

シャペロン介在性オートファジー機構を利用した標的蛋白質を人工的に分解する新規手法の開発

宮本佑馬¹・〇山口昇真¹・清家達朗²・渡部徹郎²・横山三紀²・鳥越秀峰¹ (¹東京理科大学理、²東京医科歯科大学医歯学総合)

Development of a novel method to artificially degrade target proteins using chaperone-mediated autophagy mechanism (Graduate School of Science, Tokyo University of Science¹, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University²) MIYAMOTO, Yuuma¹; YAMAGUCHI, Shouma¹; SEIKE, Tatsuro²; WATANABE, Tetsuro²; HARA-YOKOYAMA, Miki²; TORIGOE, Hidetaka¹

細胞内には、生体内の不要な自己蛋白質を分解するオートファジー機構がある。この仕組みの一つであるシャペロン介在性オートファジー(CMA: chaperone-mediated autophagy)機構では、分子シャペロン Hsc70 蛋白質が Hsc70 結合性ペプチド配列(Hsc70bm: Hsc70-binding motif)を有する基質蛋白質に結合し、リソソームに運搬する。リソソームに運搬された基質蛋白質はリソソーム膜蛋白質 Lamp-2A に移行される。分子シャペロン Hsp90 により Lamp-2A がリソソーム膜上で多量体を形成すると、基質蛋白質はリソソームの内側に取り込まれ、分解される。その後、Hsp90 により Lamp-2A の巨大複合体は解消され、Lamp-2A は単一分子に戻る。

蛋白質の発現異常や翻訳後修飾異常が原因である疾患は少なくない。このような疾患の治療方法の開発を指向し、本研究では、CMA 機構を利用して、発現を抑制したい標的蛋白質を人工的に分解する新規手法の開発を検討した。具体的には、世界に蔓延する SARS-CoV-2 ウイルスの複製などに関与するヌクレオカプシド(N)蛋白質と、これを特異的に認識する 1 本鎖抗体(Anti-N-scFv-Fc)の特異的結合を利用して、CMA 機構により N 蛋白質を人工的に分解する新規手法を開発することを目的とした。

Anti-N-scFv-Fc 発現用プラスミドと N 蛋白質発現用プラスミドを 293T 細胞に導入しても、N 蛋白質はほとんど分解されなかった。しかし、Anti-N-scFv-Fc に Hsc70bm を融合した Anti-N-scFv-Fc-Hsc70bm 発現用プラスミドと N 蛋白質発現用プラスミドを 293T 細胞に導入したところ、N 蛋白質はほとんど完全に分解された。これは 293T 細胞内で N 蛋白質と Anti-N-scFv-Fc の特異的結合、および Hsc70bm と Hsc70 の特異的結合により、N 蛋白質、Anti-N-scFv-Fc-Hsc70bm、Hsc70 の 3 者が複合体を形成し、リソソームに運ばれ、N 蛋白質がリソソーム内で分解されたためと考えられる(図 1)。この結果は、標的蛋白質と特異的に強固に結合する物質と Hsc70bm の融合物質を細胞内に導入すれば、CMA 機構を利用した本研究の手法により、標的蛋白質を人工的に効率的に分解できることを示している。

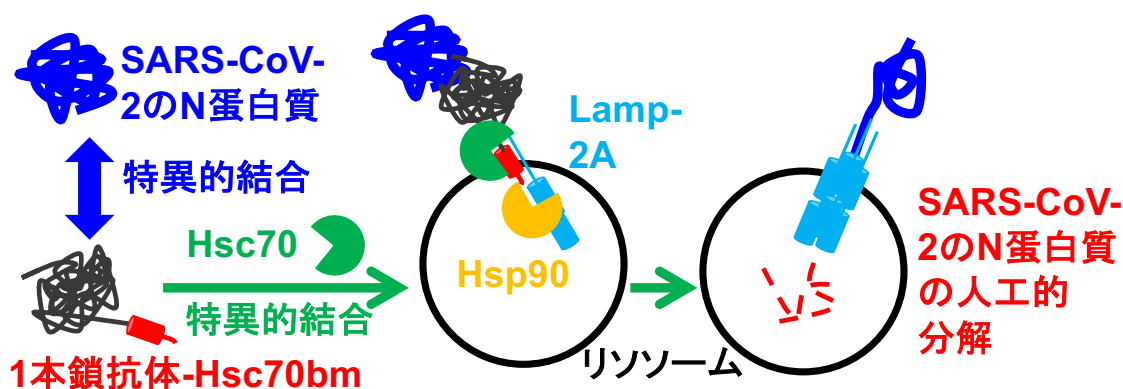


図 1: シャペロン介在性オートファジーを利用した SARS-CoV-2 の N 蛋白質の人工的分解