

別紙 4

報告番 -	※ 乙 第 号
----------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 蛍光タンパク質の特徴を活用したタンパク質間相互作用調整剤評価系の開発
氏 名 渡部 拓

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction; PPI) は、すべての細胞プロセスにおいて重要な役割を果たし、生命現象の重要な分子機構としてのみならず、新薬の標的群としても注目されている。既存の PPI 調整剤開発手法が有する課題を解消する事を目的とし、本研究では、蛍光タンパク質を用いた新規アッセイ法の開発を行った。

第一に、単量体型である monomeric Kusabira Green (mKG)による Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)を利用し、操作が簡便であり、ハイスループットなインビトロアッセイ系を構築した。本系を用いて、がん細胞の増殖を促進する transcription factor 7 (TCF7)と β -catenin の相互作用阻害剤および、がん細胞で活性が高いプロテアソームの複合体形成に必須である Proteasome assembling chaperone 1 (PAC1) と Proteasome assembling chaperone 2 (PAC2)の相互作用阻害剤、Proteasome assembling chaperone 3 (PAC3)のホモ二量体化阻害剤を取得する為に、天然物由来の 123,599 サンプルから構成されるライブラリーをスクリーニングし、PPI 阻害剤を同定する事で、本系の有用性を実証した。

第二に、細胞内で PPI を可視化する新規技術を開発した。従来の蛍光タンパク質(FP)を利用した系は、ダイナミックレンジおよび定量的再現性に限界があり、また、インビトロアッセイ系では細胞膜透過性を有する PPI 阻害化合物を同定することが困難な為、本研究を実施した。開発した技術は、タンパク質の多価性を利用した相転移により、PPI 依存的に液相液滴を形成させることで、コントラスト、感度、反応速度、可逆性、系の構築の簡便性、及び汎用性について、総合的に他の PPI 検出手法よりも優れた系となり、Fluorescent PPI visualization (Fluoppi)と名付けた。Fluoppi を用いることで、抗がん剤の標的 PPI としてよく知られているが、これまでセルベースアッセイ系の無かった X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)と second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) の PPI を可視化し、特異的 PPI 阻害薬の効果を検証した。また、Fluoppi を応用展開し、光変換 FP を用いた生細胞内 PPI キネティクス解析(photoconvertible Fluppi; pcFluoppi)や、ホモ二量体検出法

(homoFluoppi)を開発した。後者により、細胞増殖や細胞分化等、複数のシグナル伝達系に参与し、mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーに属する Extracellular signal regulated kinase 2(ERK2)のホモ二量体形成の動態を生細胞内で明らかにした。

本研究により開発されたインビトロアッセイ系およびセルベースアッセイ系により、今後 PPI 研究ならびに PPI 調整剤の探索・開発が加速されることが期待される。