

研究題目：マウス生体内近接ビオチン化法による転写因子複合体構成因子の網羅的同定

研究組織

研究代表者：谷内 一郎（国立研究開発法人 理化学研究所 免疫転写制御研究チーム）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

タンパク質の機能や作用原理を理解するには相互作用するタンパク質の同定が不可欠である。これまで相互作用するタンパク質の同定法は抗体を用いた免疫沈降法が主流であったが、近年酵素活性を利用し標的タンパクの近位に存在するタンパク質を網羅的に化学修飾する Proximity based labelling 法が開発された。大腸菌のビオチン化酵素である BirA の R118G 変異型である BirA*を利用した BioID 法はその一つであり、標的タンパク質と BirA*との融合タンパク質の発現により標的タンパク質の近位約 10 nm に存在するタンパク質を網羅的にビオチン標識することが出来る。愛媛大の澤崎はより高い特異性を示す改良型 BirA*変異体である AirID 法を開発した。そこで本共同利用では AirID 法を活用し、免疫細胞分化に重要な転写因子群と相互作用するタンパク質を網羅的に同定する。

転写因子は異なるゲノム領域では異なる機能を発揮する。したがってゲノム局所における転写因子の機能制御機構を解明するには、特異なゲノム領域で特異的な制御を行う機序を理解することが重要であり、その目的の為には研究対象となるゲノム領域上で形成される核タンパク質複合体を同定する必要がある。そこで、本共同利用では LexA 配列の挿入によるゲノム領域標識法と、SunTag システムを組み合わせることにより、特定のゲノム領域上で形成される核タンパク質複合体構成因子をビオチン標識することで網羅的に検出を可能にする測定法 (On site BioID 法) を構築する。

[1-2]研究の方法・経過

内在性の SATB1 遺伝子座に AirID cDNA をノックインする手法で SATB1 転写因子の N 末側に AirID を付加した AirID-SATB1 融合タンパク質を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。同様に Runx 転写因子ファミリータンパク質の機能発現に必須である Cbfb タンパク質の C 末端に AirID を付加した Cbfb-AirID 融合タンパク質を発現するノックイン Tg マウスを作製した。

また On site BioID 法に使用する複数のトランスジェニックマウスを作製した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

AirID-SATB1 融合タンパク質、Cbfb-AirID 融合タンパク質を発現する Tg マウスにビオチン水を 5 日間与えたのち、胸腺を採取し、共同研究者の小迫らが開発した Tamavidin 2-REV 法によるプロテオーム解析を行い、ビオチン標識されたペプチドの網羅的な同定を行った。その結果、SATB1 タンパク質及び Cbfb タンパク質において、それぞれ 102 種類、98 種類の相互作用タンパク質の同定に成功した。これまで SATB1 タンパク質と Runx/Cbfb タンパク質が相互作用することが知られていたが、インターラクトーム解析の結果 40 種類のタンパク質が SATB1 タンパク質と Runx/Cbfb タンパク質と共通に会合していた。一方、SATB1 タンパク質は NuRD 複合体の構成因子、Cbfb タンパク質は BAF 複合体の構成因子と優位に相互作用していることが明らかとなった(図 1)。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究による成果は、マウス生体内での AirID 法の実施が可能であり、相互作用タンパク質の網羅的同定が簡易に可能であることが示すものであり、今後生体内での相互作用タンパク質同定法として波及することが期待され

site BioID 法の樹立過程で作製した Tg マウスを利用することで、標的タンパク質周囲に AirID タンパク質を集積されることが可能と考えられ、標的タンパク質への AirID の直接的な融合と同様の効果が期待される。

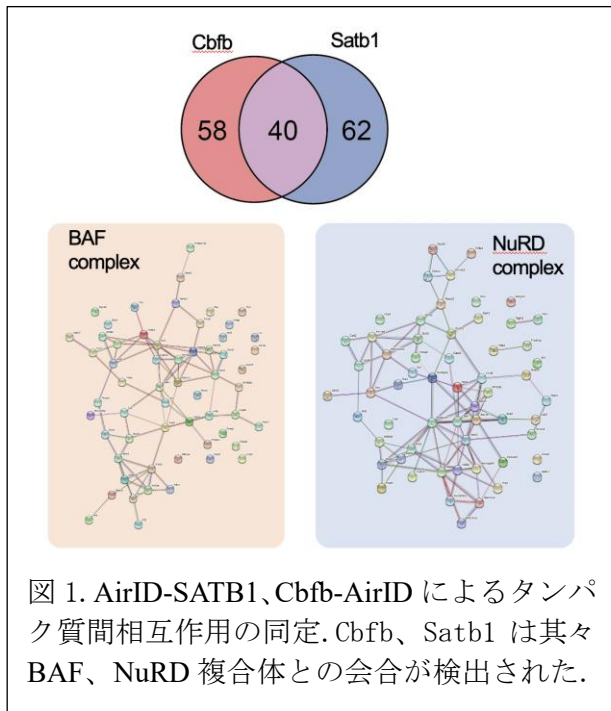


図 1. AirID-SATB1、Cbfb-AirID によるタンパク質間相互作用の同定. Cbfb、Satb1 は其々 BAF、NuRD 複合体との会合が検出された。

る。

また On site BioID 法が樹立できれば、これまで計測不可能であった特定ゲノム上での核タンパク質複合体の同定が可能となり、遺伝子発現制御機構の解明に大きく貢献する技術となる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

なし。

[3-3]成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後の課題としては、まず On site BioID 法の樹立とその応用、汎用化を目指した改良が挙げられる。例えば、現方法では AirID を標的タンパク質に直接融合させる手法を用いているが、SunTag システムの原理を応用することで、On