

研究題目 近接ビオチン化酵素を用いた個体内での薬剤依存的な相互作用

解析系の開発

研究組織

研究代表者：澤崎 達也（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

我々が、最近開発した近接ビオチン標識酵素 AirID (Ancestor BirA biotin identification)は、大腸菌由来のビオチンリガーゼ BirA を元配列として、機械学習を基盤とした AI デザイン手法により新たに設計された酵素である。サリドマイドの受容体であるヒトセレブロン (HsCRBN) に AirID を融合したタンパク質 (AirID-HsCRBN) を発現させることにより、細胞内において、投与薬剤の特異性に依存してネオ基質タンパク質をビオチン標識できることが分かった。本研究では、さらに発展させ、マウス個体内で AirID を用いて、薬剤応答依存的にビオチン標識することにより基質タンパク質を同定・解析できる系の構築を目指した。

[1-2]研究の方法・経過

マウス ES 細胞を用いて、安定発現に適した Rosa26 遺伝子座に HsCRBN-AirID を組み込んだトランスジェニックマウス (Tg マウス) の作製を行った。交配することにより、HsCRBN-AirID のホモ系統を樹立した。薬剤投与 4~5 日前にビオチンを含む飲料水をゲージに入れることで生体内のビオチン濃度を高めた。薬剤投与は腹腔内に行い、投与後 6 および 12 時間で各種臓器を回収した。回収した組織の抽出液を用いて、ストレプトアビジンによるプルダウンアッセイ、および質量分析解析を行った。検出したビオチン化ペプチドの解析から、ビオチン化されたタンパク質およびビオチン化部位の同定を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

細胞での解析と同様のフォームである AirID を N 末端に融合した AirID-HsCRBN のノックインも試みたが、かなりの数の ES 細胞に導入したにも関わらず、結局、目的のフォームでゲノムに組み込みことはできなかった。そこで C 末端に AirID 融合した HsCRBN-AirID を構築し生化学的解析および細胞解析の結果を比較したところ、AirID-HsCRBN と同様のネオ基質分解能およびビオチン標識能を示した。そこで、HsCRBN-AirID Tg マウスの作製を進め、取得することに成功した。得られたホモ系統を用いて解析を進めたところ、薬剤処理 6 時間での胸腺の抽出液のストレプトアビジンプルダウンアッセイにより、IKZF1 の顕著なビオチン標識が確認できた。また、質量分析による解析を行ったところ、既知のネオ基質のビオチン標識を検出することができた。さらに、サリドマイド (Th) を含む 4 種類の誘導体をそれぞれ投与して解析した結果、レナリドミド (Le) およびポマリドミド (Po) が最も強く IKZF1 および IKZF3 のビオチン標識が起り、5-水酸化サリドマイド (5HT) では IKZF1 のビオチン標識は検出されなかった (図 1)。これらの薬剤依存的なビオチン標識の特異性は、我々の研究室で行った生化学的解析および細胞内での解析と同様の結果であった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究の HsCRBN-AirID Tg マウスと質量分析法により、サリドマイド依存的なネオ基質の同定および解析をマウス個体内で行うことができることが示された。現在、脳などの胸

腺以外の組織で解析を進行中であり、種々の組織における新たなネオ基質の同定を行う。また、本マウスを用いたネオ基質の時空間的な同定および解析を進める予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Yamanaka S, Horiuchi Y, Matsuoka S, Kido K, Nishino K, Maeno M, Shibata N, Kosako H, Sawasaki T. A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues. **Nat Commun.**, 13: 183, 2022.
2. Shioya R, Yamada K, Kido K, Takahashi H, Nozawa A, Kosako H, Sawasaki T. A simple method for labeling proteins and antibodies with biotin using the proximity biotinylation enzyme TurboID. **Biochem Biophys Res Commun.**, 592: 54-59, 2022.

[3-2]学会発表

- 1) 山田 航大、塩屋亮平、徳永聡、曾我郁弥、城戸康希、澤崎達也「膜タンパク質の細胞外インタラクトーム解析に向けた抗体融合 AirID 技術の開発」第 62 回日本生化学会中国・四国支部例会、オンライン、2021 年 9 月 10-11 日
- 2) 山中 聡士、堀内 雄斗、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也「新規近接ビオチン化酵素 AirID を用いたタンパク質分解誘導剤依存的なインタラクトーム解析技術の開発」第 94 回日本生化学会大会、2021、11 月 4 日、オンライン
- 3) 村松 ちひろ、野澤 彰、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也「近位依存性ビオチン化酵素 AirID を用いた植物個体内でのジベレリン受容体相互作用タンパク質の探索」第 56 回植物化学調節学会、2021、11 月 13-14 日、オンライン 11 月 14 日(2021)
- 4) 高橋 宏隆、坂口 詩穂、林 徳宙、入江 崇、小迫 英尊、澤崎 達也「In vitro および細胞レベルの 2 つの相互作用解析を基盤としたウイルス RNA 受容体 MDA5 の新規結合タンパク質の網羅的同定」第 44 回日本分子生物学会年会、2021、12 月 1-3 日、パシフィコ横浜
- 5) Kohdai Yamada, Ryohei Shioya, Soh Tokunaga, Fumiya Soga, Kohki Kido, Mika K Kaneko, Yukinari Kato, Tatsuya Sawasaki 「mAbID and FabID: Antibody dependent proximity biotinylation technology using AirID for cell-surface protein-protein interactome analysis of membrane proteins」第 44 回日本分子生物学会年会、2021、12 月 1-3 日、パシフィコ横浜

- 6) 庄屋 祐希、三輪 和慶、城戸 康希、山中 聡士、澤崎 達也「タンパク質分解誘導分子探索・解析のための DCAF プロテインアレイと AirID 融合 DCAF ファミリー細胞ライブラリー」第 44 回日本分子生物学会年会、2021、12 月 1-3 日、パシフィコ横浜
- 7) 堀内雄斗、山中聡士、城戸康希、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也「新規ビオチン化酵素 AirID を用いた細胞内分子のり型薬剤依存的な相互作用タンパク質を解析する技術の開発」第 44 回日本分子生物学会年会、2021、12 月 1-3 日、パシフィコ横浜
- 8) 篠原 颯太、杉山 修世、小塚 康平、中野 祥吾、伊藤 創平、森下 了、野澤 彰、澤崎 達也植物での解析に最適化された近位依存性ビオチン標識酵素の開発」第 44 回日本分子生物学会年会、2021、12 月 1-3 日、パシフィコ横浜

[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

本作製マウスを用いた PROTAC 薬の基質応答評価をビオチン標識としての検出・解析できる系の確立を目指す。

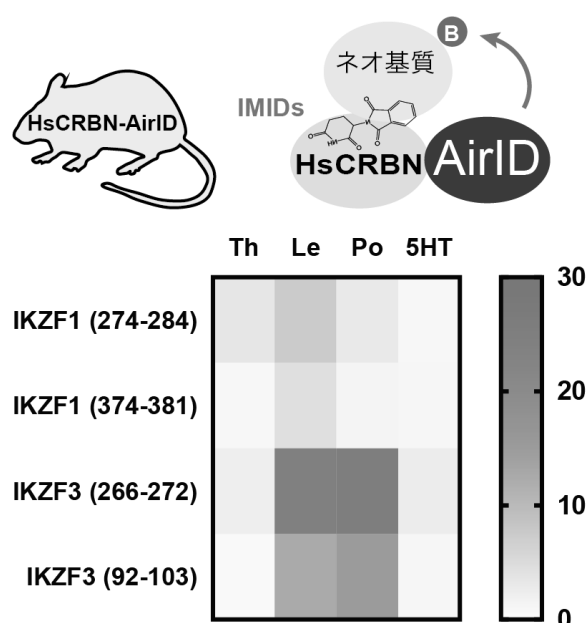


図 1. マウス個体内での薬剤依存的なネオ基質のビオチン標識結果