

平成23年 5月31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21770195

研究課題名(和文)

光クロスリンク法によるタンパク質間相互作用ネットワークの解析

研究課題名(英文)

Analysis of protein interaction networks by photo-cross-linking

研究代表者

佐藤 文 (SATO AYA)

独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・特別研究員

研究者番号： 30469902

研究成果の概要(和文)：

「光クロスリンク法」は、生細胞中で形成されているタンパク質複合体を安定化して単離し、解析することのできる新しい研究手法である。本研究では、光クロスリンク法をタンパク質間相互作用ネットワークの解明に応用することを目的として、数種類のタンパク質結合ドメインについて光クロスリンカーを導入する適切な位置を特定し、その知見を収集することができた。さらに、光クロスリンク法により架橋したタンパク質複合体の結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：

"The photo-cross-linking method" is the new technique that can stabilize protein complexes formed in living cells to isolate and analyze them. In this study, I identified the efficient positions to incorporate photo-cross-linkers in several protein-binding domains for the purpose of applying the photo-cross-linking method to the elucidation of the protein interaction networks.

Furthermore, I succeeded in the crystallographic study of the cross-linked protein complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：蛋白質、光クロスリンク、非天然型アミノ酸、分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

「光クロスリンク法」は、生細胞中で形成されているタンパク質複合体を安定化して単離し、解

析することのできる新しい研究手法である。光クロスリンク法では、クロスリンカーとして働く「非天然型アミノ酸」を、生細胞中で研究対象とするタンパク質に部位特異的に導入する。そして細胞に光を照射することによって相互作用しているタンパク質との間に共有結合を形成させ、安定化した複合体を細胞より抽出・精製することができる。

光クロスリンク法を用いることで、これまで見逃されてきたような相互作用や、未知の相互作用因子の同定が可能になると期待できた。実際に、研究代表者の所属する研究チームでは、動物細胞において非天然型アミノ酸をタンパク質に導入することに成功し、光クロスリンク法が細胞質中でのタンパク質間相互作用解析に有用であることを示した (*Nat. Methods* **2**, 201-6, 2005; *Nat. Protoc.* **1**, 2957-62, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、光クロスリンク法をタンパク質間相互作用ネットワークの解明に応用することを目的とする。

光クロスリンク法を効果的に活用するためには、タンパク質上のどの位置にクロスリンカーを導入するかが重要となる。すなわち、研究対象とするタンパク質と他のタンパク質とが相互作用する領域にうまくクロスリンカーを導入することが必要である。ヒトなどのタンパク質の多くはマルチ・ドメイン構成をとっているため、それぞれのドメインについて、クロスリンカーを導入する適切な部位がわかれば、ドメイン毎に相互作用する相手タンパク質を区別して捕捉することができる。また、1種類のドメインは、複数種のタンパク質に現れるので、あるタンパク質結合ドメインについてリンカー導入位置が判明すれば、他の多数のタンパク質に応用が可能になる。

そこで、本研究では、複数種類のタンパク質結合ドメインについて光クロスリンカーを導入する適切な位置を特定し、その知見を収集する。また、その知見をもとに細胞内でこれらのドメインが結合するタンパク質の同定を行う。

3. 研究の方法

非天然型アミノ酸をタンパク質に部位特異的に導入するには、まず、動物細胞内で、原核生物由来の非天然型アミノ酸を特異的

に認識するよう改変されたアミノアシル tRNA 合成酵素 (以下, aaRS) とサプレッサー tRNA を発現させ、目的の部位をアンバーコドンに置換した遺伝子を導入しておく。培地中に非天然型アミノ酸を添加しておく、細胞中に取り込まれ、aaRS 変異体の働きでサプレッサー tRNA に結合する。この tRNA はアンバーコドンを認識し、目的タンパク質の遺伝子中に挿入されたこのコドンに対応して非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する。

大腸菌で非天然型アミノ酸をタンパク質に組み込むには、古細菌の変異型 aaRS と tRNA を大腸菌内で発現させればよい。

本研究では、複数種類のタンパク質結合ドメインについて光クロスリンカーを導入する適切な位置を特定し、その知見を集めることで、光クロスリンク法をタンパク質間相互作用ネットワークの解明に効果的に活用できるようにする。具体的には、①ガンキリンのアンキリンリピートドメイン、② p120RasGAP の SH3 ドメイン、③ Rap2-interacting protein x (RPIP_x) の RUN ドメインの3つの例を取り上げて、光クロスリンカーを導入すべき部位を特定する。

肝臓がん遺伝子産物であるガンキリンでは、タンパク質分解を行う 26S プロテアソームのサブユニット S6 ATPase ドメインとの複合体を解析に用いる。この複合体はすでに結晶構造が解明されているので (*Structure* **15**, 179-189, 2007)、もとの立体構造と比較することで光クロスリンカーを導入した場合にタンパク質構造に影響がないかを確認できる。

p120RasGAP の SH3 ドメイン、RPIP_x の RUN ドメインはそれぞれ Aurora キナーゼ (*J. Biol. Chem.* **277**, 23742-23746, 2002)、Rap2B (*J. Biol. Chem.* **281**, 31843-31853, 2006) と結合することが報告されているが、結合部位はわかっていない。これらのドメインは、シグナル伝達系のタンパク質に頻出するドメインであり、タンパク質間相互作用ネットワークを解明するのに極めて有用だと考えられる。また、これらの複合体を光クロスリンク法によって解析することで、結合部位の解明、さらには安定な複合体の調製によって構造解析へとつながると考えられる。

4. 研究成果

2009年度は、まず、当研究チームで使われていたパラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) とトリフルオロメチルジアジリニルフェニルアラニン (Tmd-Phe) に加え、アジドフェニルアラニン (AzPhe) とアジドゼットリジン (Az-Z-Lys) を光クロスリンカーとして実用化することに成功した。

そして、すでに複合体の結晶構造が解明されているガンキリンのアンキリンリピートドメインとS6 ATPaseについて、結合部位を中心に40箇所程度光クロスリンカーの導入部位を選択し、アンバー・コドン変異体を作製、光クロスリンクの効率を比較した。この結果、それぞれの光クロスリンカーについて効率のよい導入箇所などの知見を集めることができ、光クロスリンク技術の実用性を向上させることができた。



図1 ガンキリンとS6 ATPase複合体のpBpaによる光クロスリンク効率

また、結合部位が解明されていないRap2-interacting protein x (RPIP_x)のRUNドメインとRap2Bについて、ドメイン全体にわたって30~40箇所程度クロスリンカーの導入部位を選択し、タンパク質複合体を細胞内で発現させ、光クロスリンクを行って、光クロスリンクがかかる箇所を特定することに成功した。これは、RUNドメインについて最適な光クロスリンカー導入部位を特定し、その知見を収集するとともに、光クロスリンク法を構造未知のタンパク質複合体のタンパク質間相互作用ネットワークの解明に応用できることを示している。

2010年度は、ガンキリンのアンキリンリピートドメインとS6 ATPaseについて、前年度に解明した、最も効率よくクロスリンクが生じる位置に光クロスリンカーであるパラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) を導入し、光を照射してタンパク質間に共有結合の架橋を形成させ、ガンキリン・S6 タンパク質の架橋複合体をX線結晶構造解析することに成功した (*Biochemistry* **50**, 250-257, 2011)。これは、光クロスリンク法がタンパク質間相互作用ネットワークを分子構造のレベルで解明するために有用であることを示している。

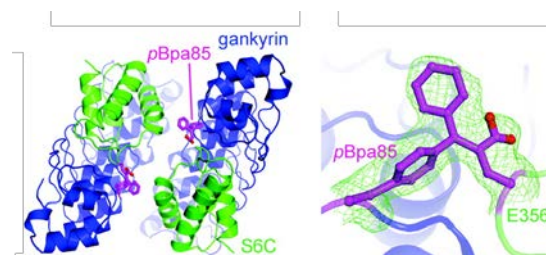


図2 ガンキリン/S6 ATPaseの立体構造解析

また、光クロスリンカーをはじめとする非天然型アミノ酸をタンパク質に部位特異的に導入する方法として、「RFゼロ」株を開発した。大腸菌において、7つの必須遺伝子とサプレッサー-tRNA 遺伝子を導入することで、終止コドンの1つであるUAGを認識する翻訳終結因子RF-1をノックアウトすることが可能となることを見出し、UAGコドンに非天然型アミノ酸をコード化することに成功した (*Nucleic Acids Research* **38**, 8188-8195, 2010)。これにより、非天然型アミノ酸をタンパク質の組み込む効率が飛躍的に高まり、また、多数の非天然型を1つのタンパク質に組み込むことも可能になった。

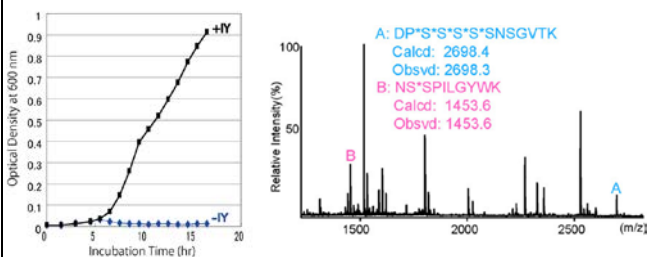


図3 RFゼロ株を用いたタンパク質への非天然型アミノ酸の導入

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3件)

- ① 樋野 展正、尾山 大明、佐藤 文、向井 崇人、伊良波 史枝、林 明子、秦 裕子、山本 雅、横山 茂之、坂本 健作

「Genetic Incorporation of a Photo-Crosslinkable Amino Acid Reveals Novel Protein Complexes with GRB2 in Mammalian Cells.」

Journal of molecular biology

406, 343-353, 2011

査読有

- ② 佐藤 心、三桝 信哉、佐藤 文、樋野 展正、坂本 健作、梅原 崇史、横山 茂之

「Crystallographic Study of a Site-Specifically Cross-Linked Protein Complex with a Genetically Incorporated Photoreactive Amino

Acid.」
Biochemistry
50, 250-257, 2011
査読有

③ 向井 崇人、林 明子、伊良波 史枝、佐藤 文、大竹 和正、横山 茂之、坂本 健作
「Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code.」
Nucleic Acids Research
38, 8188-8195, 2010
査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

① 佐藤 文、向井 崇人、林 明子、伊良波 史枝、大竹 和正、横山 茂之、坂本 健作
「大腸菌における RF-1 ノックアウトによる UAG コドンの再定義」
第 5 回 無細胞生命科学研究会
2010 年 9 月 29・30 日
岡山県岡山市

② 佐藤 文、坂本 健作、横山 茂之、大野 敏、横川 隆志、西川 一八
「サブプレッサー tRNA の改変による無細胞翻訳系における非天然型アミノ酸のタンパク質への導入効率の向上」
第 4 回 無細胞生命科学研究会
平成 21 年 11 月 16・17 日
岐阜県下呂市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://protein.gsc.riken.jp/sakamoto/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
佐藤 文 (SATO AYA)
独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・特別研究員
30469902
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者