

生細胞内でのタンパク質間相互作用を捉える手法の開発



研究ノート

樋野 展正*

Covalently capturing protein-protein interactions in living cells

Key Words : protein-protein interactions, photo-cross-linking, unnatural amino acids, expanded genetic code

はじめに

多くの方にとって、タンパク質という言葉からイメージされるのは栄養素としてのそれであろう。しかし、生体内のタンパク質の働きはより多彩かつ緻密であり、全ての生命活動に必須の役割を担っている。食事やプロテイン飲料を通して摂取されたタンパク質は消化管内でアミノ酸にまで分解され、体内に吸収される。血流に入ったアミノ酸は全身の細胞に取り込まれ、そこで生命活動に必要な酵素や生体を支える構造タンパク質といったさまざまなタンパク質に新たに生まれ変わる。ヒトを構成する37兆個の細胞ひとつひとつに、数万種類の機能の異なるタンパク質が発現し、さらにそれらが相互に作用しあうことで複雑なネットワークを形成している(図1左)。このようなネットワークは、細胞が外部からの刺激に応じて速やかに増殖したり、適切な形質を持つよう分化するために必須の役割を果たし、この調節がうまくいかなると細胞の異常増殖やがん化へと繋がる。すなわち、細胞内でどのようなタンパク質が互いに相互作用し、ネットワークを形成しているのかを知ることは、生命現象のメカニズムや疾患原因の解明に向けた重要な足掛かりとなる。

相互作用の現場をおさえる

個々の役割を持ったタンパク質がそれ単独では機

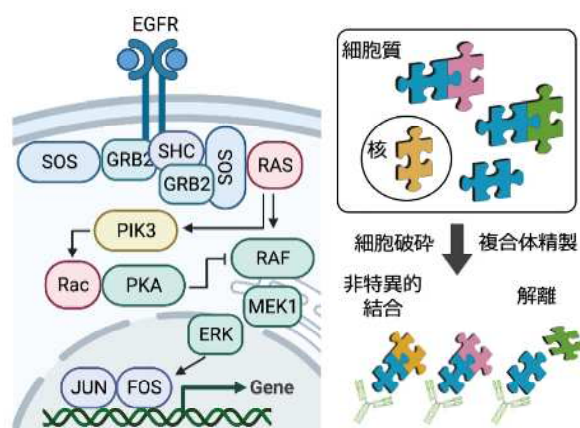


図1 タンパク質間相互作用ネットワークの例(左)と、共免疫沈降法を用いた従来の相互作用解析(右)

能せず、他のタンパク質とのネットワークを通じて細胞全体としてのアウトプットを出す様子は、人間社会のネットワークとよく似ている。タンパク質の中には、他の多数のタンパク質とコミュニケーションをとることで情報伝達のハブとして働くものもいれば、脂質膜というパーティションで囲まれた小器官内の限られたコミュニティでのみ生活するものもいる。速やかな情報伝達を行うには互いの接触時間はある程度短い方が良く、常に協力して働く場合には安定な共同体を形成する方が都合が良い。

あるタンパク質の役割を知りたいと思う時、その交友関係すなわち相互作用ネットワークを調べるのは有効な手段である。細胞内でのタンパク質間相互作用を調べる方法としては、一般的に共免疫沈降法が用いられる(図1右)。この方法では、界面活性剤を用いて細胞からタンパク質を溶出させ、目的のタンパク質を抗体ビーズを用いて回収し、その際に一緒に取れてきたタンパク質を相互作用因子として同定する。しかし、細胞を破碎することにより、細胞内で弱く接触していたタンパク質は解離する可能性が高く、また、別の場所で働いていたタンパク質

* Nobumasa HINO

1976年11月生まれ
 東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 博士後期課程(2005年)
 現在、大阪大学 大学院薬学研究科 講師 博士(理学)
 専門/分子生物学, ケミカルバイオロジー
 TEL: 06-6879-8176
 FAX: 06-6879-8179
 E-mail: hino@phs.osaka-u.ac.jp



が細胞外で接触する場合もある。そのため、タンパク質の本来の交友関係を知るには、細胞内での相互作用の「現場」をおさえる必要がある。

我々はこれまで、生きた細胞内で実際に生じているタンパク質間相互作用を解析できる「細胞内光クロスリンク法」という独自手法を開発してきた¹⁻³⁾。本稿では、その概要と応用研究について紹介する。

細胞内光クロスリンク法の開発

我々が開発した細胞内光クロスリンク法は、機能を調べたいタンパク質に光クロスリンカーと呼ばれる「鉗」を持たせ、細胞内で相互作用している他のタンパク質を捕捉する方法である (図2)。この鉗は光を照射した時のみ発動し、近傍に存在するタンパク質との間に強固な共有結合を速やかに形成する。すなわち、任意の時点で細胞内で実際に相互作用しているタンパク質どうしを光照射により固定化し、そのままの状態を取り出して解析することが可能になる。この方法の最もユニークな点は、注目するタンパク質にこの鉗を装備させるために、「21種類目のアミノ酸」を利用するところにある。

冒頭で少し触れたが、タンパク質はアミノ酸が繋がったポリペプチドという物質である。使用される20種類のアミノ酸は大腸菌のような単細胞生物から哺乳類のような高等生物まで共通であり、その並び順の違いにより様々な機能を持つタンパク質が生じる。この並び順を決める設計図が遺伝子である。遺伝子のDNA塩基配列はいったんmRNAに転写され、コドンと呼ばれる3塩基の並びがtRNAという分子により1つのアミノ酸に翻訳される。これらがリボソーム上で連結されることでタンパク質が合成される。どのコドンがどのアミノ酸をコード

するのかは、遺伝暗号表 (図2左) と呼ばれる全生物共通のルールブックによって厳密に定義されている (一部、例外はある)。つまり、タンパク質を構成するアミノ酸の種類を増やすには、このルールを改変し、いずれかのコドンに対して新たなアミノ酸をコードする必要がある。

実は、遺伝暗号表にはUAA, UAG, UGAという3つの空きコドン (終止コドン) が存在する。本来これらのコドンには、tRNAの代わりに翻訳終結因子と呼ばれるタンパク質が結合してポリペプチド合成を停止させるのだが、終止コドンに結合するtRNA、および、このtRNAに任意のアミノ酸を特異的に付加する酵素を細胞内に発現させることにより、21種類目のアミノ酸をコードすることができる (図2中央)。この際、望みの部位を終止コドンに置換した目的タンパク質の遺伝子を同時に発現させることで、人工アミノ酸を部位特異的に含むタンパク質が合成されるという仕組みである。この手法は、遺伝暗号拡張 (genetic code expansion) と呼ばれ、2000年代初頭に米 Scripps 研究所の Schultz⁴⁾ や理化学研究所の横山⁵⁾ らによって生きた大腸菌や哺乳類細胞内で達成された。以降、様々なアミノ酸を認識する酵素が開発され、現在では150を超える人工アミノ酸が利用できるようになっている⁶⁾。

細胞内光クロスリンク法の実際

筆者らは、遺伝暗号拡張技術を用い、光クロスリンカーとして機能する複数の人工アミノ酸を哺乳類細胞内でタンパク質に導入し、細胞内で相互作用するタンパク質どうしをクロスリンクすることに成功している^{1,2,7-9)}。

この細胞内光クロスリンク法のメリットは、①強

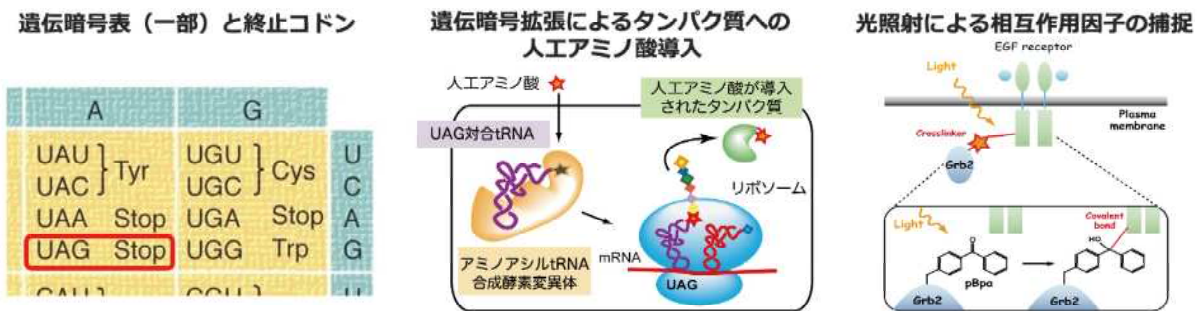


図2 遺伝暗号拡張によるタンパク質への人工アミノ酸導入と細胞内光クロスリンク法の概要。ここでは、終止コドンのひとつであるUAGコドンに対し、光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸pBpaを導入している。

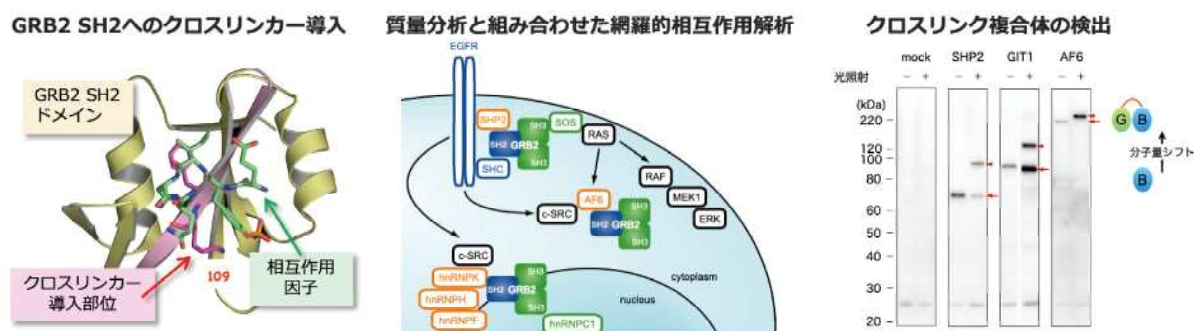


図3 細胞内光クロスリンク法による GRB2 相互作用因子の同定。(左) クロスリンカーは SH2 ドメインと呼ばれる構造領域に導入した。(中央) 同定した既知相互作用因子を青、新規因子をオレンジで示した。(右) クロスリンクの形成はシフトバンド(矢頭)を指標に明確に判断できる。

固な共有結合を形成させることにより、一過性の弱い相互作用を捕捉できる、②狙った部位に人工アミノ酸を導入することにより、タンパク質間の相互作用領域についての情報が得られる、③細胞内で反応させるため、クロスリンクの形成自体が細胞内で実際に相互作用していたことの証左となる、などが挙げられる。筆者らは実際に、様々なシグナル伝達を媒介するタンパク質 GRB2 にクロスリンカーを導入することにより、多様な新規相互作用タンパク質の同定に成功した⁷⁾。まず、GRB2 の立体構造から、他のタンパク質の認識部位の近傍に存在し、かつ、その結合を阻害しないと考えられる部位を選択した(図3左)。この部位にクロスリンカーを導入した GRB2 を細胞に発現させ、光を照射することにより相互作用因子を捕捉し、それらを質量分析によって解析した。その結果、EGF 受容体や SHP2 といった既知の相互作用因子に加え、機能的な関連が報告されていなかった複数の新規相互作用因子が同定された(図3中央)。また、複合体を電気泳動によって分子量に従って分離し、ウエスタンブロット法を用いて検出したところ、光照射した細胞サンプルでのみ高分子側にシフトするバンドが得られた。これらのバンドは、GRB2 タンパク質とその相互作用因子の分子量を足し合わせた位置に生じており、両者が共有結合により強固に結合し、一つのタンパク質のように振る舞った結果である。以上の結果から、これらのタンパク質が GRB2 と細胞内で相互作用することを明らかにできた。

おわりに

近年の質量分析機器の高感度化に伴い、試料中に

含まれるごくわずかなタンパク質を同定することが可能になり、インタラクトーム解析と呼ばれる大規模なタンパク質間相互作用解析が行われるようになってきている。しかし、膨大なデータの中から非特異的なものを排除し、特定の生理現象や疾患に関わる機能的に重要な相互作用を発見するプロセスは確立されていない。筆者らが開発した細胞内光クロスリンク法を用いれば、細胞内で実際に生じるタンパク質間相互作用を基盤とする信頼性の高いデータセットを取得できることから、個々の相互作用の機能解明プロセスは大いに加速すると考えられる。現在我々は、多くのがん患者で変異が見られるタンパク質に着目し、その変異部位で生じる相互作用を細胞内光クロスリンク法を用いて集中的に解析することで、がん変異により異常をきたすタンパク質間相互作用を効率的に同定する手法の開発を進めている。このような解析手法の整備は、がんやその他の遺伝子変異疾患の克服に向けた重要な布石になると期待している。

参考文献

1. Hino N. et al. *Nat. Methods* 2, 201-6 (2005).
2. Hino N. et al. *Nat. Protocols* 1, 2957-62 (2006).
3. 樋野展正, 薬学雑誌, 135, 1357-63 (2015).
4. Wang L. et al. *Science*, 292, 498-500 (2001).
5. Sakamoto K. et al. *Nuc. Acids. Res.*, 30, 4692-9 (2002).
6. Dumas A. et al. *Chem. Sci.*, 6, 50-69 (2015)
7. Hino N., *J. Mol. Biol.* 406, 343-53 (2011).
8. Yanagisawa T., *Mol. Biosyst.*, 8, 1131-5 (2012).
9. Kita A., et al. *Sci. Rep.* 6, 36946 (2016).