

Gy recruitment systemによるSH2 superbinderの親和性向上スクリーニング

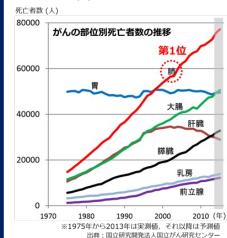
○千京律斗¹、浅間梨々花^{1,2}、福田展雄^{1,3}、石井純^{1,2}
¹神戸大学・科学技術イノベーション研究科、²先端バイオ工学研究センター
³産業技術総合研究所・生命工学領域・モレキュラーバイオシステム研究部門



Introduction

◆ 創薬ターゲット：EGFR（タンパク質）

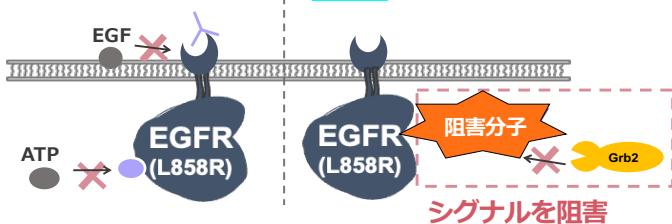
- 日本人の死因1位は癌（約30%）→肺癌（肺腺癌）の死亡者数が最も多い。
- 肺腺癌の50%以上がEGFRの遺伝子変異由来となっている。



This study

◆ 既存の医薬品との違い

既存の医薬品



本研究

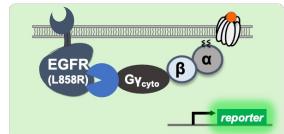
既存のEGFR阻害薬の課題：長期間の使用による薬剤耐性化、副作用の表化

→既存の阻害薬とは異なる作用機序でEGFRに作用するタンパク質医薬品の開発が必要

GyとSuperBinderを融合タンパク質として発現
EGFRとSuperBinderが結合した時にシグナルが流れるシステムを利用した。

Gy recruitment system

融合タンパク質がEGFRと結合した場合



Gyが膜に局在化している状態
→シグナル伝達が行われる

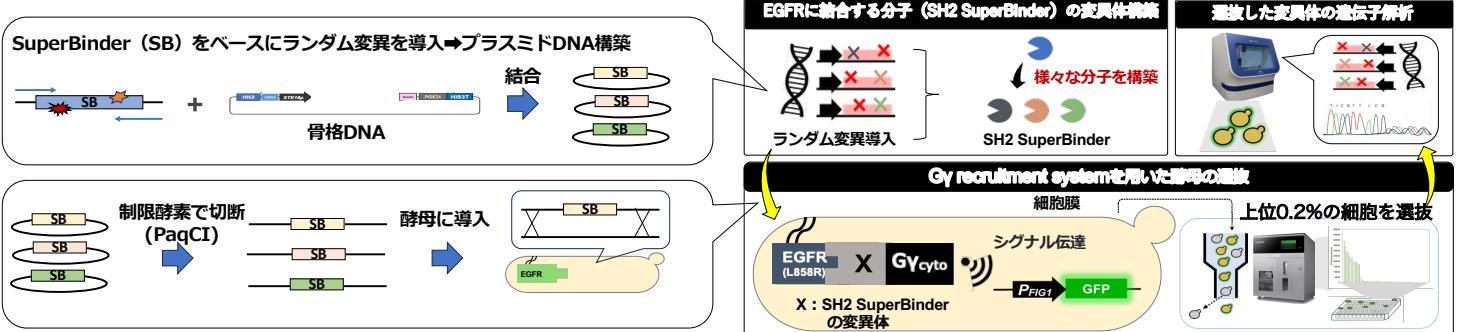
融合タンパク質がEGFRと結合していない場合



Gyが膜に局在化していない状態
→シグナル伝達が行われない

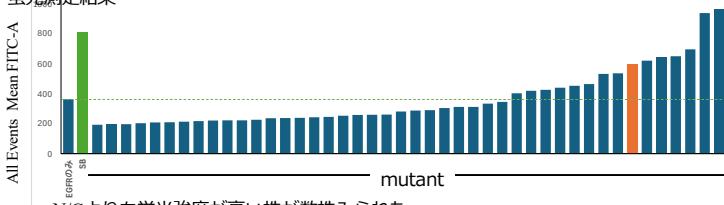
Gy recruitment systemを活用して、EGFRにより強く結合する阻害分子を SH2 SuperBinderのライブラリから探索・選抜を行う。

Method



Result

蛍光測定結果



N/Cよりも蛍光強度が高い株が数株みられた。

→上位8株について塩基配列を解析した結果、8株中1株に有効な変異がみられた。

変異解析結果

- DNA配列を解析した結果、SuperBinderのK58R変異を特定することができた。
→ K58R変異は既存の変異と比較的近傍に位置した。



- EGFRを発現しない酵母株に得られた変異配列を導入し、偽陽性の検証を行う。
→また、さらなる改変を加えることで、より有望な変異体の取得を試みる。

Summary & Future Plan

superbinder-Gycytoの融合タンパク質を導入した阻害分子選抜系の構築株の構築アプローチ

- Error Prone PCRを用いた進化工学実験を実施して、結合親和性の高い阻害分子を獲得した。
- 今後は、EGFRを発現する酵母株と発現しない酵母株を用いて、K58R変異の効果を評価する。
- 本研究で得られた有効な変異をベースとして、再度進化工学を活用する予定である。



→本研究で得られた変異体を起点とすることで新規薬剤候補分子の探索が期待される。

Reference

- Asama et al., Screening of protein-based inhibitors for the intracellular domain of epidermal growth factor receptor by directed evolution using the yeast Gy recruitment system, Available online 9 August 2024.
- Kaneko et al., Superbinder SH2 Domains Act as Antagonists of Cell Signaling. *Sci Signal.* 2012 Sep 25;5(243):ra68.
- Kükenshöner et al., Selective targeting of SH2 domain-phosphotyrosine interactions of Src family tyrosine kinases with monobodies. *J Mol Biol.* 2017;429(9):1364-1380.