様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ１６０１９

研究課題名（和文）in vivo インタラクトーム解析を革新する BioID マウスモデルの開発

研究課題名（英文）Development of BioID mouse models for an innovative in vivo interactome analysis

研究代表者
村田　知弥（Murata, Kazuya）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：６０７１３４８５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体内においてタンパク質は多様なタンパク質と相互作用して、細胞・組織機能を綿密に制御している。本研究では生体内タンパク質間相互作用を直接かつ網羅的に解析可能な新規マウスモデル（in vivo BioID）を開発し、その技術基盤の確立を行った。その結果、反復注射や化学溶媒を使用せずマウスへのストレスを軽減し、高効率に相互作用因子のビオチン化を可能とする新たなビオチンの投与法を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
in vivo BioIDは基礎生物学、分子生物学、医学など多岐にわたる分野で活用が見込まれる強力な研究ツールであり、本研究成果はin vivo BioIDの基盤となる新規ビオチン化誘導法を報告したものである。また、in vivo BioIDは各種組織における利用例が少ない状況であったが、脳や心臓、肝臓、精巣など幅広い組織で活用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Protein-protein interaction (PPI) has a critical role for the proper regulation of cellular and tissue functions. In this study, we have generated a novel BioID mouse model, which enables us to directly analyze PPI in vivo. We investigated an appropriate method for biotin administration and found that feeding a 0.5% biotin diet efficiently induced biotinylation of proximal proteins. This method can avoid unnecessary chemical solvent-induced biological changes and injection-related stresses in mice.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質間相互作用　in vivo BioID

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

近年のゲノム編集技術の発達により、遺伝子改変マウスが簡便かつ迅速に作製可能になり、*in vivo* におけるタンパク質の機能解析が飛躍的に進んでいる。遺伝子改変マウスを用いた解析は、目的とするタンパク質の欠損・変異などによる生体への影響を直接的に調べることが可能であるため、非常に重宝されている。一方で、生体内においてタンパク質が適切な場で、適切な時間に機能するためには、タンパク質同士の相互作用が必要不可欠であるが、*in vivo* で、目的とするタンパク質がどのようなタンパク質と相互作用し生体機能を調節しているか検証することは容易ではない。理由として、目的タンパクに対し非常に高い特異性が十分担保された、高品質な抗体が必要であることや、生体組織における目的タンパク質の発現が低く、質量分析によるタンパク同定に十分なタンパク量を確保できないことなどが挙げられる (Free RB., *et al. Curr. Protoc. Neurosci.* 2009)。そのため多くの研究において、タグ付きタンパク質の過剰発現系を用いた培養細胞株 (*in vitro*) での網羅的タンパク質間相互作用（インタラクトーム）解析が行われているが、生体組織と株化された培養細胞では環境が大きく異なるため、生体内における正確な相互作用を捉えることができない。加えて、インタラクトーム解析手法の問題点として、従来のような免疫沈降による解析では、酵素–基質のような一過性の相互作用を捉えられないという問題点がある。このように現在のところ、様々な種類のタンパク質に適用可能な、*in vivo* におけるインタラクトーム解析技術は十分に確立されていない。

２．研究の目的

そこで本研究では近位依存性ビオチンラベリング (BioID, Roux KJ. *et al. J. Cell. Biol.* 2012) という手法に着目した。本手法はビオチンリガーゼを融合した目的タンパク質を発現させることで、相互作用タンパク質をビオチン標識する手法である。その後、ビオチン化タンパクをアビジンビーズにより精製し、質量分析に供することで相互作用因子を網羅的に同定できる。本手法の重要な特徴は、相互作用因子を不可逆的にビオチン標識できる点であり、安定的な相互作用に加え、酵素–基質間の一過性の相互作用や、弱い相互作用も捉えることが可能である (Li P., *et al. Proteomics* 2017) 。また、タンパク精製の段階において、アビジンとビオチンの非常に強固な結合を利用するため、目的タンパクに対する抗体を用いる必要がない。さらに、未知の相互作用因子を同定できる可能性もあることから、これらのメリットを生かし、本研究では BioID ノックインマウスを作製し、*in vivo* インタラクトーム解析の基盤を確立することを目的とする。

３．研究の方法

(1) *in vivo* BioID assay の有用性を検証するため、概日リズム制御転写因子 BMAL1-ビオチンリガーゼ (BirA*) 融合遺伝子ノックインマウス（BMAL1-BioID マウス）を作製した。BMAL1 は生体内における相互作用因子が多数知られていること、様々な組織において機能すること、局在が核に限られることから、検証に適していると考えた。作製にはゲノム編集を用い、マウス内在 ROSA26 遺伝子座に BioID 発現コンストラクト (CAG promoter-BMAL1-BirA*-HA CDS) を挿入した（図１）。

(2) BMAL1-BioID マウスより線維芽細胞を調整し、*in vitro* において BMAL1-BirA* のビオチン化能について、ウエスタンブロット法により検証した。

(3) ビオチン投与により、*in vivo* における BMAL1 近傍タンパクのビオチン化誘導を試みた。投与法は７日間連続の皮下注射、または高ビオチン含有餌の７日間の自由摂食を用いた。その後組織を採材し、タンパク質のビオチン化についてウエスタンブロット法により検証した。

４．研究成果

(1) BMAL1-BioID マウス（図１）の脳、心臓、肝臓、腎臓、精巣などの組織を採材し、ウエスタンブロットにより BMAL1-BirA*-HA 融合タンパクの発現について検証した。抗 BMAL1 抗体による検出の結果、BMAL1-BioID マウスの各組織では内在性 BMAL1 タンパク

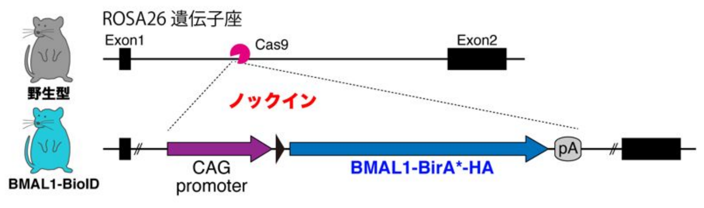

図 1. BMAL1-BioID ノックインマウス

に加え、高分子量側に野生型マウスでは見られないバンドが検出された。抗 HA 抗体による検出の結果、前述のバンドと同じ分子量にバンドが検出されたことから、BMAL1-BioID マウス組織において、BMAL1-BirA*-HA 融合タンパクの全長が発現していることが確認できた。

(2) BMAL1-BioID マウス線維芽細胞に対し、ビオチン 50μM を 24 時間処理、細胞を回収後、ウエスタンブロットを実施した。その結果、野生型マウス由来線維芽細胞ではビオチン化タンパク

の増加は認められなかったが、BMAL1-BioID マウス線維芽細胞では著しいビオチン化タンパクの増加が認められた（図２）。以上より、ノックインした BMAL1-BirA*-HA タンパクがビオチン化能を有していることが判明した。

(3) *in vivo* における BMAL1 近傍タンパクのビオチン化誘導について検証するため、はじめに、先行報告の方法を用いビオチンを投与した（Uezu A., *et al.* Science 2016）。BMAL1-BioID マウスに対し７日間連続でビオチンの皮下注射を実施したが、各組織において、ビオチン化タンパクの増加は認められなかった。これは先行報告に比べ、本研究のノックインマウスでは BirA*の発現量が少なく、ビオチン化タンパクの蓄積に十分なビオチンを供給できなかった可能性が考えられた。

そこで、持続的に体内のビオチン濃度を高く維持できる手法として、高ビオチン含有餌の自由摂食法を考案した。通常の餌もビオチンを含んでいるものの、その量はわずかであり、BMAL1-BioID マウスにおいてもビオチン化は誘導されない。一方で 0.5% のビオチンを含む餌を調整し、マウスに７日間与えたところ、BMAL1-BioID マウス組織においてビオチン化タンパクの蓄積が認められた（図３）。

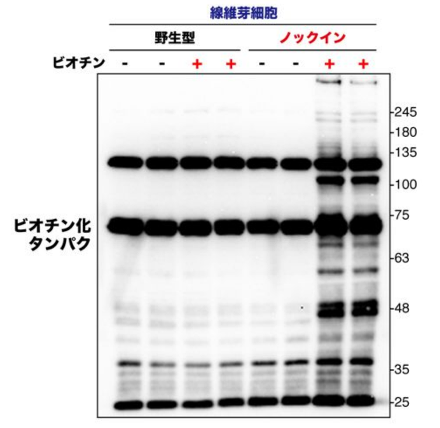

図 2. 線維芽細胞におけるタンパクビオチン化

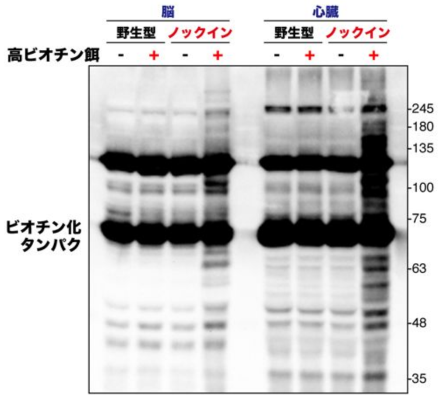

図 3. マウス組織におけるタンパクビオチン化

皮下注射によるビオチン化誘導法では、ビオチンの７日間の反復注射によるストレスや、溶媒である DMSO がタンパク質間相互作用に与える影響を避けられない。一方、本研究により考案したビオチン高含有餌の自由摂食による誘導法では、マウスに対するストレスを大幅に軽減し、かつ高効率な生体内ビオチン化誘導を可能とした。これらの結果は論文としてまとめ、すでに publish されている（Murata K. *et al. J. Biochem.* 2021）。

一方で、ビオチンリガーゼ BirA*は、その発現量次第では *in vivo* BioID においては活性が不十分であることが示唆された。そのため BioID2 や TurboID といったより高活性なビオチンリガーゼを用いることが *in vivo* BioID に適している可能性がある。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Murata Kazuya、Mimura Asuka、Suzuki Hayate、Mikami Natsuki、Hamada Yuko、Kato Kanako、Iki Natsumi、Ishida Miyuki、Daitoku Yoko、Tanimoto Yoko、Okiyoneda Tsukasa、Fujiyama Tomoyuki、Dinh Tra Thi Huong、Mizuno Seiya、Sugiyama Fumihiro	４．巻 170
２．論文標題 Efficient induction of proximity-dependent labelling by biotin feeding in BMAL1-BioID knock-in mice	５．発行年 2021年
３．雑誌名 The Journal of Biochemistry	６．最初と最後の頁 453～461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 村田知弥、大徳陽子、水野聖哉、杉山文博
２．発表標題 in vivo BioID による脳内USP46タンパク質ネットワークの同定
３．学会等名 第94回　日本生化学会大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 村田知弥、吉岡一真、西方圭那、橋本美涼、沖米田司、深水昭吉、海老原史樹文
２．発表標題 脳機能を制御する翻訳後修飾酵素のインタラクトーム解析
３．学会等名 第92回　日本生化学会大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 吉岡一真、村田知弥、西方圭那、沖米田司、海老原史樹文
２．発表標題 脱ユビキチン化酵素USP46のタンパク質間相互作用の網羅的解析
３．学会等名 日本遺伝学会　第91回大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 村田知弥、吉岡一真、西方圭那、杉山文博、沖米田司、海老原史樹文
２．発表標題 うつ様行動制御因子USP46の新規相互作用因子の同定と機能解析
３．学会等名 第66回　日本実験動物学会総会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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

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