

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14461

研究課題名(和文) SXP-MS 解析法の確立と応用

研究課題名(英文) Establishment and application of SXP-MS analysis

研究代表者

増本 博司(MASUMOTO, Hiroshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：80423151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体標識とタンパク間架橋剤を併用することで弱いタンパク間相互作用も同定・定量化する新しいIMS解析法(SILAC-X-linking-protein purification-Mass spectrometry: SXP-MS)の開発を試みたが、化学架橋剤処理が引き起こす膨大な非特異的なタンパク間結合により断念した。  
代用法として結合するタンパクをビオチン化するBioID法を酵母に導入し、標的タンパクと相互作用するタンパク群の同定に利用できた。またタンパク発現用の新しいゲノム編集技術としてCRISPR/Transposon gene integration (CRITGI)法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We tried to explore novel protein analysis combined with SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in cell culture) and chemical crosslinking to identify the components in protein complex named as SILAC-X-linking-protein purification-Mass spectrometry (SXP-MS). However, SXP-MS did not work well to identify proteins because of a huge number of contaminated proteins caused by cross-linking.

To substitute SXP-MS analysis, we applied BioID method in budding yeast to identify the interacting factors by biotinylation. This method was applicable for protein identification. During this research, we have developed the novel genome editing technology named as CRISPR/Transposon gene integration (CRITGI) to achieve the protein overexpression as a by-product.

研究分野：分子生物学

キーワード：質量分析 タンパク同定 タンパクの安定同位体標識 タンパクのビオチン化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

質量分析法 (Mass spectrometry 法, 以下 MS 解析) は生体高分子であるペプチドあるいは糖、アミノ酸、各種ヌクレオチドなどの代謝産物の質量電荷比を求め既知物質の同定、および未知の生体高分子の構造決定に使われる手法である。MS 解析を用いたタンパク質の大規模解析 (プロテオーム解析) において 2002 年に登場した SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in cell culture) 法は細胞内タンパクを異なる質量のアミノ酸で置き換えることにより二細胞間の数千種類のタンパクを網羅的に定量比較することを可能にした (引用文献 1)。

SILAC 法の利用と MS 機器の検出性能の向上、大量の MS データの解析用ソフトウェアの機能向上により、MS の大規模データを短時間で処理することが可能となった現在、大腸菌などのバクテリアからヒトの培養細胞に到る様々な生物種において細胞外刺激を受け変動する細胞内のタンパク量やタンパクへの翻訳後修飾を網羅的に決定するプロテオーム解析が可能となった。しかしながら、現在の生化学的解析手法では検出できない弱い相互作用で複合体を形成するタンパク群も同定できる新しい研究手法を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

SILAC 法を組み合わせた MS 解析は細胞外刺激を受け、細胞内存在量が変動するタンパク、翻訳後修飾の付加あるいは消失を網羅的に同定・定量できる。本申請では SILAC 法とタンパク間架橋剤を併用することで弱いタンパク間相互作用も同定・定量化する新しい MS 解析法 (SILAC-X-linking-protein purification-Mass spectrometry: SXP-MS) を開発する。

## 3. 研究の方法

研究には申請者が長年研究モデルとしてきた出芽酵母を利用する。出芽酵母を使った SILAC 法による異なる安定同位体によるタンパク内のアミノ酸標識は既出の手法に従う (引用文献 2)。

SILAC 法に続き化学架橋剤を使ったタンパク架橋法を既に申請者は確立している (引用文献 3)。タンパク間架橋にはタンパク内のリジン側鎖間と結合させ、その分子中間点にジスルフィド結合を持つ Pierces 社の DSP (Dithiobis[succinimidyl propionate]) をはじめとした分子腕長が異なる架橋剤を使用する。

MS 解析には大量のタンパクペプチドを解析するために微量サンプル解析用の液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography: LC) と MALDI-TOF/MS を組み合わせた LC-MALDI を使用し、安定同位体を使ったタンパクペプチドの定量・比較用に、MAXquant, Andromeda の両解析ソフトを使用予定である。複合体を形成することが明らかなタンパク因子群を材料に SILAC 法 + 架橋剤処理 + 複合体精製を経て MS 解析によってタンパク複合体を検出する SXP-MS 解析手法を確立する。

## 4. 研究成果

(1) SXP-MS 法が可能かどうか調べるために、化学架橋剤 DSP で出芽酵母細胞を処理し、細胞抽出液を調製した。エピトープタグと結合する抗体を用いた免疫沈降法により、標的タンパクおよび架橋剤で架橋された結合タンパクを単離した。単離したタンパク群は SDS-PAGE で分離し、タンパク染色後に標的タンパクと結合しているタンパク群を同定、質量分析による解析を試みた。まず架橋剤処理した細胞抽出液を使用すると免疫沈降法による標的タンパクの沈降量は、架橋剤なしの細胞抽出液に比べ著しく減少した。さらに架橋剤の使用によって、明らかに非特異的に結合しているタンパクにより、標的タンパクと

特異的に結合しているタンパクが確認しづら問題が起こった。確認できた特異的に結合しているタンパクバンドを切り出し、質量分析によるタンパク同定を試みたが、高い m/z シグナルノイズのため、タンパクの同定に至らなかった。

(2) 架橋剤によるタンパク複合体同定とは別の手法として、結合または近接したタンパク群をビオチン化酵素 BirA によってビオチン化標識する BIO-ID 法を出芽酵母に導入した。本手法により NAD<sup>+</sup>依存性デアセチラーゼ Hst3-BirA の融合タンパクを出芽酵母内で発現し、HST3 タンパクと接触し、ビオチン化されるタンパクとして幾つかの解糖系代謝酵素 Hxk1, Sah1 が質量分析で同定された。しかしながら出芽酵母内で自己ビオチン化されるタンパクが多すぎるため、酵母を使った複合体同定では質量分析方法を注意深く行う必要がある。この研究の過程で、SDS-PAGE 内で展開したタンパク群を一括して同定する技術を開発し、発表論文(雑誌論文) 2, 3, 4 にて発表している。

(3) 本研究の関連技術として標的タンパクの大量発現を行うためのゲノム編集技術として、CRISPR/Cas9 を使い出芽酵母染色体レトロトランスポゾン Ty1 に遺伝子を導入する CRISPR/Transposon gene integration (CRITGI)を開発した。このゲノム編集技術はタンパクの大量発現だけでなく、特定のアミノ酸の培地への添加によって導入遺伝子の転写制御を行うことができた。既に特許出願を行なっている(名称:多重遺伝子導入手法)。

#### <引用文献>

1. Ong, S.E. et al. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-86 (2002).
2. Henriksen, P. et al. *Mol Cell*

*Proteomics* 11, 1510-22 (2012).

3. Masumoto, H., et al., *Mol. Cell. Biol.* 20, 2809-2817, 2000.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Masumoto H, Matsuyama S. The combination of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase gene deletion and the interruption of gluconeogenesis causes increased glucose metabolism in budding yeast. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194942. doi: 10.1371/journal.pone.0194942. (査読有)
2. Shimamoto Y, Tamura S, Masumoto H, Maeshima K. Nucleosome-nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity. *Mol Biol Cell*. 2017;28(11):1580-9. doi: 10.1091/mbc.E16-11-0783. (査読有)
3. Kubo Y, Masumoto H, Izumida M, Kakoki K, Hayashi H, Matsuyama T. Rab3a-Bound CD63 Is Degraded and Rab3a-Free CD63 Is Incorporated into HIV-1 Particles. *Front Microbiol*. 2017;8:1653. doi: 10.3389/fmicb.2017.01653. (査読有)
4. Ota Y, Chinen T, Yoshida K, Kudo S, Nagumo Y, Shiwa Y, Yamada, R. Umihara, H. Iwasaki, K. Masumoto, H. Yokoshima, S. Yoshikawa, H. Fukuyama, T. Kobayashi, J. Usui, T. Eudistomin C, an Antitumor and Antiviral Natural Product, Targets 40S Ribosome and Inhibits Protein Translation.

*Chembiochem.* 2016;17(17):1616-20.  
doi: 10.1002/cbic.201600075. ( 査読  
有 )

5. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;199:69-75. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.01.040. ( 査読  
有 )

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

1. 増本博司、 「 CRISPR/Transposon gene integration(CRITGI) : 代謝システム  
の移植のための染色体への大規模  
遺伝子導入法 」、 2017 年生命科学系  
学会合同年次大会、 2017 年
2. 増本博司、 「 CRISPR/Transposon gene  
integration(CRITGI)による染色体へ  
の遺伝子導入法の確立 」、 第 50 回酵母  
遺伝学フォーラム、 2017 年
3. 増本博司、 「 CRISPR/TRANSPOSON System  
による細胞機能モジュール移植技術の  
確立 」、 酵母研究ルネサンス 2016、 2016  
年
4. 増本博司、 「 質量分析を使った新しい  
タンパク解析の紹介 」、 日本遺伝学会  
第 88 回大会、 2016 年
5. 増本博司、 「 出芽酵母サーチュイン欠損  
および糖新生経路の遮断は解糖系の二  
次代謝産物の増産を起こす 」、 第 49 回  
酵母遺伝学フォーラム、 2016 年
6. 増本博司、 「 CRISPR/Transposon gene  
integration(CRITGI)による染色体  
へのプラスミド導入法の確立 」、 第  
9 回 HiHA ワークショップ、 2016 年

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 1 件 )

名称 : 多重遺伝子導入手法  
発明者 : 増本博司  
権利者 : 長崎大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2017-097706  
出願年月日 : 2017.5.16  
国内外の別 : 国内

取得状況 ( 計 1 件 )

名称 : 遺伝子欠損エタノール生産菌  
発明者 : 増本博司  
権利者 : 長崎大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2014-051675  
取得年月日 : 2018.1.19  
国内外の別 : 国内

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/brsc/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

増本 博司 ( MASUMOTO, Hiroshi )

長崎大学・医歯薬学総合研究科 ( 医学系 )  
・講師

研究者番号 : 80423151