

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21470

研究課題名（和文）滑膜肉腫の原因となるSS18-SSX相互転座融合遺伝子翻訳産物の創薬構造解析

研究課題名（英文）Drug discovery and structural analysis of the SS18-SSX reciprocal translocation fusion gene translation product that causes synovial sarcoma.

研究代表者

岩崎 憲治（Iwasaki, Kenji）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授

研究者番号：20342751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究計画で期待される成果よりはるかに大きな成果が得られた。全長SS18-SSX1、SSX1と2に関する各種フラグメントに発現および精製プロトコルの確立に成功した。大部分が天然変性タンパク質であることがCD測定などにより判明したため、X線結晶構造解析ではなく、クライオ電顕単粒子解析、溶液NMR、高速AFM、EMSA等の生化学実験を駆使して解析を行った。その結果、SSX1のC末端領域とヌクレオソームとの複合体としてその構造を解明することに成功した（学術論文投稿準備中）。さらにAMED事業の支援によりインシリコ化合物スクリーニングを行うことができ、本課題を完遂することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫はいわゆる希少がんである。がんといえば、上皮細胞由来の癌腫、造血器悪性腫瘍が取り上げられることが多く、日本における悪性腫瘍全体の1%ともいわれる肉腫の研究を念頭においた文章をみかけることは少ない。このような疾患こそアカデミアで行うべきである。今回、希少がんというだけでなく、天然変性タンパク質というSBDDとしてのアプローチの難しい原因タンパク質に対して、その端緒につくことに成功したことは非常に大きい。萌芽としての意義を100%果たし、この薬開発の可能性を見いだせた成果は大きい。

研究成果の概要（英文）：The results were much greater than expected in the research plan. Expression and purification protocols were successfully established for full-length SS18-SSX1 and various fragments of SSX1 and 2. Since the majority of the proteins were found to be intrinsically disordered protein by CD measurements and other methods, we used cryo-EM single-particle analysis, solution NMR, and high-speed AFM for structural analysis instead of X-ray crystallography, and also made full use of other biochemical experiments, such as EMSA. As a result, we succeeded in elucidating its structure as a complex between the C-terminal region of SSX1 and nucleosomes (in preparation for submission for scientific publication). Furthermore, with the support of the AMED project, we were able to conduct in silico compound screening and complete this project.

研究分野：構造生物化学

キーワード：滑膜肉腫 クライオ電子顕微鏡 SBDD 天然変性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は希少がんである。がん研究といえば、肺がん、胃がん、大腸がんなどの上皮細胞由来の癌腫、白血病などの造血器悪性腫瘍が取り上げられることが多く、日本における悪性腫瘍全体の1%ともいわれる肉腫の研究を念頭においた文章をみかけることは少ない。滑膜肉腫は中でも軟部肉腫の約10%に相当する。転移も50-70%で生じるという報告があり、予後の悪いがんである。現在、広範切除が第一であり、患者のQOLのためにこの治療薬開発に挑むことは、特にクライオ電子顕微鏡など最新の技術をもって挑むことはアカデミアとして大きな意義がある。滑膜肉腫のドライバー遺伝子は染色体転座によって生じる *ss18-ssx* であるとされており、ここに明確な創薬ターゲットが存在することになる。この翻訳産物である *SS18-SSX* が、クロマチンリモデリング複合体とヌクレオソームの会合体に取り込まれることで、本来のクロマチンリモデリング複合体構成成分である野生型 *SS18* の結合が抑制されるだけでなく、*SMARCB1* の結合を阻害してしまう「追い出しモデル」がハーバード大のグループによって提唱された。構造生物化学等を駆使して、本仮説の検証をし、そこから *SBDD* による創薬へとつなぐ。

2. 研究の目的

SS18-SSX の構造を解明することが第一にあげられるが、ほとんどの領域が天然変性領域と予測されているために単体では不可能であることが想定される。まずは、*SS18-SSX* の全長の発現・精製系を確立し、このことを検証する。一方、*SS18-SSX* の78残基 *SSX* のうち特にC末端の34残基がヌクレオソームの酸性パッチに結合することが遺伝子発現異常のトリガーとなることが2020年にハーバードのグループから報告された。この分子機構を構造情報から検証するとともに、得られた構造から *SBDD* による創薬へと繋げる。

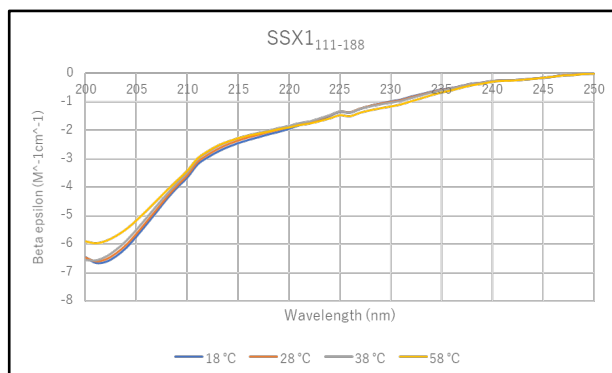
3. 研究の方法

最初に *SS18-SSX1* 全長の発現精製に挑み、CDスペクトル解析を行い、大部分が天然変性タンパク質であることを検証する。次に *SS18-SSX* の特に本来クロマチンリモデリング複合体成分でない *SSX* 領域に着目した実験を行う。野生型の111-188に相当する *SSX*(78aa) についてパラログ *SSX1* と *SSX2* それぞれについて発現系と精製系を構築する。NMR測定用に¹⁵Nと¹³Cの安定同位体ラベルした試料の調製も試みる。高速AFMによる全体構造のイメージング、多次元NMRによる構造解析を行う。また、*SSX1*(78aa)、*SSX2*(78aa) について、ヌクレオソームコア粒子(NCP)に対する *SMARCB1* との競合実験を行い、ハーバード大の提唱したモデルを検証する。さらに *SSXR*Dドメインと呼ばれる155-188の34aa *SSXC* 末端の34残基である *SSXR*Dドメインを発現精製し、再構成ヌクレオソームコア粒子(NCP)との結合をEMSAによって調べる。確認できたら、NCPとの複合体を作製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析に挑む。

4. 研究成果

(1) *SS18-SSX1*、*SS18-SSX2*、*SSX1*(78aa)、*SSX2*(78aa)、*SSX1RD*(34aa)、*SSX2RD*(34aa)の6種についてすべて、発現・精製系の構築に成功した。

(2) 全長 *SS18-SSX1* と *SSX1* についてCDスペクトルを温度変化させて計測し、大部分が天然変性タンパク質であることを確認した。さらに、高速AFMで *GST-SSX1*(78aa) のイメージングに成功し、これが天然変性タンパク質であることを再確認できた。*SSX1*(78aa) の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルからもこの領域が天然変性領域であることが示された。



SSX1(78aa)フラグメントのCDスペクトル。

(3) 本研究を通じて *SSX1*(78aa) がDNAと相互作用することを発見した。*GST-SSX1* とDNA断片との結合を高速AFMイメージングにて明瞭に観察することに成功した。EMSAにおいても両者の相互作用が確かめられた。このとき *GST* だけではDNAに結合しないことを確かめることができた。また、NMRのケミカルシフト摂動法を使用して *SSX1*(78aa) とDNA断片の結合解離定数の決定を試みた。リンカーDNAを含む再構成ヌクレオソームに対する *SSX1*(78aa) の結合領域をフットプリント法で決定することができた。

(4) *GST-SSX1RD* については、予定通り、Widom601のDNA配列145bpを使って再構成したNCPと

の EMSA を行い、相互作用の確認をした。この時、グルタルアルデヒドを加えた EMSA も同時に行い、その添加がゲルシフトをより明確にするという結果を得た。この結果に基づき、Graifix 法を使って、クライオ電子顕微鏡単粒子解析用の試料作製を行った。得られたクライオ電子顕微鏡画像から単粒子解析を行った結果、2.3 オングストロームというヌクレオソーム複合体関連では非常に高い分解能でその構造を得ることができた。原子モデル構築を行い、SSX1RD がヌクレオソーム酸性パッチに結合し、アルギニンアンカーと呼ばれる残基を含む、安定にフォールドした部分構造をもつことが判明した。本構造を元に AMED が行う BINDS 事業の支援を得てインシリコ化合物スクリーニングを行うことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 花南, 古寺 哲幸, 宮ノ入 洋平, 加藤 広介, 堀越 直樹, 胡桃坂 仁志, 竹中 聡, 岩崎 憲治
2. 発表標題 滑膜肉腫関連タンパク質 SS18-SSX1の新規機能
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 加藤広介, 堀越直樹, 竹中聡, 岩崎憲治.
2. 発表標題 SSX1に示唆される新規のDNA結合ドメインのその溶液中構造解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 千田美紀, 加藤広介, 堀越直樹, 竹中聡, 岩崎憲治.
2. 発表標題 SSX1に示唆される新規のDNA結合ドメインのその溶液中構造解析
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋花南, 堀越直樹, 古寺哲幸, 竹中聡, 岩崎憲治.
2. 発表標題 異常リモデリング複合体形成機構解明に向けた主要因子SS18-SSX1の性状解析
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 加藤広介, 西村正宏, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 竹中聡, 岩崎憲治.
2. 発表標題 SSX1 に示唆される新規の DNA 結合ドメインとその溶液中構造解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小淵里恵, 堀越直樹, 谷一寿, 吉永匡希, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治
2. 発表標題 腫瘍性融合タンパク質 SS18-SSX1 における C 末端領域のヌクレオソームへの結合様式
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治
2. 発表標題 天然変性領域で構成される SSX1 の新規機能から明らかになった滑膜肉腫発生のメカニズム
3. 学会等名 第48回生体分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治
2. 発表標題 然変性タンパク質が引き起こす滑膜肉腫発生の新規メカニズム
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治
2. 発表標題 天然変性タンパク質SSX1の新規機能が引き起こす滑膜肉腫発生メカニズム
3. 学会等名 第95回生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治
2. 発表標題 天然変性タンパク質SSX1の新規機能が引き起こすクロマチンリモデリング異常のメカニズム
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 津本 浩平、前仲 勝実 編（「2 クライオ電子顕微鏡で弱い相互作用の複合体構造を解析するための戦略」執筆担当）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 368
3. 書名 創薬研究のための相互作用解析パーフェクト	

1. 著者名 岩崎憲治編集	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 144
3. 書名 医学のあゆみ「構造生命科学による創薬への挑戦」 2021年 278巻6号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題の成果発表を通じて、学生が学会において2度の受賞、大学院において研究学群長表彰を受賞した。
 本研究課題の成果として2報の学術論文を投稿準備中である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹中 聡 (Satoshi Takenaka) (00588379)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・整形外科部長 (84409)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 花南 (Takahashi Kanami)		研究室大学院生

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関