

研究題目 新規近接依存性ビオチン化酵素 AirID の開発と利用

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

我々は、高いタンパク質相互作用依存性を示す新規近接依存性ビオチン標識酵素 AirID (Ancestor BirA biotin identification)を開発した。サリドマイドはセレブロン (CRBN) と結合することにより、本来の基質とは異なったタンパク質 (ネオ基質) との相互作用を誘導する (図1)。CRBN は E3 リガーゼであるため、ネオ基質はユビキチン化されプロテアソームにより分解される。本研究では、CRBN に AirID を融合した AirID-CRBN を発現する細胞およびマウス個体と質量分析法を用いて、サリドマイド依存的なネオ基質が同定できる系の構築を目指した (図2)。

[1-2]研究の方法・経過

レンチウイルスにより AirID-CRBN をゲノムに組み込んだ形質転換 HEK293T 細胞および神経細胞 (IMR32) の作製を行った。また Rosa26 遺伝子座上に CRBN-AirID をノックインしたマウス ES 細胞を構築し、形質転換マウスの作製を進めた。それらの細胞にビオチンと共に、サリドマイドもしくはその誘導体 (レナリドミド、ポマリドミド) を添加し、細胞回収を行った。回収された細胞の抽出液を用いて、質量分析解析を行った (図3)。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

現在、AirID-CRBN を発現する HEK293T 細胞を用いた解析が終了した。その結果、これまで CRBN と相互作用することが知られている Cullin 4 および Rbx1 タンパク質のビオチン化が検出された。これらは、AirID-CRBN が細胞

内で Cullin 複合体を形成し、AirID はその複合体をビオチン化できることを示している。また、ポマリドミドを投与した細胞においてのみ、既報のネオ基質として知っているタンパク質が同定された。この事は、AirID-CRBN がサリドマイド誘導体依存的にネオ基質をビオチン化できることを示して。さらに興味深いことに、新規のネオ基質候補 1 種類を見出した。さらに生化学的な解析を進めたところ、このタンパク質はサリドマイドやその誘導体依存的に CRBN と結合することが明らかとなった。

[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 AirID-CRBN 発現細胞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行うことができることが示された。現在、神経細胞およびマウス ES 細胞の解析を進行中であり、新たなネオ基質の同定を目指す。また、5月頃には CRBN-AirID を発現する ES 細胞から個体の作製ができる予定であるため、マウス個体を用いたネオ基質の時空間的な同定および解析を行うことができると期待している。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 1) 城戸康希、中野祥吾、伊藤創平、小迫英尊、澤崎達也「新規近位依存性ビオチン標識酵素 AirID の開発」第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、神奈川県横浜市、2019.6.24~26
- 2) Kohki Kido, Shogo Nakano, Sohei Ito, Hidetaka

Kosako, Tatsuya Sawasaki “AirID: a novel proximity biotinylation enzyme for analysis of protein–protein interaction”2019 ASCB|EMBO Meeting, Washington, DC, 2019.12.7～11

[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
マウス個体を用いて、ネオ基質同定条件の至適化を行う。

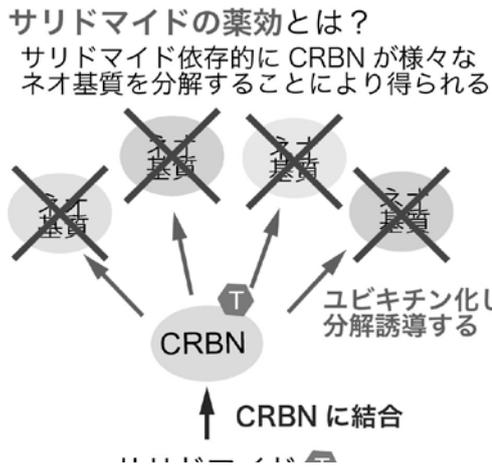


図1. サリドマイドの作用機構

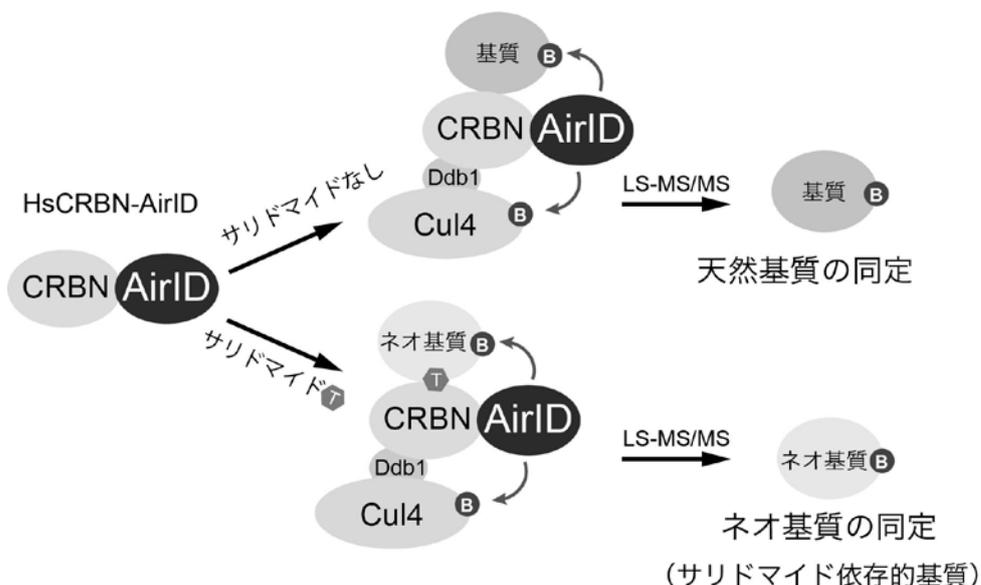


図2. AirID を用いたサリドマイド依存的ネオ基質同定技術の概要

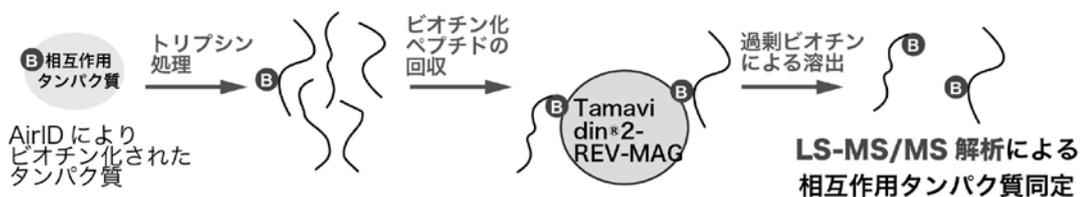


図3. 質量分析法を用いたビオチン化タンパク質同定の概要