

研究題目 BioID 法を用いた視床下部 Rap1 と相互作用するタンパク質の網羅的解析

研究組織

研究代表者：福田 真 (Baylor College of Medicine, Children's Nutrition Research Center)

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

本研究では、中枢性糖代謝およびメトホルミンの抗糖尿病作用において必須のメディエーターと考えられる Rap1 と相互作用する視床下部タンパク質を、近接ビオチン標識法を用いて網羅的に検索・同定することを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

ヒューストンの福田ラボで、恒常的活性化型 Rap1 (Myc-タグ付き Rap1E63) と改変型ビオチンリガーゼ BioID2 との融合タンパク質 (Rap1-BioID2) を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。このウイルスを脳定位固定装置下で視床下部内側基底部に注入した。視床下部特異的な恒常的活性化型 Rap1 の発現は、Myc タグ抗体および Rap1 抗体によるウェスタンブロット法により確認した。さらに、このマウスにビオチンを含んだ餌 (0.5%ビオチン) を 7 日間与えることで、ビオチン化タンパク質群が視床下部で増加することを見出した。このビオチン標識は、ビオチンリガーゼ依存的であった。ウイルス注入済みの視床下部を徳島大学の小迫教授に送付し、活性型 Rap1 依存的なビオチン標識タンパク質群の網羅的解析を行った。具体的には、小迫教授らが開発したタマビジン 2-REV を用いてビオチン化ペプチドの濃縮精製を行い、高性能質量分析装置を用いてビオチン化タンパク質を網羅的に同定した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

ビオチン標識タンパク質の網羅的検索の結果、活性型 Rap1 と相互作用する視床下部タンパク質として 2,222 種の異なるタンパク質が

同定された。今回用いた Rap1-BioID2 ビオチン標識アプローチは、以下の理由から適切に機能していると考えられる。まず、ベイトタンパク質である Rap1E63 自体が最もビオチン化されたタンパク質であったこと。また同定したタンパク質の中には、B-Raf、Afadin、Shank などの既知の Rap1 結合タンパク質が複数含まれていたこと。さらに、Rap1 が存在しないミトコンドリアの電子伝達系超巨大複合体では、約 100 種類の成分因子のうちビオチン化タンパク質がゼロであったことも、このアプローチの特異性を示している。加えて、同定された因子の中には、これまで報告されていない多数の受容体やイオンチャネルなどの膜タンパク質成分が含まれていた。また、リソソームシグナル複合体の構成因子にも複数のビオチン化された因子が見いだされた。これらの結果は、本研究によって新たな Rap1 相互作用因子が同定された可能性を示唆している。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

我々は最近、Rap1 の中枢神経系特異的ノックアウトマウスの解析から、神経系 Rap1 が抗糖尿病薬メトホルミンのターゲットである可能性を見出した。今回の共同研究では、この仮説をさらに裏付ける結果が得られるとともに、メトホルミン作用の新しいメカニズムの解明へつながるデータを得ることができた。特筆すべきは、同定した多数の Rap1 相互作用候補因子群の中に、中枢神経系における糖代謝調節に関与する複数の膜タンパク質とリソソーム複合体が含まれていたことである。今後、Rap1 とこれらの候補因子との物理的相互作用の詳細を明らかにするとともに、メトホルミンとの機能

的な連関を解明することを目指す。これにより、抗糖尿病薬メトホルミンの中枢作用という、これまで全く未知であったメカニズムの一端が明らかになることが期待される。本共同研究の成果は、メトホルミンの作用機序の理解を深め、新たな糖尿病治療法の開発につながる可能性を秘めている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

本共同研究では、小迫教授の研究室で開発された高感度かつ特異的なビオチン標識タンパク質の網羅的同定アプローチと最先端の質量分析法を用いることで、信頼性の高い **Rap1** 相互作用タンパク質ネットワークを明らかにすることができた。この成果は、**Rap1** シグナル伝達経路の理解を大きく前進させるものである。しかし、今回得られた膨大な情報を有効に活用するためには、データ解析ソフトウェアを用いた定量解析を行い、**Rap1** 相互作用ネットワークの詳細な細胞生物学および生化学的性状を明らかにすることが求められる。これらの解析により、**Rap1** とその相互作用因子の結合様式や結合強度、さらには細胞内局在などの重要な情報が得られると期待される。