構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
澤崎　達也（愛媛大学プロテオサイエンスセンター・教授）

高度化における研究背景・目的

生命現象の理解や創薬研究を進める上で、タンパク質複合体の構造・機能解析と、受容体や薬剤標的など未知の相互作用分子を同定する技術は極めて重要である。機能未知のリガンドやオーファン受容体、作用機序が不明な薬剤については、標的分子を簡便かつ高感度に同定する汎用技術が十分に確立されていない。そこで本高度化研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系の共発現能力と、独自に開発した近位依存性ビオチン標識酵素AirIDの特性を活用し、クライオEM解析に適した複合体試料調製技術と、抗原・受容体・薬剤標的の同定・動態解析技術の高度化を進める。一方、複合体タンパク質は発現量や安定性の制御が難しく、クライオEM解析に適した高品質な試料調製が研究上の大きな課題となっている。

（１）AirIDを基盤とした抗原分子・受容体・薬剤の同定・動態解析の高度化
我々が独自に開発した世界で最も相互作用解析に適した近位依存性ビオチン標識酵素AirIDを抗体やペプチド、薬剤と融合することにより、標的タンパク質の同定や解析を可能とする技術の開発を試みる。

（２）クライオEM解析に適した複合体試料の無細胞合成技術の高度化
我々が世界に先駆け開発したコムギ無細胞タンパク質合成系を基盤に、アフィニティ抗体タグ、ビオチンバインダーを用いて、汎用的に複合体の生産・精製・安定化ができ、クライオEM解析に最適化した複合体試料調製技術の開発を試みる。

高度化の成果

（１）AirIDを基盤とした抗原分子・受容体・薬剤の同定・動態解析の高度化

AirIDによるMolecular GlueおよびPROTACの薬剤依存的標的・オフターゲット探索技術

AirIDを用いた薬剤依存的インタラクトーム解析により、molecular glueやPROTACによってE3リガーゼへ動員される標的タンパク質を網羅的に同定する技術を確立した。さらに新規neo-substrateとしてZMYM2を発見し、疾患関連融合タンパク質ZMYM2-FGFR1の薬剤誘導分解にも成功した（**図３**, Nat Commun. 2022）。

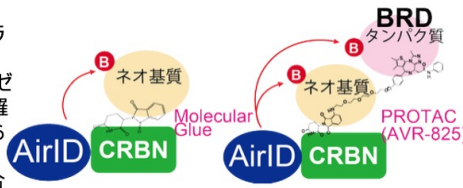


図３　AirIDを用いた薬剤依存的相互作用タンパク質同定技術の原理

FabIDによる膜タンパク質の薬剤応答性細胞外インタラクトーム解析技術

AirIDを抗体Fabに融合したFabIDを開発し、遺伝子改変せずに生細胞上の内在性膜タンパク質の細胞外インタラクトームを網羅的に解析する技術を確立した。EGFRをモデルに、EGFやgefitinibにより相互作用ネットワークが動的に変化することを明らかにし、薬剤作用をインタラクトーム変化として評価することに成功した（**図４**, Nat Commun. 2023）。

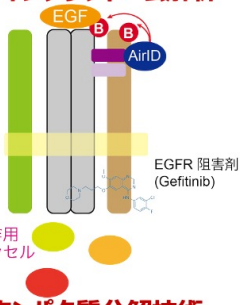


図４　リガンドや阻害剤投与により変化する細胞外領域でEGFRと相互作用するタンパク質

6位修飾による安全性を高めたMolecular Glue・PROTAC設計

レナリドミドの6位を化学修飾することで、抗腫瘍効果に必要なneo-substrateの分解を維持・増強しつつ、催奇形性に関与するSALL4等の分解を抑制できることを示した。さらに本設計原理をPROTACにも応用し、薬効と安全性を両立する新たなTPD分子設計指針の確立に成功した（**図５**, Nat Commun. 2023）。



図５　様々な疾患に利用可能な汎用型サリドマイド誘導体

S4Dによる細胞種・時期特異的なマウス個体内タンパク質分解技術

ヒトCRBNとSALL4由来S4Dタグを利用し、マウス個体内で標的タンパク質を迅速かつ可逆的に分解する技術を開発した。本高度化により、胎生期から成体まで、特定の細胞種・時期に限定してタンパク質機能を解析できる新たな個体解析基盤の確立に成功した（**図６**, Nat Commun. 2024）。

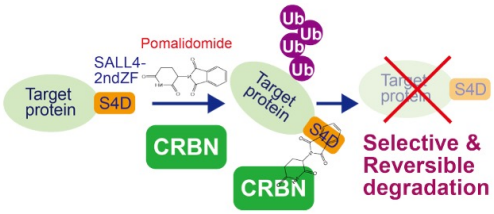


図６　SALL4デグロン(S4D)システムの概要

PROTAC依存インタラクトーム解析による薬剤分解能制御技術

AirIDを用いたインタラクトーム解析により、TPD標的タンパク質の相互作用因子を網羅的に同定した。さらにBRD4との相互作用をJQ1で阻害することでARV-110によるAR分解が促進され、標的タンパク質の相互作用環境を制御することがTPD感受性の向上につながることを明らかにした（**図７**, Commun Biol. 2025）。

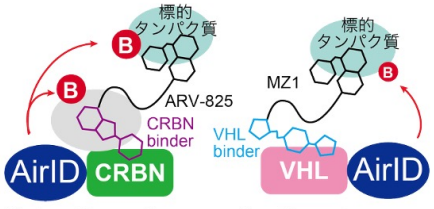


図７　標的バインダーは同じでCRBNバインダーもしくはVHLバインダーによる薬剤依存的インタラクトーム解析の原理

AirIDインタラクトーム解析によるTPD適応型E3リガーゼ探索基盤

PROTACを代表とする標的タンパク質分解（Targeted Protein Degradation: TPD）という新しい創薬戦略が世界的に注目されている。AirIDを用いて約60種類のDCAFの細胞内インタラクトームを体系的に解析し、各DCAFの機能特性を明らかにした。さらにCRL4複合体形成能や自己分解活性を指標として、TPDに有望なE3リガーゼを合理的に選別する評価基盤を構築し、新たなE3を活用したTPD開発への道を拓いた（**図８**, Mol. Cell 2026）。

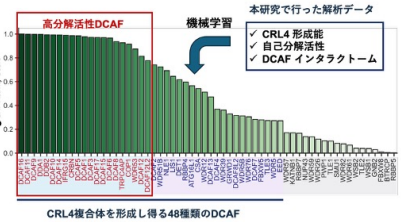


図８　PROTACに適した高分解活性DCAF E3リガーゼ群

（２）クライオEM解析に適した複合体試料の無細胞合成技術の高度化

クライオEM解析を支える指標バインダー・複合体安定化技術の開発

クライオEM解析に適した複合体試料調製技術として、AGIA-Fabを用いた指標バインダーを開発し、複合体2D平均像で明瞭な識別に成功した。さらに、近接ビオチン化で標識した複合体を安定化する抗ビオチン抗体を12種類取得し、弱い相互作用を含む複合体解析に向けた基盤構築を進めた。（**図１**, 投稿準備中）。

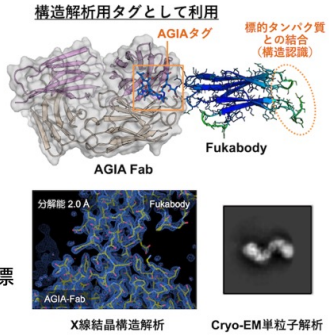


図１　抗AGIA Fab分子を基盤とした指標バインダーの例

コムギ無細胞系ナノディスクを用いた膜タンパク質のクライオEM解析基盤の開発

コムギ無細胞系とナノディスクを組み合わせ、クライオEM解析に適した膜タンパク質合成技術を開発した。GPCRを用いてAlphaScreenによる機能解析に成功し、精製試料のクライオEM 2D解析では単分散像を取得した。膜タンパク質の構造・機能解析を一体化した新たな支援基盤の構築を進めている。（**図２**, 投稿準備中）。

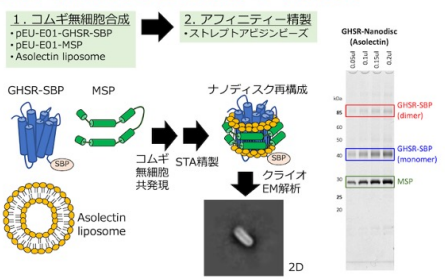


図２　コムギ無細胞系ナノディスクGPCR合成とクライオEM解析支援

今後の発展

（１）AirIDを基盤とした抗原分子・受容体・薬剤の同定・動態解析の高度化
当初計画したAirIDによる抗原分子・受容体・薬剤の同定・動態解析技術は概ね確立した。今後はTPD創薬への展開をさらに進め、AirIDを2断片化したsplit-AirIDを活用して、従来検出が困難であった薬剤誘導性タンパク質ユビキチン化を高感度に検出する新技術の開発を目指す。

（２）クライオEM解析に適した複合体試料の無細胞合成技術の高度化
安定化プローブ・バインダーなどの基盤技術は概ね確立した。今後は、多様な膜タンパク質・タンパク質複合体への適用を進め、クライオEM解析の実績を蓄積するとともに、汎用的な試料調製・構造解析支援技術への発展を目指す。