

研究題目 近接ビオチン化酵素を用いたインタラクトーム解析による DCAF ファミリーの包括的理解

研究組織

研究代表者：山中 聡士（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）

研究分担者：澤崎 達也（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

植物の主要ホルモンの多くはタンパク質-タンパク質間相互作用を誘導する分子のり (Molecular glue) として機能しているが、動物細胞においてこのような分子の報告例はない。一方で、サリドマイドのような人工的に開発された低分子化合物が Molecular glue として機能し、標的タンパク質の分解を誘導することが報告されている。非常に興味深いことに、これまでに発見されている Molecular glue 型のタンパク質分解誘導分子の多くは、複合体型 E3 ユビキチンリガーゼ CRL4 の基質認識受容体である DCAF ファミリーを標的とすることが明らかになっている。60 種類の DCAF がヒトゲノムにコードされているが、その殆どの生物機能は不明である。本研究では、我々が 2020 年に開発した近接ビオチン化酵素である AirID を融合した AirID-DCAF 発現細胞株ライブラリーを用いて、動物細胞におけるタンパク質分解誘導分子の発見に向けた DCAF ファミリーの包括的理解を目指した。

[1-2]研究の方法・経過

各 AirID-DCAF を安定発現する HEK293T 細胞株を用いて、AirID-DCAF の細胞内局在を免疫染色によって解析した。さらに、既知の相互作用タンパク質がビオチン化されていることを、ストレプトアビジンビーズを用いたプルダウン法によって確認した。次に、各 AirID-DCAF 安定発現細胞株を用いた質量分析を行い、各 DCAF タンパク質によって特異的にビオチン化されているタンパク質および共通してビオチ

ン化されているタンパク質を解析した。さらに、siRNA によって 4 種の DCAF をノックダウンした HEK293T 細胞を用いて、TMT を用いた定量的質量分析を行った。細胞内においてビオチン化され、定量的質量分析においてタンパク質量が増加していたタンパク質を解析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

各 AirID-DCAF 安定発現細胞株を用いた免疫染色およびプルダウンアッセイによって、AirID-DCAF が報告のある細胞内局在を示し、既知の相互作用タンパク質をビオチン化していることを確認した。さらに、各 AirID-DCAF 安定発現細胞株を対象にしたビオチン化タンパク質の質量分析から、多くの DCAF タンパク質において CRL4 複合体の構成因子である DDB1 や CUL4 のビオチン化ペプチドが検出された。また、これまでに基質の報告例がある DCAF タンパク質において、既知の基質が特異的にビオチン化されていることを確認した。重要なことに、各 DCAF タンパク質において明確に異なるタンパク質群がビオチン化されており、各 DCAF タンパク質の細胞内局在や機能を明らかにするための基盤情報の獲得に成功した。最後に、4 種の DCAF タンパク質をノックダウンした細胞における定量的質量分析結果および RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析結果と、ビオチン化タンパク質の質量分析結果を組み合わせることで 2 種の DCAF の基質タンパク質を複数種類同定することに成功した(図 1)。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究によって、AirID-DCAF 対象にした網羅的な質量分析結果を用いることで基質タンパク質や相互作用タンパク質を見出すことが可能であることが示された。現在、得られた質量分析結果を用いて GO 解析等を行うことでDCAFファミリーの包括的な解析を進めている。また、生体内タンパク質分解誘導分子探索のための評価系の構築を進める予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 1) 近接ビオチン化酵素 AirID を融合した DCAF 細胞株ライブラリーの構築と評価、長岡昂治、河野将大、庄屋祐希、山中聡士、澤崎達也、第 63 回日本生化学会中国・四国支部例会、2022 年 5 月 28 日、国内、オンライン
- 2) 催奇性を軽減した血液がん治療に有効なサリドマイド誘導体の開発、山中聡士、澤崎達也、第 81 回日本癌学会学術総会、2022 年 9 月 29 日-10 月 1 日、パシフィコ横浜
- 3) 近位依存性ビオチン化酵素を用いたタンパク質分解誘導剤依存的な相互作用解析、山中聡士、堀内雄斗、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也、第 95 回日本生化学会大会、2022 年 11 月 9 日-11 日、名古屋国際会議場
- 4) 近位依存性ビオチン化酵素 AirID 融合 DCAF 発現細胞株ライブラリーの構築と解析、長岡昂治、河野将大、庄屋祐希、山中聡士、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也、第 95 回日本生化学会大会、2022 年 11 月 9 日-11 日、名古屋国際会議場
- 5) 近位依存性ビオチン化酵素 AirID を用いたタンパク質分解誘導剤依存的なビオチン標識解析、堀内雄斗、山中聡士、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也、第 45 回日本分子生物学会年会、2022 年 11 月 30 日-12 月 2 日、幕張メッセ
- 6) A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues. Satoshi Yamanaka, Tatsuya Sawasaki. The International Symposium in Tokyo 2022, Ubiquitin New Frontier “from Neo-Biology to Targeted Protein Degradation” 2022 年 12 月 3 日~12 月 4 日、東京大学本郷キャンパス

[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

本共同研究によって得られた質量分析結果を基盤にしながら、AirID-DCAF 安定発現細胞株を用いた生体内タンパク質分解誘導分子の発見を目指す。

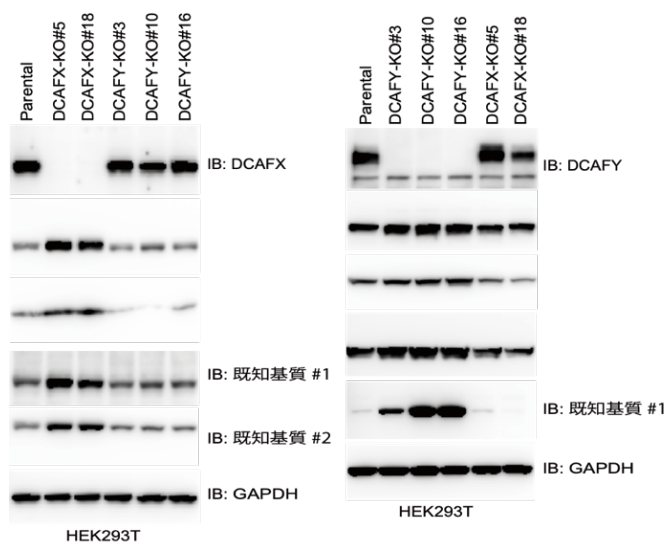


図 1. 2 種類の DCAF ノックアウト細胞における基質タンパク質の解析