

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22607

研究課題名（和文）新発想の転写因子解析：機能亢進型変異／低下型変異のプロキシミティラベリング解析

研究課題名（英文）Dissecting transcription factors using proximity labeling analyses

研究代表者

鳴海 覚志（Narumi, Satoshi）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長

研究者番号：40365317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：転写制御とは遺伝子機能のオン・オフを司る分子メカニズムであるが、どのような分子がその調節に関わるかについての理解は不十分であった。本研究では新技術の分子相互作用解析であるプロキシミティラベリング法を採用し、先天性疾患に関わる転写因子の解析を行った。その結果、従来から知られてきた分子相互作用に加えて、これまで知られていなかった相互作用を複数検出することができた。本研究を通じて、転写制御機構の研究におけるプロキシミティラベリング法の広汎な応用可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は転写制御機構研究におけるプロキシミティラベリング法の応用可能性の広さを示すと同時に、本研究の独自性である「野生型分子と変異型分子を比較解析」が転写制御機構研究の有用な切り口になることを示した。現在普及している「転写促進複合体」「転写抑制複合体」という二項対立モデルは適切ではなく、実際には両者が柔軟・可塑的に使い分けられている可能性があり、今後のこの研究分野における研究の方向性を示す成果と言える。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional regulation is a molecular mechanism that controls the turning on and off of gene functions, but understanding of which molecules are involved in this regulation is lacking. In this study, we employed proximity labeling analysis, a new technique to discover molecular interactions, to analyze transcription factors involved in congenital diseases. As a result, we detected several previously unknown interactions in addition to the previously known ones. This study demonstrates the broad applicability of proximity labeling analysis in the study of transcriptional regulatory mechanisms.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：転写 転写制御 プロキシミティラベリング 転写因子 変異 転写複合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性内分泌疾患の一部は内分泌器官特異的な転写因子の変異を病因とする。転写因子は標的遺伝子のプロモーター領域で転写複合体を形成するが、可逆的・可塑的な遺伝子発現調節の必要性から構成因子間の相互作用がゆるやかであると想定される。従来のタンパク質相互作用解析は安定的相互作用を前提とし、転写複合体全容解明には不十分である。本研究は従来法の限界を打破する新手法としてプロキシミティラベリング解析 (Proximity labelling analysis, PLA) に着目した。PLA は解析対象分子にビオチン付加酵素 TurboID を遺伝子工学的に付加し、生細胞内でビオチン化反応により対象分子から距離 10 nm 以内に位置するタンパク質群を標識する。この反応は結合強度に依存せず距離のみに依存するためゆるやかな複合体の解析に好適である。

2. 研究の目的

本研究は PLA を用いて先天性内分泌疾患関連転写因子を解析し、これらが関わる転写複合体の全体像把握を目的とする。この際、野生型分子に加えて変異型分子を組み合わせることで解析することにより、転写複合体の生理的状态に加えて疾患に関わる病的状態の特徴づけを目指した。

3. 研究の方法

解析対象分子

本研究では先天性内分泌疾患に関わる分子を解析対象とし、野生型分子および疾患関連変異型分子の解析を計画した。具体的には先天性原発性甲状腺機能低下症に関わる PAX8、NKX2-1、性分化疾患に関わる SOX9、NR5A1 の 4 分子を解析した。

発現ベクターの構築・安定発現細胞株の樹立

高コピーでの安定発現が可能な piggybac ベクターに各転写因子の配列と TurboID (遺伝子改変型ビオチンリガーゼ)¹ の配列を Gibson アセンブリで組み込んだ。各変異体は野生型ベクターをもとに作製した。piggybac プロトコールによりこれらプラスミドをゲノムに組み込んだ HeLa 細胞株を樹立した。樹立した細胞における解析対象分子の発現は、蛍光免疫染色で確認した。ネガティブコントロールには核内移行シグナル (NLS) を TurboID に連結したプラスミドを用いた。

PLA

Branon TC らによる方法¹にもとづき実験を行った。15 cm ディッシュで培養した安定発現 HeLa 細胞をセミコンフルエントまで培養したのち、培地にビオチン (終濃度 0.5 mM) を添加して 1.5 時間インキュベートしビオチン化反応を行った。冷 PBS での洗浄の後、スクレイパーと遠心で細胞を回収し RIPA バッファーで融解した。ビオチン化タンパク質を含むライセートにストレプトアビジンビーズをあわせビオチン化タンパク質を捕捉した。ビーズを RIPA バッファー、2M 尿素などで洗浄して非特異的結合物を除去した上でビーズをトリプシン処理し、この試料を LC-MS/MS 装置 Q Exactive HF (Thermo Fisher) で解析した。得られたプロテオミクスデータは DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) による Gene ontology 解析、STRING (<https://string-db.org/>) によるネットワーク解析などで分析した。

4. 研究成果

解析対象分子

解析対象分子は野生型分子に加え変異型分子を作製した。PAX8 は野生型と Q40P 変異および C 末端欠失変異 (Δ C)、NKX2-1 は野生型と N 末端欠失変異 (Δ N)、SOX9 は野生型と E50K 変異 (機能亢進型)、A76E 変異および P108L 変異、NR5A1 は野生型と C 末端欠失変異 (Δ C) を解析した。

安定発現 HeLa 細胞株の樹立と性状評価

piggybac プロトコールにもとづき上記解析対象遺伝子の TurboID タグ体をドキシサイクリン誘導性に安定発現する HeLa 細胞株を樹立した。ベイト分子 (解析対象分子の TurboID タグ体) の細胞内発現を抗 FLAG 抗体での蛍光免疫染色で評価し、いずれも期待されたとおり核内に局在することを確認した (例として図 1 に NR5A1^{WT}-TurboID、NR5A1 ^{Δ C}-TurboID の細胞内局在を示す)。

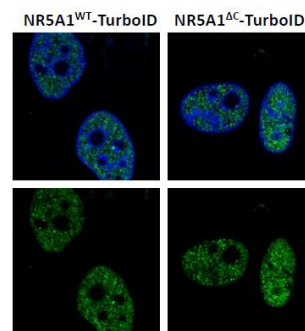


図 1 NR5A1-TurboID の細胞内局在 (蛍光免疫染色)。

PLA・データ解析

PLA の結果、各サンプルにおいて約 4,000 種のタンパク質のカウント値が得られた。この測定値は底 10 の対数変換により正規分布とみなせる分布をとったため、以下のデータ記述および統計解析には対数変換カウント値を用いることとした。PLA の定量性を評価するため TurboID-NLS

の biological replicates のカウント値の相関を検討し、高い相関 ($R^2=0.9684$) を認めた (図 2)。このことは PLA における定量プロテオミクスの信頼性を示すものである。

野生型転写因子の特徴づけをおこなうため、コールされた分子ごとに TurboID-NLS サンプルにおけるカウント値との差分を求めた。差分の大きい分子上位 200 につきネットワーク解析を行った。代表的なデータとして、野生型 NR5A1 での結果を図 3 に示す。

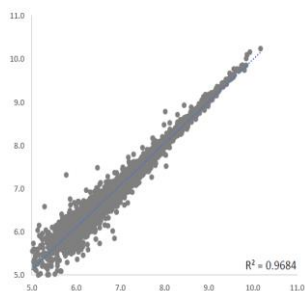


図 2 TurboID-NLS の PLA カウント値 (対数変換) の反復実験間での相関。

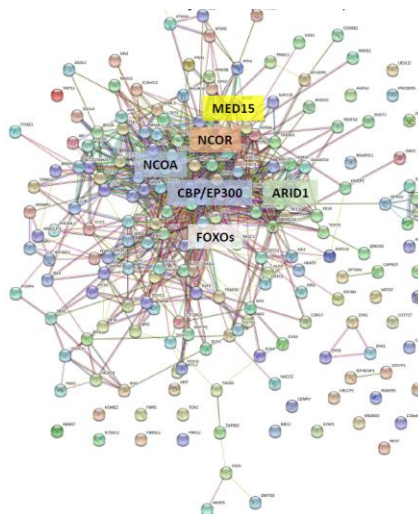


図 3 TurboID-NLS に対し NR5A1^{WT} でエンリッチされていた上位 200 分子のネットワーク解析の結果

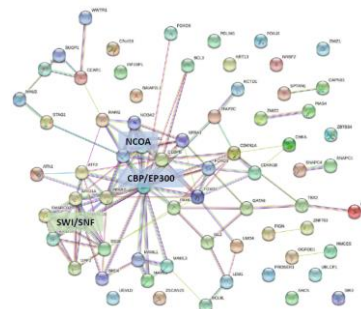


図 4 NR5A1^{AC} に対し NR5A1^{WT} でエンリッチされていた上位 68 分子のネットワーク解析の結果

この解析からは、NR5A1 と CBP/p300 コアアクティベーター複合体との近接性が示唆された。この結果は、先行研究における NR5A1 と CBP/p300 の協調的転写制御²に矛盾しないものであり、転写複合体解析手法としての PLA の妥当性を示唆するものと解釈した。CBP/p300 に加えて、これまで相互作用対象として未報告である分子としてコリプレッサー複合体構成因子 (NCOR1、HDAC3、GPS2 など)、SWI/SNF 複合体構成因子 (ARID1A、SMARCA2 など) への近接性が示唆された。このことは、NR5A1 がヒストンアセチル化を介した転写促進のみならず、転写抑制やヒストンリモデリングにも関与しうる可能性を示唆する。また、C 末端欠失 NR5A1 と野生型 NR5A1 の比較解析 (図 4) では、CBP/p300、SWI/SNF 複合体などの NR5A1 を特徴づけるタンパク質相互作用が NR5A1^{AC} において低下していた。このことから、これらの相互作用が NR5A1 の C 末端 11 アミノ酸 (NLLIEMLQAKQT) を介して行われることを示唆するものである。

同様の手法で SOX9 のデータを解析したところ、SOX9 でも NR5A1 と同様に小アクティベーター複合体構成因子 (CBP、p300 など)、コリプレッサー複合体構成因子、SWI/SNF 複合体構成因子の近接性を認めた。これらの近接性は機能低下型変異 A76E、P108L では喪失する傾向を認めたが、一方で機能亢進型変異 E50K³ では近接性に有意な変化を認めなかった。

考察

本研究は組織特異的転写因子に着目し、タンパク質相互作用のオミクス解析手法である PLA に適用したものである。本研究独自の工夫として、野生型分子と変異型分子の PLA シグネチャ比較を通じたタンパク質相互作用部位の局在化を行い、実際にこのアプローチが有効であることを NR5A1 の解析で示した。先行研究の知見と本研究の知見を比較すると、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法を主とした先行研究の知見では、相対的に強い相互作用をもつ分子、核内発現量が豊富な分子などが優先的に捕捉されており、転写制御機構の全体像は十分に把握されていないと考えられた。今後、PLA を含む新規タンパク質相互作用解析の知見の集積を通じて、転写制御機構の全体像の解明を期待したい。

<引用文献>

1. Branon TC *et al.*, Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol.* 2018;36:880-887.
2. Monté D *et al.*, Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem.* 1998;273:4585-4591.
3. Ushijima K *et al.*, Identification of the first promoter-specific gain-of-function SOX9 missense variant (p.E50K) in a patient with 46,XX ovotesticular disorder of sex development. *Am J Med Genet A.* 2021;185:1067-1075.

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 Sugisawa C, Takamizawa T, Abe K, Hasegawa T, Shiga K, Sugawara H, Ohsugi K, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Daitsu T, Numakura C, Koike A, Tsubaki J, Kitsuda K, Matsuura N, Taniyama M, Ishii S, Satoh T, Yamada M, Narumi S.	4. 巻 104
2. 論文標題 Genetics of Congenital Isolated TSH Deficiency: Mutation Screening of the Known Causative Genes and a Literature Review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 6229-6237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jc.2019-00657.	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 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中尾佳奈子、小田野めぐみ、秋葉和壽、鳴海覚志
2. 発表標題 TurboIDによるPAX8近接タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾佳奈子、小田野めぐみ、秋葉和壽、鳴海覚志
2. 発表標題 TurboIDによるPAX8近接タンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 新世代技術によるタンパク質相互作用解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海寛志
2. 発表標題 先天性甲状腺機能低下症の分子遺伝子学
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021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