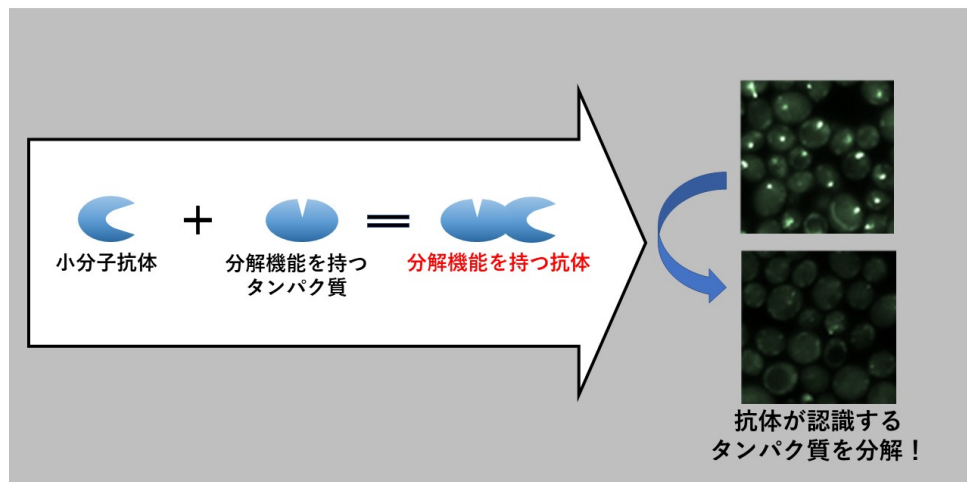


抗体を使ってタンパク質を分解！



抗体を使って細胞内のタンパク質を操る！ ～機能的な小分子抗体による標的タンパク質分解系～

【本研究のポイント】

- ・オーキシンドグロン(AID)法^{注1)}と小分子抗体(2ページ目参照)を組み合わせることで、小分子抗体が認識するタンパク質の分解誘導に成功。
- ・細胞質や核、そして、細胞膜といった様々な場所で働くタンパク質を、それらの機能を抑制するレベルまで減少させることが出来た。
- ・今後は、このような機能的な小分子抗体を利用した創薬への応用が期待される。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科の小川 佳孝 博士 後期課程学生、西村 浩平 講師、小原 圭介 講師、嘉村 巧 教授らの研究グループは、小さな抗体分子を細胞内に導入することで、その抗体が結合したタンパク質の分解を誘導する方法の開発に成功しました。

オーキシンドグロン(AID)法は、細胞内の標的とするタンパク質を植物ホルモンであるオーキシン^{注2)}を使い、分解する方法です。これまで、分解標的となるタンパク質にはAID-tag という目印を付加する必要がありました。本研究では、人工的に生み出された小さな抗体分子(小分子抗体)に注目し、この小分子抗体の一種である Nanobody^{注3)}と AID 法を組み合わせることで、抗体に認識させた標的タンパク質の分解を誘導できることを発見しました。この方法では、細胞質や核、そして細胞内膜といった、細胞内の様々な場所で働くタンパク質を標的とすることができ、分解することによって、それらタンパク質の働きを失わせることが可能であることを示しました。本研究では、真核生物のモデル生物として出芽酵母の細胞を用いていますが、原理的にはマウスやヒトを含めた様々な哺乳動物にも応用することが可能であると考えられます。

本研究の開発方法により、細胞内の様々なタンパク質を抗体によって認識させ、分解制御することが可能となります。本技術により、疾患の原因となる、細胞内悪性タンパク質の働きを抑制することで、新たな治療法へとつながると期待できます。

本研究成果は、2023年6月14日付アメリカ科学雑誌「PLOS Genetics」に掲載されました。

【研究背景と内容】

抗体分子は生体内において、ウィルスや菌のような外敵への免疫応答の一環として、外敵のタンパク質を識別して結合する役割を担っています。抗体によるタンパク質への識別や結合は、非常に高い精度で行われるため、抗体分子は創薬やバイオツールとしても重用されています。しかし、一般的な抗体(IgG)は、分子量が 150kDa 以上と大型な分子であり、二本の軽鎖・重鎖からなる計 4 つのタンパク質からなる複合体であることから、改変や大量生産が難しいのが現状です。近年、Nanobody をはじめとする分子量 15kDa 前後の小型抗体がぞくぞくと開発され、次世代バイオツールや抗体医薬の創薬ターゲットとして強い注目が集まっています

本研究では、人工オーキシンを利用した細胞内タンパク質分解系(ssAID 法^{注4)})と小分子抗体を組み合わせることで、小分子抗体が認識した標的タンパク質を分解することに成功しました。この系では、非常に微量なオーキシンを誘導剤として使用することで、細胞質や核、そして、細胞内膜といった、細胞内の様々な場所で機能するタンパク質を、それらの機能を抑制するレベルまで分解することができます。

小分子抗体は、通常の抗体に比べ約 10 分の1(約 15kDa)の大きさしかない小型の抗体分子で、細胞内でも安定的に機能することが明らかになっています。あたらしい AID 法では、標的タンパク質の分解に必要な分解標識と小分子抗体を融合することで、小分子抗体が認識する標的タンパク質を分解します(図 1)。実際に、細胞質や核、オルガネラ膜^{注5)}に存在する標的タンパク質の分解実験を行ったところ、標的タンパク質は人工オーキシンの添加依存的に分解されました(図2)。

図1. 小分子抗体を利用したオーキシンデグロン法

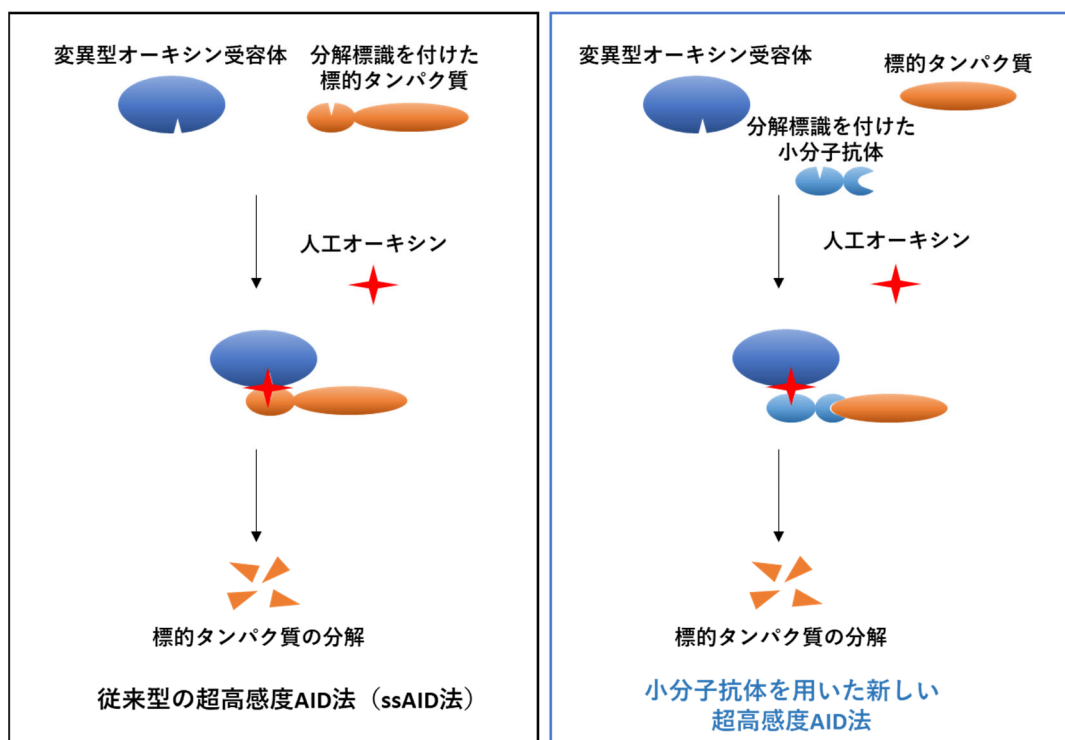
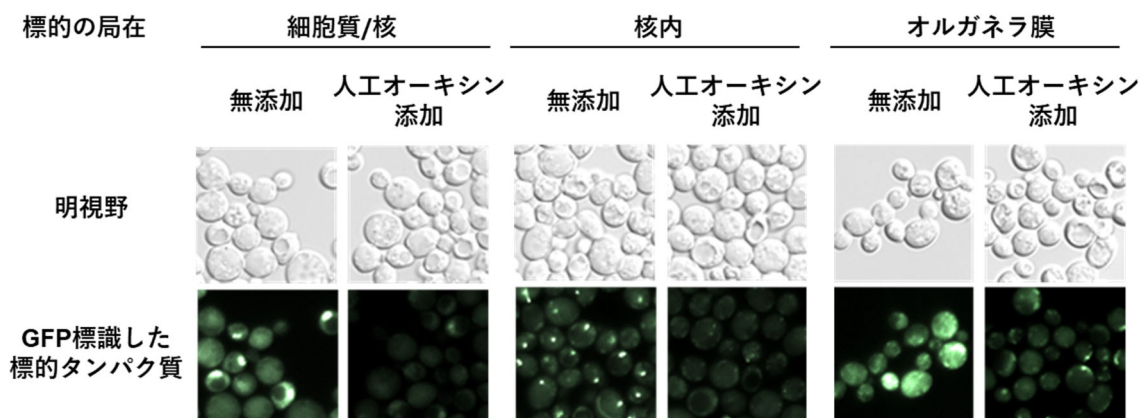
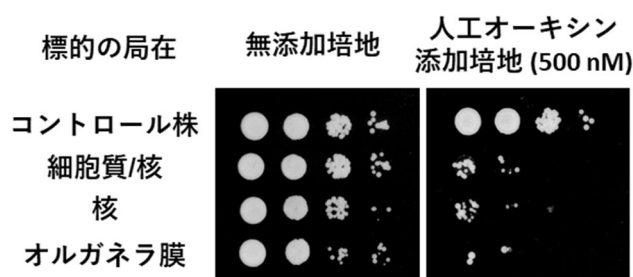


図2. GFPを用いたタンパク質分解実験



標的タンパク質の分解によって、それらの機能を抑制するレベルまでタンパク質が減少するかを検証する為に、生存に必須なタンパク質を標的とした分解株を作製し、人工オーキシシン含有培地での生育を確認しました。その結果、さまざまな局在を持つ標的タンパク質をターゲットとした分解株の生育が、500 nM の人工オーキシシン含有培地で低下していることが明らかになりました(図3)。

図3. 生育阻害実験



分解株の増殖が、500 nMの人工オーキシシン添加培地で阻害されている。

【成果の意義】

本研究の開発方法では、人工オーキシシンを利用した細胞内タンパク質分解と小分子抗体を組み合わせることで、小分子抗体が認識した標的タンパク質を分解することに成功しました。これにより、小分子抗体に機能を持たせることで、小分子抗体が認識する標的タンパク質を操作することが可能であることが明らかになりました。今後はヒト細胞を含めた様々な真核生物への応用や、機能を持つ小分子抗体を利用した創薬への応用が期待されます。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成事業(19K06611, 20K21423, 20H03208, 22K05558, 22K06141)、公益財団法人加藤記念バイオサイエンス振興財団・バイオテクノロジー分野研究助成金、公益財団法人発酵研究所・研究助成金などの支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注 1)オーキシンドグロン(AID)法:

植物におけるオーキシンの依存性タンパク質分解系を植物以外の生物種に導入し、オーキシンの作用を標的とするタンパク質を分解する方法。

注 2)オーキシン:

最初に見つかった植物ホルモンで、植物の生長や発達など様々な機能をもつ。

注 3)Nanobody:

ラマやアルパカなどの抗体から構築する小分子抗体の一つ。

注 4)ssAID 法(超高感度 AID 法):

変異型オーキシン受容体と人工オーキシンのペアを用いることで、必要オーキシン濃度を 1/1000 まで低下させたオーキシンドグロン法の改良型。

注 5)オルガネラ膜:

細胞内に存在する細胞小器官を細胞質と区切る脂質二重膜。

【論文情報】

雑誌名:PLOS Genetics(米国時間6月 14 日)

論文タイトル:Development of AlissAID system targeting GFP or mCherry fusion protein

著者:小川佳孝¹ 西村浩平¹ 小原圭介¹ 嘉村巧¹

¹名古屋大学大学院理学研究科 理学専攻

DOI: 10.1371/journal.pgen.1010731

URL: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1010731>