

## 細胞内で起きているタンパク質間相互作用をつかまえる

樋野 展正

タンパク質間相互作用というワードをGoogleで検索すると、無数の円が直線で結ばれた相互作用マップがいくつもヒットする。これを見ると、細胞内で形成されるタンパク質間相互作用ネットワークはほぼ明らかにされたような錯覚に陥るが、事はそう単純ではない。なぜなら、細胞内プロセスの調節に重要な局所的かつ一過的なタンパク質間相互作用は、現在の解析手法ではまだ十分に捉えられていないからである。たとえば、相互作用解析のゴールドスタンダードである共免疫沈降法では、研究対象とするタンパク質とその結合相手により形成される複合体を細胞から単離し、その構成成分を調べることによって相互作用因子を同定する。しかし、細胞内で一過的に形成される複合体は精製時に容易に解離するし、細胞破碎により細胞内区画が失われることで本来出会わないはずのタンパク質が複合体を形成するといった問題点があり、時空間的な情報を反映した相互作用解析には未だ高いハードルが存在する。

そこで、複合体を単離するのではなく、細胞内で互いにごく近傍に存在するタンパク質を相互作用したものとして解析する近接依存的標識 (proximity labeling: PL) 法が開発された。Burkeらのグループによって開発されたBioID<sup>1)</sup>では、研究対象とするタンパク質の末端に大腸菌由来のビオチンリガーゼ改変体BirA\*を融合して細胞内に発現させる。この細胞にビオチンを添加するとBirA\*は自身の周辺約10 nmに存在するタンパク質に限定的にビオチンを付加する。つまり、ビオチン標識されたタンパク質が、細胞内で対象タンパク質と近接して存在していた、すなわち、相互作用していたタンパク質ということになる。タンパク質の粒子径は数~十数nmなので、10 nmという距離は相互作用したと言って良いほどに十分近接している。ビオチン標識されたタンパク質はストレプトアビジン担体によって容易に単離でき、質量分析法により同定することができる。これを利用し、マウス脳内にBirA\*融合タンパク質を発現させて生きた個体の神経細胞内で生じるタンパク質間相互作用を解析したという報告もある<sup>2)</sup>。さらにTingらのグループは、徹底的な改変によりBirAの活性を高めることで、従来は18時間以上要していた相互作用タンパク質のビオチン標識を10分で行うことができるTurboIDという手法の開発に成功した<sup>3)</sup>。

一方で、光クロスリンカーと呼ばれるタンパク質架橋

剤を用いて細胞内で生じるタンパク質複合体を安定化することにより、共免疫沈降法の弱点を克服しようとする試みもなされている。光クロスリンカーとは、UV光に応答して活性化し、自身の周辺数nm以内に存在するタンパク質と共有結合を形成する低分子化合物である。本法では通常、分子内のもう一つの反応基を介してタンパク質表面のリジン残基等を標識しておき、必要なタイミングでUVを照射することによりその時点で相互作用しているタンパク質を捕捉する。しかし、このような化合物を細胞に加えると、当然ながらほとんどのタンパク質と無作為に結合してしまう。

そこで、光クロスリンカーとして働く官能基を側鎖に持つアミノ酸を人工的に合成し、目的とするタンパク質に特異的に取り込ませるという手法が開発された<sup>4,5)</sup>。このような人工アミノ酸の部位特異的導入系の開発にはそれをコードするための遺伝暗号の改変が必要なのだが、実際の使用に際しては、人工アミノ酸導入部位をTAG配列で指定した目的遺伝子、UAGコドンと対合するtRNA遺伝子、および、このtRNAに人工アミノ酸を結合させるアミノアシルtRNA合成酵素遺伝子の3つを細胞に導入するだけで良い。その後、培地中に人工アミノ酸を添加すれば光クロスリンカーを含有する目的タンパク質が発現し、細胞にUVを照射することで相互作用因子との間に共有結合が形成される。この手法の利点は、10分程度のUV照射で反応が完了するという時間分解能と、クロスリンカー導入部位近傍で生じる相互作用を特異的に捉えるという高い空間分解能にあり、刺激依存的な相互作用変化の追跡や相互作用部位の同定が可能になっている。

質量分析機器の高感度化とデータベースの拡充により試料中に含まれる微量のタンパク質を同定できる時代が到来し、タンパク質間相互作用ネットワークの解析例は加速度的に増えている。今後、細胞内で実際に起きている局所的かつ一過的な相互作用を捉える手法はますます重要になってくると思われる。

- 1) Roux, K. J. *et al.*: *J. Cell. Biol.*, **196**, 801 (2012).
- 2) Uezu, A. *et al.*: *Science*, **353**, 1123 (2016).
- 3) Branon, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **36**, 880 (2018).
- 4) Hino, N. *et al.*: *Nat. Methods*, **2**, 201 (2005).
- 5) 樋野展正: *YAKUGAKU ZASSHI*, **135**, 1357 (2015).