptamers can be selected for all the proteins according to their selection method called as SELEX. We used DNA aptamers for SPOP, a substrate recognition receptor for a cullin-3 ubiquitin ligase complex and CBF1, a transcription factor for Notch signaling. We have already developed 6 of SPOP aptamers and 15 of CBF1 aptamers. The aptamers possess primer sequences (20 mer each) at 5' and 3' and random sequence (30 mer) at central. We examined various types of sequence to minimize the aptamers. As a result, we succeeded to developed the minimized aptamers for both SPOP and CBF1. We then conjugated both aptamers and examined the interaction with SPOP and CBF1. The conjugated aptamers interacted SPOP or CBF1, however, the aptamers did not form a complex with SPOP and CBF1 because of the steric barrier. We are planning to conjugate the degradation tags to SPOP aptamers to degrade SPOP directly.</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=KO12003001-20220003-0029

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	1,500 千円
	氏名	前川 大志	氏名 (英語)	Masashi Maekawa		
研究課題 (日本語)						
基礎研究と創薬研究を加速させる自由自在にタンパク質を分解に導く革新的手法の開発						
研究課題 (英訳)						
A novel method of the protein degradation that contributes to clinical research and basic science						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
前川大志 (Masashi Maekawa)		薬学部・専任講師				
1. 研究成果実績の概要						
<p>疾患関連タンパク質を強制的に分解に導く「プロテインノックダウン」が臨床応用と基礎研究の両側面から注目されている。現行のプロテインノックダウンでは、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とを近接させることで、標的タンパク質を強制的にユビキチン化し、プロテアソーム依存的に分解させる。即ち、ユビキチンリガーゼおよび、標的タンパク質に対して、高い特異性と親和性を有するリガンドを取得することが重要である。しかし、プロテインノックダウンに利用されて、成功しているリガンドは未だに限定的であり、そのレパートリーを拡充する必要がある。</p> <p>そこで本研究は、リガンドとして特異性と親和性が高く担保される DNA アプタマーを採用し、新しいプロテインノックダウン法を開発することを目的とした。本研究では、ユビキチンリガーゼとして cullin-3 型ユビキチンリガーゼの基質認識受容体である SPOP を、標的基質タンパク質としてノッチシグナルの転写因子である CBF1 を採用した。研究代表者らはすでに SPOP と CBF1 に結合するアプタマーをそれぞれ 6 種、15 種、取得している。そこでまず、それぞれのアプタマーの配列の最小化を行った。上記のアプタマーはプライマー配列が両端に 20 mer、ランダム配列が中央に 30 mer 存在している。プライマー配列の除去などの検討を行った結果、ランダム配列のみでも SPOP と高い結合能を有する SPOP アプタマーを 2 種類、ランダム配列と一部のプライマー配列で CBF1 と結合できる CBF1 アプタマーを 1 種類、最適化することに成功した。次に、両者のアプタマーを繋げたアプタマーを合成した。当該アプタマーは、SPOP または、CBF1 と結合能は維持していたものの、片方のタンパク質が結合すると立体障害により、もう一方のタンパク質が結合できなくなることが分かった。今後は、SPOP アプタマーに分解タグを付加する形で、SPOP を分解に導くシステムの開発を計画している。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Protein-knockdown is a method of the enforced degradation of disease-related proteins. The principle of the method is ubiquitination of target protein by a ubiquitin ligase through the enforced proximal positioning each other followed by the proteasomal degradation of target proteins. To this end, ligands which bind to a target protein or a ubiquitin ligase specifically and strongly are essential. However, the ligands currently used in protein-knockdown is still limited. In this study, we challenged to establish a novel protein-knockdown by making use of DNA aptamers because aptamers can be selected for all the proteins according to their selection method called as SELEX.</p> <p>We used DNA aptamers for SPOP, a substrate recognition receptor for a cullin-3 ubiquitin ligase complex and CBF1, a transcription factor for Notch signaling. We have already developed 6 of SPOP aptamers and 15 of CBF1 aptamers. The aptamers possess primer sequences (20 mer each) at 5' and 3' and random sequence (30 mer) at central. We examined various types of sequence to minimize the aptamers. As a result, we succeeded to developed the minimized aptamers for both SPOP and CBF1. We then conjugated both aptamers and examined the interaction with SPOP and CBF1. The conjugated aptamers interacted SPOP or CBF1, however, the aptamers did not form a complex with SPOP and CBF1 because of the steric barrier. We are planning to conjugate the degradation tags to SPOP aptamers to degrade SPOP directly.</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)			