

酵母を用いた G γ recruitment system による SH2 superbinder の親和性向上スクリーニング

SATテクノロジー・ショーケース2026

■ はじめに

多くのタンパク質は他のタンパク質との相互作用によって機能を発揮しており、タンパク質間相互作用 (PPI) は細胞の様々な機能調節に重要な役割を担っている。たとえば、上皮成長因子受容体 (EGFR) とそのアダプタータンパク質である成長因子受容体結合タンパク質2 (Grb2) の間の PPI は細胞増殖を制御しており、この PPI に異常が起こると、癌化が引き起こされる。このような疾患に関与する異常な PPI を正常に調節できるタンパク質はバイオ医薬品の候補として期待されている。このバイオ医薬品開発における重要な課題は、疾患に関与する標的タンパク質に対して強い結合力を有する新規タンパク質を生み出すことである。

タンパク質間相互作用 (PPI) の検出方法の一つとして、酵母の G タンパク質シグナル伝達経路を応用した G γ recruitment system が報告されている。本システムでは、脂質付加配列を欠損させた改変型 G γ (G γ cyto) を利用する。G γ cyto は細胞質に存在するが、そのままでは細胞膜に局在できずシグナルを伝達できない。そこで、標的タンパク質「X」を細胞膜内腔上 (細胞質側) に局在させ、G γ cyto にライブラリタンパク質「Y」を融合した「G γ cyto-Y」を細胞質中で発現させる。X と Y が相互作用した場合のみ G γ cyto が膜にリクルートされ、シグナルが伝達されて下流で緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現する。さらに、競合タンパク質「Y'」を共発現させることで、X-Y 相互作用が X-Y' より強い場合にのみシグナル伝達を引き起こされる。この仕組みにより、標的タンパク質 X に対して高親和性・高特異性をもつ変異体 Y を選択的に取得できる。本研究ではこのシステムを利用し、Grb2 を小型化した SH2 ドメインに3つの有効変異を導入した高親和性 SH2 superbinder (SH2-SB) を鋳型としたライブラリを構築し、上皮成長因子受容体 (EGFR) に対して特定のリン酸化型チロシン (pY) 残基選択性を持ち、さらに高親和性を示す変異体の取得を目指した。

■ 活動内容

1. SH2 superbinder-G γ cyto タンパク質発現株の構築

Double Crossover 法では、pUSH2 SuperBinder-G γ cyto-*HIS3t* を鋳型として PCR 増幅したフラグメント (*HIS3-URA3* maker-SH2 superbinder-G γ cyto-*HIS3t*) を作製した。酢酸リチウム法を用いて、このフラグメントを恒常活性型 EGFR^{L834R} 変異体の細胞質内ドメイン (cytoEGFR^{L834R}) を導入した酵母株 (BYFUZA-E 株) の *HIS3* 領域にゲノム組込みした SH2 SuperBinder-G γ cyto 株を構築した。

2. cytoEGFR^{L834R} に対する SH2 superbinder の結合確認

上記1で構築した BYFUZA-E-SH2 SuperBinder-G γ cyto 株を用いて、cytoEGFR^{L834R} と SH2 superbinder-G γ cyto の結合能を GFP の蛍光強度を指標として評価した。この際、野生型の SH2 domain-G γ cyto 導入株についても同様の条件で測定を行い、GFP の蛍光強度を比較した。

3. 結果及び考察

蛍光強度の評価により、SH2 superbinder 導入株では、野生型の SH2 domain 導入株と比較して、GFP の蛍光強度が約2.6倍高いことが確認できた (図1)。この結果により、3つの有効変異を持つ SH2 superbinder と G γ cyto の融合タンパク質が酵母内で機能的に発現し、野生型 SH2 よりも EGFR^{L834R} に対する高い結合を示すことが確認された。これら3つの変異は、いずれも疎水性の増強や電荷干渉の除去といった、結合界面の物理化学的性質を最適化するような効果を持つことが共通点として挙げられる。一方で、Grb2 を小型化した野生型 SH2 domain では GFP 蛍光強度が低かった。これは、本来 SH2 domain が2つの SH3 domain に挟まれた構造を持つ Grb2 が、SH2 domain のみで発現することで構造が不安定となるためと推察される。今後は SH2 domain を構造安定的に発現させる領域を特定し、Grb2 小型化分子として有効に機能する SH2 superbinder のライブラリを構築し、スクリーニングによる変異体取得を行う予定である。

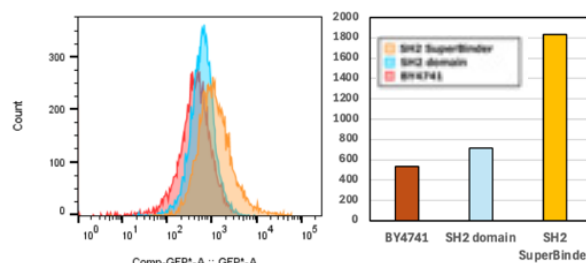


図1 Comparison of GFP fluorescence intensities.

■ 関連情報等(特許関係、施設)

本研究は産業技術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と共同で行われたものである。

参考文献

1) X. Ran and J. E. Gestwicki.: Inhibitors of protein-protein interactions (PPIs): an analysis of scaffold choices and buried surface area, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 44, 75-86 (2018).

代表発表者 千京 律斗(せんきょう りつと)

所 属 神戸大学

科学技術イノベーション研究科

問合せ先 〒657-0815 兵庫県神戸市灘区薬師通 1-4-11

TEL: 080-3749-0355

242p011p@stu.kobe-u.ac.jp

■キーワード: (1) *Saccharomyces cerevisiae*
(2) EGFR (上皮成長因子受容体)
(3) G γ recruitment system

■共同研究者: 福田 展雄 (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)