

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05745

研究課題名(和文) 多対多インタラクトーム技術による宿主微生物相互作用の分子生物学的基盤の探求

研究課題名(英文) Exploring the molecular biological basis of host-microbe interactions through many-to-many interactome technology.

研究代表者

矢崎 潤史 (Yazaki, Junshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70391597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規ラベルフリー多対多インタラクトーム技術、HaloTagNAPPA-MSを構築し、これまで不可能な細胞内分子複合体相互作用の一斉解析を行った。鋳型DNAから蛋白質発現・捕捉した固相上の蛋白質に対し、ラベルフリーなヒト培養細胞ライセートを相互作用させ、質量分析による複合体の検出を行ったところ、陽性区画と共に数百種類の新規相互作用が検出された。評価実験では36%の再現性が確認された。陽性区画との比較フィッシャー正確性検定ではP値が、0.0319となり、 $P(0.05)$ で相似した結果となり、本技術のProof of conceptとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HaloTagNAPPA-MSの利用で、まだ20程度のクエリであるにも拘らず、巨大な細胞内分子複合体コミュニケーション地図が構築された。この地図はこれまでにない学術的に卓越した成果である。この技術は今後ヒト共生微生物・感染菌の分泌分子群のネットワーク地図構築にも利用され新規疾患標的因子や新規薬用成分の一斉同定を可能にすることから、社会的意義が高い。それら結果を利用した新微生物薬品・健康食品・治療法開発などの社会的インパクトが期待される。これまで得られた結果は、既存技術に対する優位性、対費用効果の高さ、などから学術的・社会的インパクトが大きい。

研究成果の概要(英文)：A novel label-free multiplex interactome technology, HaloTagNAPPA-MS, was constructed for simultaneous analysis of intracellular molecular complex interactions, which was not possible before. Label-free human cultured cell lysates were interacted with proteins on the solid phase, which were expressed and captured from template DNA, and the complexes were detected by mass spectrometry. Evaluation experiments showed a 36% reproducibility. A Fisher exact test compared to the positive compartment showed a P value of 0.0319, which is similar at $P(0.05)$ and is a Proof of concept for this technology.

研究分野：ネットワークバイオロジー

キーワード：インタラクトーム プロテオーム 複合体相互作用

1. 研究開始当初の背景

過去半世紀以上にわたり、細胞内で機能的に相互作用する分子の複合的ネットワークを構成する因子の同定(特に蛋白間相互作用)、そしてその細胞内ネットワークにより様々な状況にตอบสนองする生物学的プロセスに関わる分子メカニズムの解明が行われてきた。しかしこれまでの系統的ネットワーク検出は1対1(蛋白アレイ、網羅的ツーハイブリット法: HT-Y2H、ELISA)もしくは1対多(免沈質量分析: IP-MS)の高コスト・低スループット技術で行われてきた。最近報告された新規 Y2H 法 (Cre-Y2H 等) は多対多で検定可能だが得られる結果は1対1である。これらの手法はサンプル調製が困難・生体試料の使用が不可能・網羅性等に制限がある。

2. 研究の目的

分子間相互作用解析において、鍵となる蛋白に相互作用する細胞内外の分子複合体の一斉検出技術の構築は重要な解決課題であるが、これまで確立されていない。本研究ではラベルフリー多対多インタラクトーム技術、HaloTagNAPPA-MSを構築し、これまで不可能な細胞内分子複合体相互作用や宿主-微生物間の分子相互作用一斉解析を行う

3. 研究の方法

研究1: 小スケール HaloTagNAPPA-MS による既知蛋白間相互作用の多対多検出

研究2: 初年度の ORF 数を増やし、50対50の相互作用実験を行い、正確確率検定で有意に相互作用を検出できるか検定する。

研究3: 生体試料を用いた分子間相互作用の多対多検出を用いて正確性を検定する。

4. 研究成果

研究1: 鋳型 DNA から蛋白質発現・捕捉した固相上(ガラス基板を96ウェルプレートに変更)の蛋白質に対し、ラベルフリーなヒト培養細胞ライセートを相互作用させ、質量分析による複合体の検出を行った(コントロール実験)。このために固定する蛋白質を合成するための鋳型となる ORF-DNA を20種類程度作製・準備した。これら鋳型となる ORF-DNA から発現される蛋白質はすべて、その相互作用蛋白質が既知であり、研究実施者の論文(Nature Methods 2009)においてキュレーション済の ORF セットの一部である。キュレーションにおいては複数の論文もしくは複数の相互作用実験手法により相互作用がポジティブであったものをコントロール ORF セットとして選択している。これら鋳型 ORF-DNA は固相上で蛋白発現・固定しクエリとして約9000種類の蛋白が含まれる heLa 細胞ライセートとの相互作用実験に用い、複数の既知・新規の相互作用が検出された。これらの一部は評価実験に供され、評価に用いた30ペアの相互作用中、36%の再現性が確認された。陽性コントロールとの比較によるフィッシャー正確性検定により P 値が、0.0319 となり、陽性コントロールと P (0.05) において相似した結果となった。P (0.01) のスレシヨルドの場合には有意差があると考えられるが、これは陽性コントロールが1対1の相互作用検出、本技術は多対多で複合体を検出する技術であることに起因すると考えられた。本申請の目的である20対9000の多対多相互作用技術の proof of concept となった。

研究 2、研究 3：上記で使用したコントロールのクエリの一部（5 種類）を使用し異なる複数の細胞（脂肪細胞、前駆脂肪細胞、HEK 細胞、Hela 細胞）を利用した細胞内相互作用を検出した。各細胞には平均約 8000 種類の蛋白質が含まれ、5 対 32000、合計 16 万回の多対多相互作用検出を行った。この結果、各細胞種特異的な細胞内相互作用が多数検出され、本技術の有用性が示された。特に糖尿病や動脈硬化症でよく知られた相互作用 ATF3-CEBPB が脂肪細胞特異的に検出され、本技術の有用性の高さを示した。現在このクエリの数 を 100 種類まで増やし、前述の細胞種を用いて特異的相互作用検出を行っている。100 対 32000、合計 320 万回の多対多相互作用検出を進めている。この後、様々な微生物の分泌液を利用し相互作用検出を行う。上記進捗と並行して蛋白質を固相に効率よく固定するため、一本鎖 DNA を利用する方法を開発した。上記 ORF-DNA を鋳型に合成した蛋白質に、バーコードと呼ばれる人工合成した既知配列の一本鎖 DNA をクリックケミストリーを介し結合させ、この結合させた DNA を利用しリンクした蛋白質を固相に固定する技術である（蛋白バーコード法）。この方法とその利用は以下の論文で報告され、今後の固相への蛋白質固定に利用される予定である。

- 1) “Novel protein-oligonucleotide conjugation method involving a high-affinity capture HaloTag” Yazaki, J *(2020). *Bio-protocol* 10 (18), September 20, 2020 *1st and Corresponding author
- 2) “HaloTag-based conjugation of proteins to barcoding-oligonucleotides” Yazaki et al (2020). *Nucleic Acids Research* 48 (2), e8-e8 *1st and Corresponding author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yazaki Junshi, Kawashima Yusuke, Ogawa Taisaku, Kobayashi Atsuo, Okoshi Mayu, Watanabe Takashi, Yoshida Suguru, Kii Isao, Egami Shohei, Amagai Masayuki, Hosoya Takamitsu, Shiroguchi Katsuyuki, Ohara Osamu	4. 巻 48
2. 論文標題 HaloTag-based conjugation of proteins to barcoding-oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e8 ~ e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yazaki Junshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Protein-oligonucleotide Conjugation Method Involving a High-affinity Capture HaloTag	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3759 ~ e3759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Junshi Yazaki ¹ , Yusuke Kawashima ¹ , Taisaku Ogawa ² , Atsuo Kobayashi ¹ , Mayu Okoshi ¹ , Takashi Watanabe ¹ , Suguru Yoshida ³ , Isao Kii ⁴ , Shohei Egami ^{5,6} , Masayuki Amagai ^{5,6} , Takamitsu Hosoya ^{3,7} , Katsuyuki Shiroguchi ^{2,8,9} and Osamu Ohara ¹
2. 発表標題 Development of a HaloTag-Based, NAPPA and Barcoding, Protein Profiling Technology
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junshi Yazaki ¹ , Yusuke Kawashima ¹ , Taisaku Ogawa ² , Atsuo Kobayashi ¹ , Mayu Okoshi ¹ , Takashi Watanabe ¹ , Suguru Yoshida ³ , Isao Kii ⁴ , Shohei Egami ^{5,6} , Masayuki Amagai ^{5,6} , Takamitsu Hosoya ^{3,7} , Katsuyuki Shiroguchi ^{2,8,9} and Osamu Ohara ¹
2. 発表標題 親和性キャプチャータグ HaloTag をいた新規のタンパク質-オリゴDNA結合法
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

DNAバーコーディングによるタンパク質のデジタル定量法 - より高感度なタンパク質定量が可能に -
https://www.riken.jp/press/2019/20191129_3/index.html
DNA-tagging method to detect of disease signatures
https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20200221_3/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川島 祐介 (Kawashima Yusuke) (30588124)	公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・ユニット長 (82508)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------