

研究題目 樹状細胞における核内受容体ファミリーの機能解明

研究組織

研究代表者：山崎 晶（大阪大学微生物病研究所）

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：石川 絵里（大阪大学微生物病研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ミエロイド系細胞における核内受容体ファミリーの役割を明らかにするため、樹状細胞特異的欠損マウスを樹立したところ、脾臓とリンパ節腫脹、肝炎、皮膚炎が起き、死に至ることを見出した。当該核内受容体の内因性リガンドの報告は未だ無く、タンパク質同士の相互作用がその活性制御に重要と考えられている。本共同研究では、樹状細胞における核内受容体ファミリーの相互作用分子を同定し、その機能を明らかにすることにより、欠損により死に至るメカニズムを解明することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

近年、TurboID や AirID といった新規ビオチン標識酵素の開発、ビオチン化ペプチドやタンパク質の精製手法とマスマスペクトル解析技術の発展により、高感度、高精度のタンパク質-タンパク質相互作用の解析が可能となってきた。この BioID（近位依存性ビオチン標識）法を用い、樹状細胞における核内受容体ファミリーの相互作用分子の同定を試みた。まず樹状細胞で発現するファミリー分子3種のN末あるいはC末に AirID を繋げた遺伝子を作成した。これらを HEK293T 細胞に導入し、ウェスタンブロットにて発現を確認したところ、いずれも C 末に AirID を繋げたコンストラクトの発現が高かったため、これらをマウス樹状細胞株 DC2.4 へ遺伝子導入した。ビオチンを含む培地での培養下で、導入した遺伝子の発現および AirID によるタンパク質のビオチン化が確認できた。そこで、ビオチン非存在下で培養後、ビオチンを

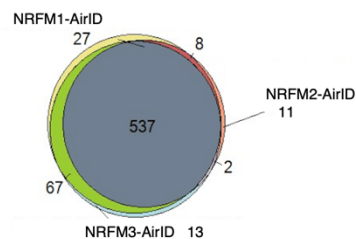
添加し標識した細胞を n=3 で準備し、マスマスペクトル解析に供することとした。細胞溶解液をトリプシン消化後、Tamavidin 2-REV によりビオチン化ペプチドを精製し、マスマスペクトル解析を行った。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

解析の結果、ビオチン化ペプチドを含む分子が 500 以上同定され、予想通り核内分子が多く検出された。また、導入した分子そのもののビオチン化も検出されたことから、BioID がきちんと働いていることが確認できた。

Mock に比べ多く検出されてきたビオチン化分子の大半は3種の核内受容体ファミリー間でオーバーラップしており、既に結合する分子として報告のあるポリ ADP リボシル化酵素 PARP1 も検出された。一方、検出された分子の中にはそれぞれに特異的に検出されている分子もいくつか存在したことから（図 1）、ファミリー分子3種には共通した機能と、各分子に特異的な機能があると考えられた。



Sample	Exclusive Protein#
NRFM1-AirID	27
NRFM2-AirID	11
NRFM3-AirID	13
NRFM1-AirID/NRFM2-AirID	8
NRFM2-AirID/NRFM3-AirID	2
NRFM1-AirID/NRFM3-AirID	67
NRFM1-AirID/NRFM2-AirID/NRFM3-AirID	537

図 1 BioID 法により検出された相互作用分子の内訳
NRFM: 核内受容体ファミリー分子

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

当該核内受容体ファミリーは転写因子として働くことが知られているが、リガンド結合ポケットが小さく、リガンド非依存的に働くと考えられている。実際、これまでに内因性リガンドの報告は無く、リガンド以外の他のタンパク質との相互作用がその活性制御に重要であると考えられている。いくつかの相互作用タンパク質が報告されているが、これまで網羅的な相互作用分子の解析は行われていなかった。

本共同研究により得られた相互作用分子をさらに解析することで、樹状細胞における新たな当該核内受容体ファミリーの活性制御分子を同定できる可能性がある。またそれにより、樹状細胞分化、増殖、機能における役割が明らかとなれば、当該核内受容体の樹状細胞特異的欠損により個体が死に至る原因を解明できる蓋然性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

該当なし

[3-2]学会発表

該当なし

[3-3]成果資料等

該当なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究で明らかとなった相互作用分子が、実際に当該核内受容体ファミリーの活性を制御する分子であるか否かを検証することが最も重要な課題である。今回の解析により見出された分子の中で、これまでに相互作用が報告されている分子に加え、新たに見つかった転写コアクチベーターやコリプレッサーとの結合や転写活性、あるいはキナーゼによるリン酸化を *in vitro* で検証し、実際に当該分子の活性を制御する可能性があるかを明らかにする予定である。さらに、活性を制御すると考えられる分子については、遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を解析する予定である。