

様式3

2019 年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

2020 年 3 月 5 日

国立大学法人愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関 : 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

部局・職名 : 腎・免疫・内分泌代謝内科学 助教

氏名 : 松本 佳則

1. 研究課題

難治性希少疾患の新規治療薬の探索

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 松本 佳則	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学	助教	In vitro の機序の解明
研究分担者 今井 祐記	愛媛大学プロテオサイエンスセンター 病態生理解析部門	教授	In vivo での薬剤評価
竹田 浩之	愛媛大学プロテオサイエンスセンター プロテオ創薬科学部門	准教授	新規薬剤の探索

3. 研究成果

別紙のとおり

## 1. 研究背景

“3BP2”はチロシンキナーゼを活性化するアダプタータンパクで、2001年に3BP2のミスセンス変異が、顔面骨の炎症性骨破壊、歯牙の脱落を特徴とする希少遺伝性骨疾患“チェルビズム”の原因であることが報告された。我々は3BP2がpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)メンバーである“Tankyrase”に結合してADPリボシル化された部位に、E3-ubiquitin ligaseのRNF146が結合し、3BP2をユビキチン化、分解する経路を発見した。更にチェルビズム変異3BP2はTankyraseに結合出来ず、その結果生じた3BP2の代謝障害で蓄積した3BP2が破骨細胞を異常活性化し、骨破壊をきたすチェルビズムの発症機序を解明した。

## 2. 研究目的

本研究では、AlphaScreenを用いて、3BP2の結合蛋白を明らかにし、生体内における3BP2機能の更なる詳細を明らかにする。

## 3. 研究成果

### (3BP2相互作用のin vitro再構成)

チロシンキナーゼシグナルのアダプタータンパク質である3BP2を標的とした創薬のため、無細胞合成タンパク質とAlphaScreenを用いた薬剤探索ハイスループットアッセイ系の構築を試みた。N末にblsタグを融合した3BP2タンパク質をコムギ無細胞系を用いてビオチン化合成した。また、3BP2と相互作用することが知られているプロテインキナーゼSRCとSYKをプロテオサイエンスセンターが整備するプロテインキナーゼフォーカスアレイからピックアップし、無細胞合成した。調製したタンパク質を用いて、AlphaScreenによる相互作用解析を実施したところ、図1のように既知パートナーであるSRCおよびSYKとの結合が確認された。結合シグナルおよびS/B比は十分に高かった。このことから、合成した3BP2はアダプター活性を保持しており、プロテインキナーゼと相互作用を起こすことがin vitroでも明らかとなった。

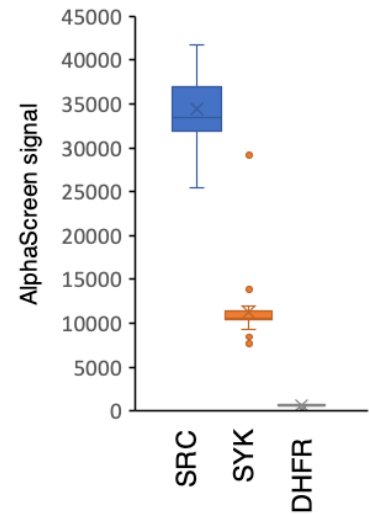


図1 3BP2と既知キナーゼパートナーとの相互作用

### (3BP2相互作用パートナー探索)

3BP2の相互作用パートナーとしてSRCとSYKが報告されているが、3BP2は他のプロテインキナーゼや別ファミリーの因子とも相互作用し、各種のシグナル伝達に関与している可能性がある。3BP2の機能をより詳細に解明するため、プロテインキナーゼ470種を含む4000種のヒトタンパク質を搭載したプロテインアレイとの相互作用解析を実施した。無細胞合成したビオチン化3BP2をベイトタンパク質とし、プロテインアレイとn=1総当たりで混合し、相互作用をAlphaScreenで検出した。その結果、既知キナーゼパートナー以外にも多数のタンパク質と結合していることが明らかになった。結果の検証のため、結合シグナル上位のタンパク質について再合成し、Western blottingにより全てのタンパク質の合成を確認した。今後、再合成した相互作用パートナー候補タンパク質を用いたAlphaScreenの検証を実施し、細胞を用いた試験により新規パートナーと3BP2の相互作用の機能を明らかにする。

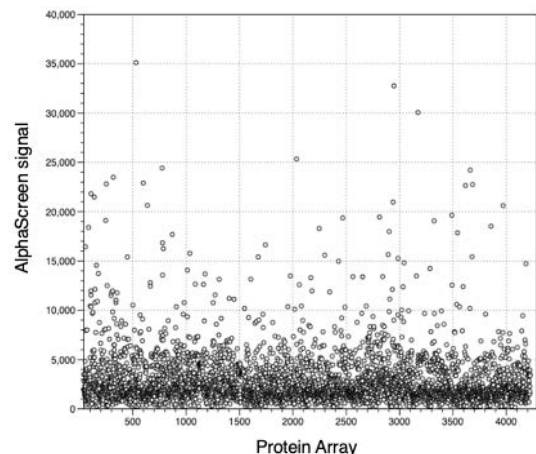


図2 3BP2と4000種プロテインアレイの相互作用