

令和3年9月20日	発表者 横田 歩飛
ChemBioChem 2018 , 19, 2312–2320	
【Title】 Proteome-wide identification of On- and Off-targets of Bcl-2 inhibitors in native biological systems by using Affinity-Based Probes (AfBPs)	
【Affiliation & Authors】 State Key Laboratory of Fine Chemicals, School of Chemistry, Dalian University of Technology. Dr. Ziqian Wang, Zongwei Guo, Dr. Ting Song, Xiaodong Zhang, Nianzhe He, Peng Liu, Peiran Wang, Prof. Dr. Zhichao Zhang	
【Abstract】 Affinity-based protein profiling (ABPP) とは、選択性の高い活性部位を標的とした affinity-based probes (AfBPs) によってタンパク質を標識する手法であり、薬剤候補のオン・オフターゲットを同定することが可能である。筆者らは先行研究により、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 と Mcl-1 の BH3 ドメインの疎水性結合部位を占有し阻害する S1-6 を報告している。 そこで本研究では、 S1-6 を元にオン・オフターゲットの標識、視覚化、濃縮を行う三機能 AfBP の合成を行った。はじめに、ELISA 法を用いたスクリーニングにより見いだされた Nap-1 に標識と濃縮の機能を持たせるために、末端アルキンと光を吸収して活性化する光反応性基の2つを導入した Nap-2 , Nap-5 をカップリング反応で合成した。SDS-PAGE による <i>in vitro</i> での評価は、 Nap-2 と Nap-5 は Bcl-2 と Mcl-1 に対応するバンドを検出したことから、標的タンパク質の標識が可能であることを示した。さらに、MCF-7 細胞株を用いた SDS-PAGE による <i>in situ</i> での評価は、標的である Bcl-2 と Mcl-1 に対応するバンドの他に、チューブリンに対応するバンドを検出した。このことから、チューブリンは Nap-1 のオフターゲットであることが示唆された。そこで、既知 Bcl-2 阻害剤を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、 Nap-2 によるチューブリンの標識を Nap-1 と Bcl-2 阻害剤が競合的に阻害したことから、チューブリンが Nap-1 と Bcl-2 阻害剤のオフターゲットであることが分かった。また Bcl-2 阻害剤は Nap-2 による Bcl-2 と Mcl-1 の標識も競合的に阻害したため、Bcl-2 と Mcl-1 が Nap-2 のオンターゲットであることが分かった。そして、チューブリンに BH3 ドメインの疎水性結合部位に類似した結合部位が存在するかを調べるために Mcl-1 阻害剤とチューブリン阻害剤を使用して競合標識実験をしたところ、どちらも Nap-2 によるチューブリンの標識を阻害した。また、ドッキング研究ではチューブリン阻害剤の結合部位に Nap-2 と Mcl-1 阻害剤が結合する予測結果を示した。このことから、チューブリンが BH3 ドメインの疎水結合部位に類似した結合部位を持つことが示唆された。 本研究で開発された AfBP である Nap-2 および Nap-5 は、 <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> で Bcl-2, Mcl-1 を標識、視覚化、濃縮することが可能であった。このプローブを用いて Bcl-2, Mcl-1 がオンターゲットでありチューブリンがオフターゲットであることを示した。また、チューブリンが BH3 ドメインの疎水結合部位に類似した結合部位を持つことが初めて示唆された。	