

新規近位依存性ビオチン標識酵素
AirID の開発とその応用

城戸康希

2020

目次

1. 概要.....	2
2. 実験方法・材料.....	4
3. 導入.....	42
4. 結果.....	47
5. 考察.....	66
6. 図・表	70
7. 参考文献	95
8. 謝辞.....	110

1. 概要

タンパク質は生体内において、様々な生理機能を制御している。特に高等真核生物においては、ほとんどのタンパク質は単独ではなく、複数のタンパク質と相互作用することによりその機能を果たしている。そのため、タンパク質の役割の理解には、相互作用するタンパク質を同定・解析することが非常に重要である。筆者らは、タンパク質相互作用解析法として近位依存性ビオチン標識 (BioID)法に着目した。過去に開発された BioID 酵素として、BioID 及び TurboID が知られているが、BioID は活性面、TurboID は特異性面において問題を抱えていた。そこで筆者らはそれらの問題点を克服した BioID 酵素の開発を試み、*in silico*における新たな祖先型酵素を再構成するアルゴリズムを用いた進化的タンパク質工学アプローチにより、新規の酵素 AirID を獲得した。AirID は BioID と比べ非常に高い活性を有し、TurboID よりもタンパク質相互作用依存性の高いビオチン化を可能とする酵素である。そのため、既存の BioID 酵素と比べ、利用可能な条件の幅が広く、汎用性の高い酵素である。この AirID はタンパク質相互作用解析における強力なツールとなることが期待できる。

さらに、筆者らは現在、AirID の新たな利用方法として、抗体依存的なビオチン標識ツール AGIAiD の開発を行っている。このツールは、筆者らの研究室にて開発された高親和性ウサギモノクローナル抗体である AGIA Fab 抗体へ AirID を融合することで、AGIA Fab 抗体の結合依存的にビオチン標識することが可能としている。これにより、目的タンパク質わずか 9 アミノ酸の AGIA タグを挿入するだけで目的タンパク質へ相互作用するタンパク質をビオチン標識することができる。この技術は受容体解析などの分野において有用である。

2. 実験方法・材料

2-1. 実験材料

実験試薬については Table1 に示し、プライマーのリストを Table2 に示した。

Table 1. 実験試薬

Reagent type (species)	Designation	Source or Reference
gene (<i>E.coli</i> -midified)	BioID	Kim DI et al., 2014; DOI: 10.1073/pnas.1406 459111
gene (<i>E.coli</i> -midified)	TurboID	Perrimon N et al., 2018; DOI: 10.1038/nbt.4201
gene (similarity with <i>Shewanella</i> genus)	AVVA	this paper
gene (similarity with <i>Frischella</i> and <i>Gliamella</i> genera)	AFVA	this paper
gene (similarity with <i>Thiobacillus</i> and <i>Betaproteobacteri</i> a genera)	AHLA	this paper
gene (multiple genera)	GFVA	this paper
gene (common ancestor of AVVA, AFVA,	all	this paper

and GFVA)		
gene (<i>H.sapiens</i>)	IκBα	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	RelA	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	p53	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	Mdm2	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	CRBM	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	RBX1	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	DDB1	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	CUL4	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	SALL4	Mammalian Gene Collection
gene (<i>H.sapiens</i>)	IKZF1	Mammalian Gene Collection
recombinant DNA reagent	pEU (plasmid)	Cell-Free Science
recombinant DNA reagent	pcDNA3.1 (plasmid)	modified from Invitrogen
recombinant DNA reagent	pET30a (plasmid)	modified from Merck
antibody	Anti-AGIA HRP	Yano et al., 2016; DOI: 10.1371/journal.pone.0156716

antibody	Anti-biotin, HRP-linked antibody (from Goat)	Cell Signaling
antibody	His-probe Antibody (H-3) (mouse mAb)	SantaCruz
antibody	Anti-FLAG M2-HRP (mouse mAb)	Sigma
antibody	Anti-GST-tag pAb-HRP-DirecT (rabbit pAb)	MBL
antibody	Anti-p65 (D14E12) (rabbit mAb)	Cell Signaling
antibody	Anti-GFP (1E4) (mouse mAb)	MBL
antibody	Anti- α -Tubulin pAb-HRP-DirecT (rabbit pAb)	MBL
antibody	Anti-laminB (goat pAb)	SantaCruz
antibody	Anti-Myc (4A6) (mouse mAb)	Merck
antibody	Anti-p50/p105 (D7H5M) (rabbit mAb)	Cell Signaling
antibody	Anti-CUL4 (H-11)	SantaCruz
antibody	Anti-DDB1 (E-11)	SantaCruz
antibody	Anti-RBX1 (E-11)	SantaCruz
antibody	Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') ₂ Fragment Donkey	GE Healthcare
antibody	Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F(ab') ₂ Fragment Sheep	GE Healthcare
antibody	normal rabbit IgG	MBL

antibody	Streptavidin, Alexa Fluor 488	Thermo
antibody	F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Thermo
Cloning enzyme	PrimeSTAR HS DNA polymerase	Takara
Cloning enzyme	KOD One PCR Master Mix	TOYOBO
Cloning enzyme	SapphireAmp Fast PCR Master Mix	Takara
Cloning enzyme	BamHI-HF	NEB
Cloning enzyme	NotI-HF	NEB
Cloning enzyme	SpeI	NEB
Cloning enzyme	KpnI-HF	NEB
Cloning enzyme	Ligation high Ver.2	TOYOBO
Cell line (<i>H.sapiens</i>)	HEK293T	RIKEN BRC
Cell culture	D-MEM low glucose	Wako
Cell culture	FBS	Biosera
Cell culture	penicillin and streptomycin	Thermo
Cell culture	TrypLE Select	Thermo
Transfection	PEI MAX - Transfection Grade Linear Polyethylenimine Hydrochloride	Polyscience
Transfection	TransIT-LT1	Takara
Beads	Dynabeads proteinG	Invitrogen
Beads	Ni Sepharose High Performance	GE Healthcare
Beads	Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare

Beads	Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare
Beads	Tamavidin 2-Rev magnetic beads	Fujifilm
commercial assay kit	Alphascreen ProteinA detection kit	Perkin Elmer
commercial assay kit	CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
commercial assay kit	SuperPrep II Cell Lysis & RT kit for qPCR	TOYOBO
commercial assay kit	KOD SYBR qPCR Mix	TOYOBO
commercial assay kit	Wheat germ cell-free protein synthesis kit	Cell-Free Science
chemical compound & drug	Nutlin-3	Sigma
chemical compound & drug	Pomalidomide	TCI
chemical compound & drug	MG-132	Peptide Institute
chemical compound & drug	D-Biotin	nacalai tesque
chemical compound & drug	Protease Inhibitor cocktail	Sigma
chemical compound & drug	Blasticidin S	Invitrogen
chemical compound &	Isobutyric acid	nacalai tesque

drug		
chemical compound & drug	anmonia solution	nacalai tesque
other	cellulose TLC plate	Merck

Table2. プライマーリスト

Primer name	Sequence
BamHI-BirA-AVVA_Fw	GAGGGATCCatgtctgagcagtggcttagga
BamHI-BirA-AVFA_Fw	GAGGGATCCatgaggaacaagcagaacccg
BamHI-BirA-AVHA_Fw	GAGGGATCCatgaggcctttccgcttct
BamHI-BirA-GVFA_Fw	GAGGGATCCatgaaggacaacaccgttccg
BamHI-BirA-all_Fw	GAGGGATCCatgaaggacaagaccagaccg
BamHI-TurboID_Fw	GAGGGATCCGatgaaggacaacaccgtgcc
BamHI-BirA_Fw	GAGGGATCCatgaaggataaacaccgtgcca
NotI-BirA-AVVA_Rv	GAGGCGCGCGCTTAagcagctctcaaagagatctcc
NotI-BirA-AVFA_Rv	GAGGCGCGCGCTTAttcatctgatctgaggctgatct
NotI-BirA-AVHA_Rv	GAGGCGCGCGCTTAagcagcaggcctaagagaa
NotI-BirA-GVFA_Rv	GAGGCGCGCGCTTAagcagatctgaggctgatctc
NotI-stop-TurboID	GAGGCGCGCGCTCActtctcagcagatctgaggctg
NotI-BirA_Rv	GAGGCGCGCGCttattttctgcactacgcaggata
NotI-BirA-AVVA_woSTOP	TAGTGCGGCCGCAGCAGCTCTCAAAGAGATCTCC
NotI-BirA-AVFA_woSTOP	TAGTGCGGCCGCTTCATCTGATCTGAGGCTGATCTCC
NotI-BirA-ALHA_woSTOP	TAGTGCGGCCGCAGCAGCAGGCCTAAGAGAAATCTC
NotI-BirA-GVFA_woSTOP	TAGTGCGGCCGCAGCAGATCTGAGGCTGATCTC
NotI-TurboID_woSTOP	GAGGCGGCCGCcttctcagcagatctgaggctg
NotI-WT_woSTOP	TAGTGCGGCCGCTTTTTCTGCACTACGCAGGGA
NotI-p53	GAGGCGGCCGCtcagtctgagtcaggcccttct
SpeI-p53	gagACTAGTtcagtctgagtcaggcccttct
AVVA_R118G_Fw	AGAGGAaggTAGAGGAagaactgggtttcacc
AVFA_R118G_Fw	AGAGGAaggTAGAGGTaggcaatggttctctc

ALHA_R118G_Fw	AGAGGA ^{agg} tAGAGGTagagcttggcatgc
GVFA_R118G_Fw	AGAGGA ^{agg} tAGAGGTaggaagtggttttctcc
all_R117G_Fw	AGAGGA ^{agg} tAGAGGTaggaagtggtttagcc
AVVA_R118S_Fw	AGAGGA ^{agc} AGAGGAagaacttgggtttcacc
GVFA_R118S_Fw	AGAGGA ^{agc} AGAGGTaggaagtggttttctcc
AVVA_R118G_Rv	TCCTCTaccTCCTCTtccagcagactggtac
AVFA_R118G_Rv	ACCTCTaccTCCTCTagccttagactggaactc
ALHA_R118G_Rv	ACCTCTaccTCCTCTtccagcagtctgtc
GVFA_R118G_Rv	ACCTCTaccTCCTCTtccagcctgttgg
all_R117G_Rv	ACCTCTaccTCCTCTtccagcagactgg
AVVA_R118S_Rv	TCCTCTgctTCCTCTtccagcagactggtac
GVFA_R118S_Rv	ACCTCTgctTCCTCTtccagcctgttgg
BamHI-AVVA_ver2	GAGGGATCCGatgtctgagcagtggtctagg
BamHI-GVFA_ver2	GAGGGATCCGatgaaggacaacaccgttccg
BamHI-EcBirA_ver2	GAGGGATCCGatgaaggataacaccgtgccac
KpnI- IκBα	GAGGGTACCatgttccaggcggcoga
KpnI-p53	GAGGGTACCatggaggagccgcagtc
KpnI-AVVA_woSTOP	GAGGGTACCagcagctctcaaagagatctcc
KpnI-GVFA_woSTOP	GAGGGTACCagcagatctgaggctgatctc
KpnI-TurboID_woSTOP	GAGGGTACCcttctcagcagatctgaggctg
KpnI-EcBirA_woSTOP	GAGGGTACCTTTTTCTGCACTACGCAGGGA
NotI- IκBα	GAGGCGCGCGCtcataacgtcagacgctggcct
NotI-p53	GAGGCGCGCGCtcagtctgagtcaggcccttct
SPU	gcgtagcatttaggtgacact
SPA	cctgogctgggaagataaac
CMV_Fw	ggcaccaaaatcaacgggac
BGH_Rv	tagaaggcacagtcgaggct
CTS	gggacagcagaaattcactt
IRES2_Rv	aatgctcgtcaagaagacag

2-2. 実験手法

制限酵素付加 PCR については、全て下記のプロトコルにて行った。Template 及び各種 Primer は各項に示した。

PrimeSTAR HS	0.2 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	4 μ L
2.5 mM dNTPs	1.6 μ L
Template	1 μ L
2 μ M Primer (Foward and Reverse mix)	2 μ L
MQ	12.2 μ L
<hr/>	
Total	20 μ L

コロニーPCR については、全て下記のプロトコルにて行った。使用した Primer は各項に示した。

SapphireAmp Fast PCR Master Mix	5 μ L
2 μ M Primer (Foward and Reverse mix)	1 μ L
MQ	4 μ L
<hr/>	
Total	10 μ L

設計された祖先型 BirA を発現させるため、各種 BirA を、アミノ酸配列を基に人工遺伝子として GeneArt にて設計し、制限酵素を用いて pEU ベクターへ導入した。制限酵素付加 PCR のために、購入した人工遺伝子を TE buffer にて 20 ng/ μ L になるように溶解し、template として使用した。野生型 BirA については、pEU ベクターへ挿入された pEU-E01-BirA(1 ng/ μ L)を template として使用した。

Template 及び Primer の組み合わせは下記のとおりである。

gene	Forward	Reverse
BirA-AVVA	BamHI-BirA-AVVA_Fw	NotI-BirA-AVVA_Rv
BirA-AFVA	BamHI-BirA-AVFA_Fw	NotI-BirA-AVFA_Rv
BirA-AHLA	BamHI-BirA-AVHA_Fw	NotI-BirA-AVHA_Rv
BirA-GFVA	BamHI-BirA-GVFA_Fw	NotI-BirA-GVFA_Rv
BirA-all	BamHI-BirA-all_Fw	NotI-BirA-GVFA_Rv
TurboID	BamHI-TurboID_Fw	NotI-stop-TurboID
BirA	BamHI-BirA_Fw	NotI-BirA_Rv

↓

各種 BirA の増幅産物をゲル回収後、BamHI 及び NotI にて処理を行った。

PCR product	20 μ L
BamHI-HF	0.75 μ L
NotI-HF	0.75 μ L
Cut Buffer	2 μ L
Total	23.5 μ L

制限酵素処理は 37°C にて一晩行った。

制限酵素処理後、カラム精製を行い、pEU-AGIA-MCS へ挿入を行った。Ligation

反応は 16°C にて 30 min 行った。

↓

Ligation 産物をコンピテントセル JM109 へトランスフォーメーションし、

Ampicillin を含む LB Agar plate へ播種した。

↓

SPU 及び SPA primer を用いたコロニーPCR による選抜の後、Ampicillin を含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、プラスミドプレップによりプラスミドを獲得した。

AirID 融合 p53 の作製

コムギ無細胞系にて各種 BirA の評価を行うため、BirA と p53 タンパク質へ制限酵素サイトを付加し、pEU ベクターへの挿入を行った。その際、p53 の N 末端へ BirA を付加するため、BirA は stop コドン除去して制限酵素を付加している。Template 及び Primer の組み合わせは下記のとおりである。

Template	Forward	Reverse
BirA-AVVA	BamHI-BirA-AVVA_Fw	NotI-BirA-AVVA_woSTOP
BirA-AFVA	BamHI-BirA-AVFA_Fw	NotI-BirA-AVFA_woSTOP
BirA-AHLA	BamHI-BirA-ALHA_Fw	NotI-BirA-ALHA_woSTOP
BirA-GFVA	BamHI-BirA-GFVA_Fw	NotI-BirA-GVFA_woSTOP
BirA-all	BamHI-BirA-all_Fw	NotI-BirA-GVFA_woSTOP
TurboID	BamHI-TurboID_Fw	NotI-TurboID_woSTOP
BirA	BamHI-BirA_Fw	NotI-BirA_woSTOP
pcDNA-p53	NotI-p53	SpeI-p53

各種 BirA 及び p53 の増副産物をゲル回収後、BamHI / NotI、NotI / SpeI にて処理を行った。

PCR product (BirAs)	20 μ L
BamHI-HF	0.75 μ L
NotI-HF	0.75 μ L
CutSmart Buffer	2 μ L

Total 23.5 μ L

PCR product (p53)	20 μ L
SpeI	0.75 μ L
NotI-HF	0.75 μ L
CutSmart Buffer	2 μ L

Total 23.5 μ L

制限酵素処理は 37°C にて一晩行った。

制限酵素処理後、カラム精製を行い、pEU-AGIA-MCS へ挿入を行った。

p53 (NotI/SpeI)	1 μ L
BirAs (BamHI/NotI)	1 μ L
pEU-AGIA-MCS (BamHI/SpeI)	0.5 μ L
Ligation high ver.2	2.5 μ L

Total 5 μ L

Ligation 反応は 16°C にて 1 hr 行った。

↓

Ligation 産物をコンピテントセル JM109 へトランスフォーメーションし、

Ampicillin を含む LB Agar plate へ播種した。

↓

SPU 及び SPA primer を用いたコロニーPCR による選抜の後、Ampicillin を含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、プラスミドプレップによりプラスミドを獲得した。

RG、RS 変異体の作製

BirA の近位依存性ビオチン化能を評価するために、R118G 変異体(RG)及び R118S 変異体(RS)の作製を行った。KOD One[®] (TOYOBO)を用いて下記のプロトコルにて変異体作製を行った。

KOD One	5 μ L
Template (10 pg/ μ L)	1 μ L
2 μ M Primer (Foward and Reverse mix)	1 μ L
MQ	3 μ L
<hr/>	
Total	10 μ L

Template 及び Primer の組み合わせは下記のとおりである。

Template	Forward	Reverse
<hr/>		
pEU-AGIA-AVVA	AVVA_R118G_Fw	AVVA_R118G_Rv
pEU-AGIA-AFVA	AVFA_R118G_Fw	AVFA_R118G_Rv
pEU-AGIA-AHLA	ALHA_R118G_Fw	ALHA_R118G_Rv
pEU-AGIA-GFVA	GVFA_R118G_Fw	GVFA_R118G_Rv
pEU-AGIA-all	all_R117G_Fw	all_R117G_Rv

pEU-AGIA-AVVA	AVVA_R118S_Fw	AVVA_R118S_Rv
pEU-AGIA-GFVA	GVFA_R118S_Fw	GVFA_R118S_Rv
pEU-AGIA-BirA	EcBirA_R118G_Fw	EcBirA_R118G_Rv

↓

PCR 産物をコンピテントセル JM109 へトランスフォーメーションし、Ampicillin を含む LB Agar plate へ播種した。

↓

SPU 及び SPA primer を用いたコロニーPCR による選抜の後、Ampicillin を含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、プラスミドプレップによりプラスミドを獲得した。

細胞発現用プラスミドの作製

BirAs(BioID、TurboID、AVVA-RG、AVVA-RS、GVFA-RG、GVFA-RS)を細胞にて評価するために、制限酵素付加 PCR を行い、p53 及び I κ B α と融合した。Template 及び Primer の組み合わせは下記のとおりである。

Template	Forward	Reverse
pEU-AGIA-AVVA_RG	BamHI-AVVA_ver2	KpnI-AVVA_woSTOP
pEU-AGIA-AVVA_RS	BamHI-AVVA_ver2	KpnI-AVVA_woSTOP
pEU-AGIA-GFVA_RS	BamHI-GVFA_ver2	KpnI-GVFA_woSTOP
pEU-AGIA-BioID	BamHI-EcBirA_ver2	KpnI-TurboID_woSTOP
pEU-AGIA-TurboID	BamHI-TurboID	KpnI-EcBirA_woSTOP

pEU- AGIA-IκBα	KpnI- IκBα	NotI- IκBα
pcDNA-p53	KpnI-p53	NotI-p53

各種 BirA 及び p53 の増副産物をゲル回収後、BamHI / KpnI、KpnI / NotI にて処理を行った。

PCR product (IκBα)	20 μL
BamHI-HF	0.75 μL
KpnI-HF	0.75 μL
CutSmart Buffer	2 μL
<hr/>	
Total	23.5 μL

PCR product (p53、RelA)	20 μL
KpnI-HF	0.75 μL
NotI-HF	0.75 μL
CutSmart Buffer	2 μL
<hr/>	
Total	23.5 μL

制限酵素処理は 37°C にて一晩行った。

制限酵素処理後、カラム精製を行い、pcDNA3.1-AGIA-MCS へ挿入を行った。

p53 or RelA (KpnI/NotI)	1 μL
BirAs (BamHI/KpnI)	1 μL
pcDNA3.1-AGIA-MCS (BamHI/NotI)	0.5 μL

Ligation high ver.2	2.5 μ L
---------------------	-------------

Total	5 μ L
-------	-----------

Ligation 反応は 16°C にて 1 hr 行った。

↓

Ligation 産物をコンピテントセル DH5 α へトランスフォーメーションし、Ampicillin を含む LB Agar plate へ播種した。

↓

CMV Fw 及び BGH_Rv primer を用いたコロニーPCR による選抜の後、Ampicillin を含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、プラスミドプレップによりプラスミドを獲得した。

コムギ無細胞タンパク質合成

pEU へ組み込まれた各種 BirA 及び BirA 融合 p53、IkB α はコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成した。全てのプラスミドについて、NucleoBond® Xtra Midi kit (MACHEREY-NAGEL)を用いて獲得され、1 μ g/ μ L の濃度に調製した。このプラスミドを用いて下記のプロトコルにて転写反応を行った。

Transcription buffer	2 μ L
----------------------	-----------

25 mM NTPs	1 μ L
------------	-----------

RNase Inhibitor	0.1 μ L
-----------------	-------------

SP6 RNA polymerase	0.1 μ L
--------------------	-------------

plasmid (1 μ g/ μ L)	1 μ L
------------------------------	-----------

MQ	5.8 μL
----	-------------------

Total	10 μL
-------	------------------

反応は 37°C で 6 hr 行った。

転写産物を用いて、下記のプロトコルにて翻訳反応を行った。

Upper layer

SUB-AMIX	51.5 μL
----------	--------------------

MQ	154.5 μL
----	---------------------

Total	206 μL
-------	-------------------

Lower layer

mRNA	10 μL
------	------------------

10 mg/mL Creatine kinase	0.5 μL
--------------------------	-------------------

wepro1240	10 μL
-----------	------------------

Total	20.5 μL
-------	--------------------

Upper layer を 96-well plate に添加し、各 well へ Lower layer をゆっくり重層した。

反応は 16°C にて 16 時間行った。

大腸菌によるタンパク質合成

100 μL の BL21 へプラスミド(pET30a-His-ORF)を添加

↓

氷上で静置

↓30 min

ヒートショック

↓42°C、30 sec

200 μL の SOC 培地添加

↓37°C、1 hr

カナマイシン含有 LB 液体培地 3 mL へ全量添加

↓37°C、12 hr

カナマイシン含有 LB 培地 40 mL へ培養液 1 mL を添加

↓37°C

OD 0.5 で 1 M IPTG を 40 μL 添加

↓37°C、2 hr

8,000 rpm、10 min 遠心分離

ペレットを 4 mL の His tag buffer で懸濁

His tag buffer

- 20 mM Na-Phosphate buffer
- 300 mM NaCl
- 10 mM Imidazole

↓

1 mL ずつエッペンチューブへ分注し、超音波により破碎

↓

1 つのチューブへ破碎液を集め、8,000、10 min 遠心分離

↓

上清回収

↓

200 μ L の Ni セファロースを添加

↓

4°C で 3 hr ローテーション

↓

1 mL の wash buffer で 3 回洗浄

Wash buffer

- 20 mM Na-Phosphate buffer
- 300 mM NaCl
- 30 mM Imidazole

↓

Elution buffer を 500 μ L 添加

Elution buffer

- 20 mM Na-Phosphate buffer
- 300 mM NaCl
- 500 mM Imidazole

↓4°C、30 min

3,000 rpm、5 min

↓

Empty スピんカラムへ上清を分注

↓

3,000 rpm、1 min

↓

溶出画分を PBS で透析

↓

CBB 染色による精製度確認と濃度測定

AlphaScreen を用いた相互作用解析

下記のプロトコルで相互作用反応を行うタンパク質 2 種類を混合した。阻害剤を使用する際は、この時、DMSO または阻害剤を 0.25 μ L 添加した。

10 \times AlphaScreen Bufer	1.5 μ L
10 mg/mL BSA	1.5 μ L
1 M NaCl	1.5 μ L
FLAG-tagged Protein	1 μ L
Biotinylated protein	1 μ L
MQ	8.5 μ L
<hr/>	
Total	15 μ L

↓26°C、1 hr

暗室にて、384-well plate の各 well へ下記の AlphaScreen beads mixture を添加した。

10 \times AlphaScreen Bufer	1 μ L
10 mg/mL BSA	1 μ L
1 M NaCl	1 μ L

Protein A Acceptor beads	0.08 μ L
Streptavidin Donor beads	0.08 μ L
anti-DYKDDDDK antibody	0.02 μ L
MQ	6.82 μ L
<hr/>	
Total	10 μ L

↓26°C、1 hr

検出

ストレプトアビジンセファロースを用いたプルダウンアッセイ (SPD assay)

ストレプトアビジンセファロースを 15 μ L / sample 分エッペンへ移す。

↓

ビーズの 10 倍量以上の Wash buffer を添加し、2 回洗浄

Wash buffer

- 50 mM Tris-HCl (pH7.5)
- 100 mM NaCl
- 1% TritonX-100

↓

ビーズへ Wash buffer を添加し、各サンプルへ等量ずつ分注

↓

室温で 1 hr ローテーション

↓

500 μ L の Wash buffer で 3 回洗浄

↓

2×Sample buffer を添加し、100°C で 10 min ボイル

↓

5,000 rpm、1 min 遠心し、上清を回収

↓

SDS-PAGE、WB による解析

In vitro ビオチン化アッセイ

合成した BirA 融合タンパク質及びその相互作用タンパク質混合した。

BirA fused protein	10 μ L
--------------------	------------

Interaction protein	10 μ L
---------------------	------------

Total	20 μ L
-------	------------

↓26°C、1 hr

上記の Proteins mixture へ終濃度 500 nM でビオチンを添加した(ビオチン濃度を検討した際の濃度は結果に示した)。また、反応温度及び反応時間は、各項目に示した。

Proteins mixture	20 μ L
------------------	------------

12.5 μ M biotin	1 μ L
---------------------	-----------

MQ	4 μ L
----	-----------

Total	25 μ L
-------	------------

↓

input として 5 μ L 回収し、2×Sample buffer と混合

残りの 20 μ L の溶液へ 50 mM Tris-HCl (pH7.5)及び SDS を添加する。

Reaction mixture	20 μ L
10% SDS	20 μ L
50 mM Tris-HCl (pH7.5)	160 μ L
<hr/>	
Total	200 μ L

↓

SPD assay

In cell ビオチン化アッセイ

Transient expression

HEK293T 細胞を 2.0×10^5 cell/mL の濃度で播種

↓37°C、5%CO₂、24 hr

細胞にて pcDNA3.1 ベクターへ挿入された AGIA-AirID 融合タンパク質を

HEK293T 細胞へトランスフェクション

↓37°C、5%CO₂

回収の 6 hr 前に終濃度 50 μ M でビオチンを添加

(反応時間及びビオチン濃度を検討した際の時間及び濃度は各項目に示した。)

↓37°C、5%CO₂、6 hr

PBS で細胞回収

↓

3,000 rpm、4°C、3 min 遠心分離

↓

ペレットへ RIPA buffer(+protease inhibitor cocktail)を添加し、超音波で破碎

↓

15,000 rpm、4°C、10 min

↓

上清を回収し、SDS を添加(終濃度 1%)

↓

SPD assay

Stable expression

AirID 融合タンパク質恒常発現細胞を 4.0×10^5 cell/mL の濃度で播種

↓37°C、5%CO₂

回収の 6 hr 前に終濃度 50 μM でビオチンを添加

(反応時間及びビオチン濃度を検討した際の時間及び濃度は各項目に示した。)

↓37°C、5%CO₂、6 hr

PBS で細胞回収

↓

3,000 rpm、4°C、3 min 遠心分離

↓

ペレットへ RIPA buffer(+protease inhibitor cocktail)を添加し、超音波で破碎

↓

15,000 rpm、4°C、10 min

↓

上清を回収し、SDS を添加(終濃度 1%)

↓

SPD assay

レンチウイルス発現プラスミドの作製

細胞内にて AirID 及び AirID- I κ B α を、レンチウイルスを用いて恒常的に発現させるため、AGIA-AirID と AGI-AirID- I κ B α へ制限酵素サイトを付加し、CSII ベクターへの挿入を行った。Template 及び Primer の組み合わせは下記のとおりである。

Template	Forward	Reverse
pcDNA3.1-AGIA-AirID	NheI-AGIA	NotI-BirA-GVFA_Rv
pcDNA3.1- AGIA-AirID- I κ B α	NheI-AGIA	NotI- I κ B α

AGIA-AirID 及び AGIA-AirID- I κ B α の増副産物をゲル回収後、NheI / NotI にて処理を行った。

PCR product	20 μ L
NotI-HF	0.75 μ L
NheI	0.75 μ L

CutSmart Buffer	2 μ L
-----------------	-----------

Total	23.5 μ L
-------	--------------

制限酵素処理は 37°C にて一晩行った。

制限酵素処理後、カラム精製を行い、CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd へ挿入を行った。

BirAs (BamHI/KpnI)	2 μ L
--------------------	-----------

CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd

(NheI/NotI)	0.5 μ L
-------------	-------------

Ligation high ver.2	2.5 μ L
---------------------	-------------

Total	5 μ L
-------	-----------

Ligation 反応は 16°C にて 1 hr 行った。

↓

Ligation 産物をコンピテントセル DH5 α へトランスフォーメーションし、Ampicillin を含む LB Agar plate へ播種した。

↓

CTS 及び IRES2_Rv primer を用いたコロニーPCR による選抜の後、Ampicillin を含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩培養し、プラスミドプレップによりプラスミドを獲得した。

レンチウイルスを用いた恒常発現細胞の作製

レンチウイルスの作製

2.0 \times 10⁶ cells/well の HEK293T 細胞を poly-L-lysine コートした 10-cm dish へ播種

↓

各プラスミドをトランスフェクション

Opti-MEM	1500 μ L
PEI	45 μ L
pCAG-HIV-gp	4.1 μ g
pCMV-VSV-G-RSV-Rev	4.1 μ g
CSII-CMV-IRES2-ORF-Bsd	7 μ g
<hr/>	
Total	1545 μ L

室温で 15 min 静置後、dish へ添加

↓37°C、5%CO₂、over night

8 mL の培地へ交換

↓37°C、5%CO₂、48 hr

上清を回収し、500×g で 15 min 遠心分離

↓

7.5 mL の上清を回収し、2.5 mL の lenti-X concentrator を添加

↓

氷上 30 min

↓

1,500×g、4°C、45 min 遠心分離

↓

ペレットへ培地を加え、分注・-80°C 凍結保存

レンチウイルスの感染及び安定発現細胞の選抜

細胞を 6-well plate へ 4.0×10^5 cells/well で播種

↓37°C、5%CO₂、over night

ウイルス溶液 5 μL を添加

↓37°C、5%CO₂、24 hr

培地を除き、PBS/EDTA で洗浄

↓

250 μL の TrypLE Select を添加

↓37°C、5%CO₂、3 min

2 mL の培地を添加

↓

細胞懸濁液 500 μL 分を 10 μg/mL の Blastcidin を含む培地に添加し、培養

↓

野生型の細胞が全滅するまで Blastcidin(10 μg/mL)を含む培地中で細胞を培養

↓

6-cm dish へ安定発現細胞を継代

↓

ストック作製

MS 解析用サンプル調製

AirID 及び AirID-IκBα を恒常発現させた HEK293T 細胞を 2.0×10^6 cells/well 6-cm

dish へ各 3 枚ずつ播種

↓37°C、5%CO₂、over night

ビオチン添加(50 μM)

↓37°C、5%CO₂、6 hr

PBS で細胞を回収

↓

3,000 rpm、4°C、3 min 遠心分離

↓

ペレットを-80°C で保存

↓

サンプル送付

免疫染色

24-well plate へ poly-L-lysine コートした丸カバーガラスを敷く

↓

HEK293T 細胞を 1.0×10^5 cells/well 播種

↓

プラスミドをトランスフェクション

Opti-MEM	50 μL
----------	-------

PEI	1 μL
-----	------

AGIA-AirID-p53	500 ng
----------------	--------

Total	51 μL
-------	-------

室温で 15 min 静置後、各ウェルへ添加

↓37°C、5%CO₂、24 hr

ビオチンを 0、5、50 μM の濃度で添加

↓3 hr

上清を除去し、200 μL の PBS で洗淨

↓

4 % パラホルムアルデヒドを 200 μL 添加

↓室温、15 min

200 μL の PBS で 2 回洗淨

↓

0.5 % Triton(in PBS)を 200 μL 添加

↓室温、15 min

200 μL の PBS で 2 回洗淨

↓

0.5 % CS (in TBST)を 200 μL 添加

↓

200 μL の TBST で 3 回洗淨

↓

AGIA 抗体(1,000 倍希釈) in TBST を 150 μL 添加

↓4°C、over night

Alexa-fluor 555 融合 Rabbit IgG 抗体(1,000 倍希釈)及び Alexa-fluor 488 融合

Streptavidin (1,000 倍希釈)、DAPI 150 μL を TBST にて希釈し、添加

↓室温、1 hr

15 μ L の ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI をスライドガラスへ滴下し
ておく

↓

Plate からカバーガラスを取り出し、細胞接着面を下にして、Antifade が滴下さ
れたスライドガラスへ敷く

↓

マニキュアをカバーガラスの周囲へ塗布

↓

乾燥させた後、共焦点顕微鏡にて観察

MTS assay

AirID 及び AirID-I κ B α 恒常発現 HEK293T 細胞を 96-well plate へ 2.5×10^3 cells/well
播種

↓37°C、5%CO₂、24 hr

50 μ M の濃度でビオチンを添加

↓

Day 0 の検出

CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent を 20 μ L ずつ各ウェルへ添加

↓37°C、5%CO₂、1 hr

490 nm 及び 650 nm(reference 波長)の吸収を検出

↓

24、48、72 時間後に Day1、Day2、Day3 を同様の手順で検出

Cell Titer Glo assay

HEK293T 細胞を 96-well plate へ 1.0×10^3 cells/well 播種

↓37°C、5%CO₂、24 hr

プラスミドをトランスフェクション

Opti-MEM	9 μL
TransIT-LT1	0.3 μL
pcDNA3.1-AGIA-AirID or -TurboID	100 ng
<hr/>	
Total	9.3 μL

室温で 15 min 静置後、各ウェルへ添加し、同時に 50 μM の濃度でビオチンを添加

↓37°C、5%CO₂、48 hr

上清を除去し、passive lysis buffer を 30 μL ずつ添加

↓

Cell Titer Glo Reagent を 30 μL ずつ添加

↓室温、10 min

GloMax® Discover Microplate Reader にて発光を検出

p53 の分解試験

HEK293T 細胞を 24-well plate へ 2.0×10^5 cells/well 播種

↓

プラスミドをトランスフェクション

Opti-MEM	50 μ L
PEI	1 μ L
pcDNA6.2-GFP-MDM2 or Mock	250 ng
pcDNA3.1-AGIA-AirID-p53	250 ng
<hr/>	
Total	51 μ L

室温で 15 min 静置後、各ウェルへ添加し、同時に 50 μ M の濃度でビオチンを添加

↓37°C、5%CO₂、18 hr

MG132 を添加(10 μ M)

↓37°C、5%CO₂、6 hr

細胞を Sample buffer にて回収

↓

SDS-PAGE、Western Blot にて解析

細胞分画

HEK293T 細胞を 12-well plate へ 1.0×10^5 cells/well 播種

↓

プラスミドをトランスフェクション

Opti-MEM	100 μ L
PEI	2 μ L
pcDNA3.1-AGIA-AirID-p53 or	500 ng

-AirID

Total

51 μ L

室温で 15 min 静置後、各ウェルへ添加

↓37°C、5%CO₂、21 hr

ビオチンを添加

↓37°C、5%CO₂、3 hr

NE-PAR を用いて分画

50 μ L の CERI(+PI)を添加

↓10 min、on ice

CERII を 5.5 μ L ずつ添加

↓

ボルテックス

↓

15,000 rpm、4°C、10 min 遠心分離

↓

上清(細胞質画分)を回収

↓

PBS 100 μ L を添加し、軽く転倒混和

↓

15,000 rpm、4°C、10 min 遠心分離

↓

上清除去

↓

25 μ L の NER を添加

↓

ボルテックス 10 min \times 4 回

↓

15,000 rpm、4°C、10 min 遠心分離

↓

上清(核画分)を回収

↓

Sample buffer を添加

↓

SDS-PAGE、Western Blot にて解析

qRT-PCR

AirID 及び AirID-I κ B α 恒常発現 HEK293T 細胞を 96-well plate \sim 1.0×10^3 cells/well

播種し、50 μ M の濃度でビオチンを添加

↓37°C、5%CO₂、24 hr

20 ng/mL の濃度で TNF α を 0、0.5、1 hr 処理

↓

上清を除去し、100 μ L の PBS(-)で洗浄

↓

RNase Inhibitor 及び gDNA remover を含む Lysis reagent for super prep II を各ウェ

ルへ 30 μL ずつ添加

↓室温、5 min

5 \times RT Master Mix 10 μL

Nuclease-free Water 6 μL

Cell Lysate 4 μL

Total 20 μL

↓

下記の温度及び時間で反応

37°C 15 min

50°C 5 min

98°C 5 min

4°C ∞

↓

上記で作製した cDNA を用いて下記のプロトコルにて qPCR の反応液を調製した。Primer として TNF α _Fw 及び TNF α _Rv を用いた。

KOD SYBR qPCR Mix 5 μL

2 μM Primer (Foward and Reverse mix) 1 μL

Nuclease-free Water 2.5 μL

cDNA 1.5 μL

Total 10 μL

↓

Light cycler 96 を用いて qPCR を行い、シグナルを検出した。

Biotinyl-5'-AMP の産生解析

大腸菌を用いて、His-TurboID、His-GFVA-RG、His-GFVA-RS(AirID)を合成・精製した。

↓

下記の反応液中で Biotinyl-5'-AMP の産生を行なった。

10×Reaction buffer	1 μL
10 μM ATP	1 μL
[α- ³² P]ATP	2.5 μL
1 mM biotin	0.25 μL
10 μM BirA	2 μL
MQ	3.25 μL
<hr/>	
Total	10 μL

10×Reaction buffer (Henke and Cronan, 2014)

- 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)
- 55 mM MgCl₂
- 1 M KCl
- 1 mM TCEP

↓37°C、30 min

反応液 1 μL をセルローズ TLC plate へスポット

↓

ドラフト内で展開槽へ isobutyric acid-NH₄OH-water (66:1:33)の展開溶媒(Prakash and Eisenberg, 1979)を加え、反応液を分離

↓

ドラフト内で十分に乾燥後、imaging plate へ挟んだ。

↓室温、暗室、over night

Typhoon FLA-3000 にて検出

3. 導入

生体内において多くのタンパク質は生物学的な調節システムの制御下で機能している。ほとんどのタンパク質制御では、その第一段階として、タンパク質相互作用が存在する。タンパク質が他のタンパク質と相互作用した後、複合体形成やリン酸化、ユビキチン化など多彩な翻訳後修飾によって、タンパク質の機能が果たされる。そのため、タンパク質の役割を理解するためには、そのタンパク質と相互作用するタンパク質を同定・解析することが極めて重要である。これまで、相互作用タンパク質同定の手段として、Yeast two-hybrid 法(Zhao et al., 2017; Li et al., 2016)や免疫沈降後の質量分析(Ohshiro et al., 2010, Han et al., 2015)など多彩な手法が開発・利用されてきた。筆者らの研究室においても、コムギ無細胞技術を基盤とした AlphaScreen による網羅的な相互作用解析技術を開発した(Nemoto et al., 2017; Takahashi et al., 2016)。しかしながら、細胞内のタンパク質は極めて複雑なシステムによって制御されているため、その理解には複数の技術が必要とされており、未だに新たな相互作用解析技術が開発され続けている。

近接依存性標識(proximity-labeling: PL)法は相互作用タンパク質の同定に利用可能な技術の一つである(Chang et al., 2017)。相互作用することで近接したタンパク質を標識することで、単純なタンパク質間相互作用のみならず、複合体形成やその局在も検出可能なため、相互作用タンパク質についてより多くの情報を得ることが可能である(Kim et al., 2014)。現在、PL 法として、EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources)法(Honke et al., 2012; Kotani et al., 2008)と APEX (engineered ascorbate peroxidase)法(Martell et al., 2012; James et al., 2019)、そして筆者らが注目した BioID (the

proximity-dependent biotin identification)法 (Choi-Rhee et al., 2004; Roux et al., 2012)が知られている。EMARS 法と APEX 法は迅速なタンパク質の標識を可能としているが、その標識には細胞毒性の高い過酸化水素を必要とする (Kotani et al., 2008; Martell et al., 2012; Halliwell et al., 2000)。対して、BioID 法はビオチンと ATP 依存的にタンパク質の標識を行うため、細胞への影響が極めて少ない。既存の BioID 酵素は大腸菌のビオチンリガーゼ BirA を基に開発された。初めて開発された BioID 酵素は BirA の 118 番目のアルギニンをグリシンへと置換した変異体である (Choi-Rhee et al., 2004)。その原理としては、BioID 酵素は無差別的な活性を有しており、高反応性かつ短命な化合物である biotinoyl-5'-AMP を放出する。放出された biotinoyl-5'-AMP は分解されるまでの間の距離に存在するタンパク質(距離にして約 10 nm)をビオチン修飾する。細胞内に BioID 融合標的タンパク質を発現させることで、標的タンパク質と相互作用するタンパク質がビオチン化される。このビオチン化タンパク質をストレプトアビジン結合ビーズにて回収し、質量分析を行うことで、相互作用タンパク質の同定が可能となる (Roux et al., 2012)。BioID は生理条件化で簡便に網羅的な相互作用解析を可能とするが、当初開発された BioID 酵素は 16 時間以上もの反応時間と高濃度のビオチンを必要とした。そのため、短時間の相互作用や動物個体や細胞内における低濃度のタンパク質を検出することは困難であった。故に、より高活性な酵素として、*Aquifex aeolicus* 由来のビオチン化酵素 BioID2 が開発された (Kim et al., 2016)。BioID2 は BioID よりも低分子量であり、高活性を有するものの、それでもなお一晩の反応時間が必要とされた。そこで、118 番目のアルギニンをセリンへと置換し、さらに 13 の変異を BirA へ

導入した新たな酵素 TurboID が近年開発された(Branon et al., 2018)。TurboID は極めて高いビオチン化活性を有しており、わずか 10 分でのビオチン化さえ可能である。しかし、その高すぎる活性故に、高濃度かつ長時間の反応によって、非相互作用タンパク質の非特異的なビオチン化や細胞への毒性を示すことも報告されている(Branon et al., 2018)。BioID 及び BioID2、TurboID はいずれも素晴らしい酵素ではあるものの、いくつかの改善点も存在している。筆者らは BioID 法の汎用性をさらに高めるため、新たな酵素の創出を試みた。

新たな BioID 酵素開発のため、筆者らはメタゲノムデータを用いた進化的タンパク質工学の手法を利用した(Nakano et al., 2015; Nakano et al., 2019)。本研究において、祖先型酵素を再構成するアルゴリズムによって 5 つの祖先型 BirA を設計し、*in vitro* や *in cell* にて利用可能な新規のビオチン化酵素 AirID を開発した。BioID と AirID は 82%のアミノ酸相同性を有しているが、AirID は BioID と比べてはるかに高いビオチン化活性を有する。さらに AirID は TurboID と比べ、反応時間に関わらず、タンパク質相互作用依存性の極めて高いビオチン化を可能とする酵素であることも確認された。筆者らの結果は AirID が *in vitro* や *in cell* にてタンパク質間相互作用解析に非常に役立つ酵素であるということを示している。

また、筆者らが所属する研究室において高親和性ウサギモノクローナル抗体である AGIA 抗体の Fab へ AirID を融合し、近位依存性ビオチン標識抗体 AGIAiD を作製した。AGIA 抗体は DRD1 タンパク質を抗原とし、その C 末端側エピトープ EEAAGIARP(AGIA タグ)を認識する抗体であり、高い親和性を有するほか、細胞内においても非特異的な相互作用がほとんど検出されない。

そのため、AirID を融合した AGIA 抗体は、AGIA タグ融合タンパク質を高特異的に認識することが可能となる。筆者らは、AGIA タグを融合したリガンドと AGIAiD を細胞へ添加することで、リガンドが結合した受容体をビオチン標識することが可能となると考え研究を進めている。そのため、この AGIAiD は、受容体探索などタグ依存的なビオチン標識において強力なツールとなり得ると期待している。

4. 結果

4-1. メタゲノムデータを用いた祖先型 BirA の再構成

BioID や TurboID は大腸菌由来のビオチンリガーゼ BirA を基にして設計された。筆者らはそれとは異なるアプローチとして、BirA の祖先型配列の再構成を試みた。祖先型酵素は、無差別的な活性を有することが知られている。そのため、近傍のタンパク質へより強力にビオチン標識が可能となること、あるいは、これまでと異なる酵素を基盤とすることで、異なる特性の酵素が獲得できる可能性を期待し、このアプローチを試みた。下記のプロセスにより、5 種類の祖先型 BirA を獲得した。まず、大規模な BirA ホモログの配列ライブラリーが BirA (EU08004.1)の配列を基にして、Blastp により調製された。次に、以前の研究で示されたように、ライブラリーの Curation が行われた(Nakano et al., 2018; Nakano et al., 2019)。具体的には、BirA の配列と比較して、極端に長すぎる配列や短すぎる配列及び、全く同じ配列が除去されている。そして最終的に、1,275 配列がライブラリーとして使用されている。このライブラリーを基にして祖先型配列の設計が開始された。具体的な手順は下記の通りである。1) BirA の配列とライブラリー内の 1 つの配列で構成された配列のペアを用意する。2)全ての配列ペアをアライメントする。3)「鍵となるアミノ酸残基」を有する配列を選抜する(Figure 1A)。鍵となるアミノ酸残基の選抜は過去の報告と同様のアプローチで行われた。異なる点としては、クラス分けにおいて、鍵となる残基の組み合わせがいくつか見出されたことである。具体的に、ライブラリーをクラス分けするために、26 番目、124 番目、171 番目、そして 297 番目のアミノ酸残基が見出された。そしてそれらはそれぞれ、Ala, Val, Val, Ala (パターン 1, AVVA), Ala, Phe, Val, Ala (パターン 2, AFVA), Ala, His, Leu, Ala (パターン 3, AHLA),

and Gly, Phe, Val, Ala (パターン 4, GFVA)の4つの組み合わせに分けられた(図 1A)。選抜の後、筆者らは以下のようにライブラリーをグループ分けした：パターン 1、2、3、4 でライブラリー内からそれぞれ 17、9、9、66 の遺伝子が選抜された (Figure 1A)。それぞれの遺伝子を用いて、ancestral sequence reconstruction (ASR)法にて4つの人工的な配列を設計した。設計された配列はパターンを基に、AVVA、AFVA、AHLA、GFVA と名付けられた(Figure 1A)。さらに、筆者らは AVVA、AFVA 及び GFVA の共通祖先配列として、“all”を追加し、計5種類の祖先型 BirA を設計した(supplementary table 1)。AVVA、AFVA、AHLA、GFVA はそれぞれ *Shewanella* genus、*Frischella* と *Gliamella* genera、*Thiobacillus* と *Betaproteobacteria* genera, そして multiple genera と似た配列を有する。AVVA、AFVA、AHLA、GFVA、“all”のアミノ酸配列は大腸菌の BirA と比べ、それぞれ 45、58、42、82、73%の相同性を有していた。加えて、BirA の活性領域(107-134 アミノ酸)は同じ配列であった。

4-2. 新たに設計された祖先型 BirA の酵素的特徴

設計した祖先型 BirA のアミノ酸配列を基にして、AVVA、AFVA、AHLA、GVFA、“all”の DNA 鋳型が人工遺伝合成により、調製された。設計されたアミノ酸配列を DNA の配列へ変換する際、*Arabidopsis plant* のコドン Usage を使用した。その理由としては、*Arabidopsis plant* の遺伝子は平均 AT 含量がおおよそ 50%であるためである(*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000)。さらに、すべての祖先型 BirA の N 末端に、ウサギモノクローナル抗体を基にした高感度なタグである AGIA タグを検出のために融合した(Yano, et al., 2016)。これら祖先

型 BirA の酵素的な特徴を調べるため、コムギ無細胞タンパク質合成系により (Sawasaki, et al., 2002)、各種 BirA タンパク質を合成した。すべての BirA が可溶性での合成を確認することができたため(Figure 1B)、引き続きビオチンリガーゼとしての活性を調べた。N 末端に大腸菌の BirA におけるビオチン化サイト(bls)(GLNDIFEAQKIEWHE)を融合した His-bls-FLAG-GST タンパク質を基質として使用した。祖先型 BirA の中で、AFVA、GFVA、"all"が bls へのビオチン化活性を示し、それらの中では GFVA が最も高い活性を示した。また、AVVA 及び AHLA は bls へのビオチン化活性を示さなかった。

設計された祖先型 BirA 全てにおいて、ビオチン化のための活性部位である 118 番目のアルギニン残基は保存されていたため(Supplement file 1)、BioID と同様に 118 番目のアルギニンをグリシンへと置換した変異体(RG mutant)を作製することで、近位依存性ビオチン化活性の獲得を試みた(Choi-Rhee et al., 2004)。近位依存性ビオチン化活性を評価するため、各種 BirA の wild type 及び RG mutant を p53 タンパク質の N 末端へ融合した(BirA-p53)。BirA-p53 をコムギ無細胞系にて合成し、p53 相互作用タンパク質である MDM2(Momand et al., 1992; Michael et al., 2003)の N 末端に FLAG タグ及び GST タンパク質を融合した FLAG-GST(FG)-MDM2 と混合することで、ビオチン化能を評価した。イムノブロットの結果、EcBirA-RG(BioID)、AVVA-WT、AVVA-RG、AFVA-RG、及び GFVA-RG において、p53 のビオチン化が確認された(Figure 1D)。また、同様に、AVVA-RG、AFVA-RG、及び GFVA-RG において FG-MDM2 のビオチン化が検出され、これらが BioID 酵素候補として選抜された。加えて、AVVA-RG、AFVA-RG、及び GFVA-RG の中で、AVVA-RG は最も高いビオチン化活性を示

したが、低分子領域にいくつかのエクストラバンドが確認された(“non-specific biotinylation” in Figure 1D)。対して、GFVA-RG は bls に対して最も高いビオチン化活性を示した酵素であり(Figure 1C)、BioID としての活性はそれほど高くないものの、エクストラバンドはほとんど確認されなかった。これらの結果から、筆者らは新規の酵素候補として AVVA と GFVA の 2 つに着目し、解析を行った。

4-3. 様々な条件下における祖先型 BirA RS 変異体の近位ビオチン化活性

最近、改良型 BioID 酵素として TurboID が報告された(Branon et al., 2018)。TurboID は近位ビオチン化活性を増加させるため、R118S の変異を導入されているため、筆者らは 2 種類の祖先型の RS 変異体を作製し、in vitro 及び in cell にて近位ビオチン化活性を比較した。N 末端に AGIA-BirA を融合した p53 タンパク質(AGIA-BirA-p53)と FG-MDM2 との相互作用を in vitro における活性評価に用いた。ビオチン化活性評価の条件として、温度、ビオチン濃度、反応時間が調べられた。結果として、時間においては、TurboID 及び AVVA-RG、AVVA-RS、GFVA-RS が BioID の 16 時間反応と同等以上の活性を 3 時間で確認することができた(Figure 2A)。さらに、RS 変異体によって、GFVA の活性は劇的に増加することも確認された(GVFA-RS in Figure 2A and Figure 2—figure supplement 1)。しかし、AVVA は RG 及び RS 変異体で大きな差は確認できなかった。また、温度条件の比較では、AVVA-RG、AVVA-RS 及び GFVA-RS は 16°C 以上の条件で、十分高い活性を示した(Figure 2—figure supplement 1A)。ビオチン濃度の比較においては、AVVA-RG、AVVA-RS 及び

GFVA-RS は 0.5 μ M 以上のビオチン濃度で高いビオチン化活性が確認できた。

これらの結果を受けて、AVVA-RG、AVVA-RS 及び GFVA-RS をさらなる解析に利用することとした。

これら 3 種類の酵素について、タンパク質間相互作用における近位ビオチン化能を評価するために、筆者らは、相互作用することが広く知られている I κ B α と RelA の相互作用をモデルとして用いた(Beg et al., 1992; Baeuerle et al., 1998)。P53-MDM2 の相互作用解析と同様に、N 末端に AGIA-BirA を融合した I κ B α (AGIA-BirA-I κ B α)及び FLAG-GST-RelA (FG-RelA)を作製し、評価した。この時、ネガティブコントロールとして、I κ B α と相互作用しない MDM2 が使用された。すべての酵素において同じ条件での反応を行なった結果、RelA のビオチン化ははっきりと確認されたのに対し、MDM2 は全くビオチン化されなかった(Figure 2B)。

4-4. 細胞内における祖先型 BirA の RS 変異体による近位ビオチン化

次に、細胞においてこれら 3 種類の近位ビオチン化活性が評価された。MDM2 は p53 タンパク質を激しく分解してしまうため、MDM2 の E3 ユビキチンリガーゼとしての活性を欠失させた CS 変異体(MDM2(CS))を用いて解析を行った。また、BirA-p53 と MDM2 が SDS-PAGE において非常に近い位置にバンドが確認されてしまうため、GFP 融合 MDM2 の CS 変異体(GFP-MDM2(CS))が使用された。AGIA-BirA-p53 を HEK293T 細胞へ一過的に発現させ、GFP-MDM2 及びビオチン添加の存在下、非存在下で評価を行った。ビオチンを添加しない条件下において、GFVA-RS が他の酵素と比べ、GFP-MDM2 へのビオチン化活

性が高いことが確認された(left panel in Figure 2—figure supplement 2)。さらに、GFVA-RS は、ビオチンを添加した条件下においても GFP-MDM2 のビオチンを誘導した。このことから、GFVA-RS は *in vitro* 及び *in cell* においてタンパク質間相互作用を解析するのに適した酵素であると考えた。筆者らは、この GFVA-RS を AirID (ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification)と命名した。

4-5. AirID の生化学的特徴

AirID を様々な解析にしようする前に、筆者らは AirID の自己ビオチン化と biotinoyl-5'-AMP 産生について調べた。p53 は homo multimer を形成することが報告されている(Friedman et al., 1993; Delphin et al., 1994)。BioID、TurboID、AirID の自己ビオチン化活性を評価するために、これらの酵素の p53 融合体と酵素単体をそれぞれ合成し、ビオチン化反応を行った。結果として、BioID 及び TurboID は酵素単体において自己ビオチン化が確認され、TurboID が最もその活性が高かった。対して、AirID は自己ビオチン化を引き起こさなかった(Figure 2—figure supplement 3)。TurboID は yeast-surface display によるスクリーニングで、自己ビオチン化の活性を基準にして見出された酵素であるため、TurboID が最も高い自己ビオチン化活性を示したという結果は妥当であると考えられる。

次に筆者らは、biotinoyl-5'-AMP の産生を調べた。大腸菌を用いて His タグ融合 TurboID、GFVA-RG、AirID を合成し、Ni ビーズを用いて精製した。各種タンパク質の精製度が確認され、同時にビオチン抗体による検出を行なった結

果、TurboID が大腸菌内で自己ビオチン化されている可能性が示唆された。Figure 2—figure supplement 3 に示されたのと同様に、AirID では、自己ビオチン化は確認されなかった。さらに、AirID のビオチン化活性を確認するため、精製した His-bls-FLAG-GST を用いて、bls のビオチン化を行なった結果、AirID と GFVA-RG は bls をビオチン化したものの、TurboID はその活性を有していないことが確認された(Figure 2—figure supplement 4B)。これらの酵素を用いて、biotinoyl-5'-AMP の産生を検出するため、放射性同位体標識された ATP(^{32}P - α -ATP)を用いて、過去の報告と同様の手法で解析を行った(Henke et al., 2014)。本アッセイにおいては、標識された ATP が十分使用されるようにするため、非標識の ATP は非常に低濃度(1 μM)で使用された。TurboID、AirID、GFVA-RG の全ての酵素において biotinoyl-5'-AMP 産生が確認されたが、その産生量は AirID>GFVA-RG>TurboID の順であり(Figure 2C)、少なくとも低濃度の ATP 条件下においては、AirID は TurboID よりも biotinoyl-5'-AMP 産生力が高いことが確認された。

4-6. 細胞における AirID の近位ビオチン化条件

筆者らは細胞内において BioID、TurboID 及び AirID の近位ビオチン化の最適条件を調べた。ビオチン化のモデルとして、AG1A-BirA-p53 と GFP-MDM2(CS) が使用された。これらのタンパク質を細胞内で一過的に発現させ、ビオチン濃度と反応時間が検討された。結果として、AirID は 3 時間、TurboID は 1 時間で 500 nM 以上の濃度のビオチン添加時に、MDM2 のビオチン化が明確に確認できた(Figure 2—figure supplement 5A and 5B)。その際、TurboID-p53 は 50

μM のビオチン濃度で、6 時間以上の反応において、高分子両側のビオチン化タンパク質のバンドが明らかに増加していたが、AirID-p53 は 0.5-50 μM ビオチン、3-24 時間反応の間で似たような結果が確認されたことから、AirID 融合タンパク質は幅広い条件で利用できる可能性が示唆された。

さらに、AirID-I κ B α と TurboID-I κ B α を用いて PPI 依存性が調べられた。

AirID-I κ B α あるいは TurboID-I κ B α と GFP が細胞にて共発現され、5 μM のビオチン添加後に 1、3、6、24 時間反応を行いストレプトアビジンビーズによるプルダウンを用いてビオチン化されたタンパク質を回収・検出した。Input にて示されたように、AirID-I κ B α 及び TurboID-I κ B α 共に同程度に発現しており、TurboID は AirID よりも極めて高いビオチン化能を示した(left panel in Figure 2D)。プルダウンにおいては、すべての処理区で内在の RelA が確認された。TurboID-I κ B α では、1 時間以上の反応で GFP が、3 時間以上の反応で tubulin までもがビオチン化されていることが確認されたが、AirID-I κ B α では 24 時間反応でさえ、それらのバンドは確認されなかった。この結果から、AirID は PPI 依存性の極めて高い酵素であることが示唆された。

4-7. タンパク質間相互作用における AirID 依存性ビオチン化の生化学的応用

筆者らは次に *in vitro* における様々な解析に AirID を使用した。P53-MDM2 の相互作用は Nutlin-3 によって阻害されることが報告されている(Vassilev et al., 2004)。AirID が PPI 阻害剤の評価に利用可能であるかどうかを調べるため、この Nutlin-3 を用いた。結果として、AG1A-AirID-p53 による FG-MDM2 のビオチン化が Nutlin-3 によって阻害可能であることが示された(Figure 3A)。筆者

らは過去の報告において PPI の薬剤スクリーニングを AlphaScreen により行っている(Uematsu et al., 2018; Nemoto et al., 2018)。この AlphaScreen を用いて、上述の薬剤依存的なビオチン化の阻害効果を検出した。その結果、AGIA-AirID-p53 による FG-MDM2 のビオチン化及び Nutlin-3 によるその阻害効果が確認された(Figure 3C)。これらの結果から、AirID は薬剤による PPI 阻害の検出に利用可能であることが示された。

Thalidomide 及び Pomalidomide のようなその類縁体は cereblon(CRBN)に結合し(Ito et al., 2010; Lopez-Girona et al., 2012)、IKZF1(Lu et al., 2014; Krönke et al., 2014)や SALL4(Matyskiela et al., 2018)のような標的タンパク質の分解を誘導する。これらの低分子化合物は molecular glue と呼ばれている(Fischer et al., 2016)。CRBN の YW/AA 変異体は Thalidomide への結合能を欠失させた変異体であり(Ito et al., 2010)、IKZF1 や SALL4 と相互作用しない。

In vitro にて薬剤依存的な PPI を AirID が検出できるかどうかを調べるために、Pomalidomide 存在下あるいは非存在下において、CRBN-IKZF1 及び CRBN-SALL4 の相互作用が使用された。結果として、AGIA-AirID-CRBN (WT)によって FG-IKZF1 及び FG-SALL4 のビオチン化が Pomalidomide 存在下で増加することが確認されたのに対して、AGIA-AirID-CRBN (YW/AA)においては確認されなかった(Figure 3D)。これらのことから、AirID は in vitro における薬剤依存的な PPI の検出に利用可能であることが示唆された。さらに、AGIA-AirID-CRBN によるこれらのビオチン化を細胞において調べた。Myc タグ融合 IKZF1 (myc-IKZF1)及び SALL4 (myc-SALL4)を AGIA-AirID-CRBN の WT あるいは YW/AA と共に CRBN ノックアウト HEK293T 細胞へ一過的に共

発現した。5 μ M のビオチン添加によって、AGIA-AirID-CRBN(WT)発現時に myc-IKZF1 及び myc-SALL4 は共にビオチン化されていた。一方で、AGIA-AirID-CRBN(YW/AA)発現時には、それらのビオチン化は検出されなかった(Figure 3—figure supplement 1)。これらの結果から、AirID は細胞を用いた薬剤依存的な PPI の検出に利用可能であることが示唆された。

CRBN は DDB1 及び RBX1、CUL4 と CRL4 複合体を形成する(Fischer et al., 2014)。AirID が複合体タンパク質を検出可能かどうか確かめるため、AirID-CRBN とそれらのタンパク質を混合した。結果として、AGIA-AirID-CRBN による DDB1、CUL4、RBX1 のビオチン化が確認されたのに対し、AGIA-AirID ではそれらは確認されなかった(Figure 3E)。このことから AirID が複合体形成タンパク質における PPI の検出に利用可能であることが示された。

Flowering locus T (FT)タンパク質は植物において花芽形成ホルモンのフロリゲンとして知られており、bZip DNA-binding ドメインを有する Flowering locus D と共に花芽分化を誘導するタンパク質である(Abe et al., 2005)。花芽分裂組織における FT-FD 相互作用は花芽育成において非常に重要だと考えられている(Jaeger et al., 2006)。AirID によってこの FT-FD の相互作用が検出可能であるかどうかを調べるため、シロイヌナズナの FT 及び FD が使用された。AirID-FT と AGIA-FD をコムギ無細胞タンパク質合成系において 500 nM のビオチン存在下で共発現させた。ネガティブコントロールとして、FT-AirID と AGIA-DHFR を同様の条件で共発現させた。この条件下において、FT-AirID は AGIA-FD をビオチン化したが、DHFR はビオチン化しなかった(Figure 3—figure

supplement 2)。この共発現条件では 16°C で 16 時間反応が行われており、コムギ無細胞系での共発現条件においても AirID は利用可能であることが確認された。これらの結果から、AirID は PPI の生化学的解析に役立つ酵素であることが示された。

4-8. AirID 及び AirID-p53 の細胞内局在

次に筆者らは AirID 及び AirID によるビオチン化の細胞内局在を解析した。p53 タンパク質は細胞内において核に局在することが知られている (Shaulsky et al., 1990; Rotter et al., 1983)。AGIA-AirID 単体及び AGIA-AirID-p53 を HEK293T 細胞で発現させ、ビオチン添加後、蛍光ストレプトアビジンによるビオチン化タンパク質の検出を行った (50 μ M in Figure 4A)。AirID-p53 発現細胞において、蛍光は主に核で確認され、その強度は 5 μ M 及び 50 μ M ビオチンでほとんど同じであった (Figure 4A)。上述の免疫染色の結果を受け、さらに細胞内局在を確認するために、細胞質画分及び核画分の単離を行い、Immunoblot による検出を行なった。これらの画分において、AirID と AirID-p53 はそれぞれ細胞質と核に存在することが確認された (Figure 4B)。このことから、AirID 融合タンパク質の局在は融合されたタンパク質の性質に依存することが示唆された。

4-9. AirID によってビオチン化されたタンパク質の機能

筆者らは次に、AirID によってビオチン化されたタンパク質が元の機能を有しているかどうかを確認した。MDM2 は細胞内においてユビキチンプロテアソームシステムを介して p53 を分解することが知られている (Michael et al., 2003)。

AirID-p53 は GFP-MDM2(CS)及び AirID-p53 自身をビオチン化することも確認された(Figure 2A)。そこで AirID-p53 と GFP-MDM2(WT)を細胞内で共発現させ、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下、非存在下での AirID-p53 の分解を確認した。結果として、MG132 によって AirID-p53 の分解は阻害されたが、MG132 非存在下では AirID-p53 は激しく分解された(Figure 4C)。Figure 2A において示されたように、MDM2 の不活性化型である GFP-MDM2(CS)においては AirID-p53 の分解を促進しないことから、AirID-p53 が GFP-MDM2(WT)によって分解されたことが示された。さらに MG132 処理時には AirID-p53 のビオチン化も確認されている。これらの結果から、ビオチン化された AirID-p53 に対して、MDM2 は E3 リガーゼとして機能することが可能であると示された。次に、ビオチン化された転写因子の転写活性化能を調べるため、NF- κ B プロモーターへの転写活性化能を有する転写因子である RelA を使用した(Ganchi et al., 1992)。2 種類の発現ベクター AGIA-AirID-RelA と AGIA-RelA を構築し、NF- κ B プロモーター融合ルシフェラーゼベクターと共に、HEK293T 細胞へとランスフェクションを行なった。ビオチンを添加することで、AGIA-AirID-RelA はビオチン化されたが、AGIA-RelA はビオチン化されないことを確認した(Figure 4D)。さらに、ビオチン添加後、ルシフェラーゼアッセイも行なった結果、AGIA-AirID-RelA と AGIA-RelA はほぼ同じシグナルを示したことから、ビオチン化された RelA は通常の RelA と同じ活性を示すことが確認された。

4-10 細胞増殖における AirID の影響

TurboID は 50 μM のビオチン添加条件において、HEK293T 細胞の増殖を大きく阻害することが報告されている(Branon et al., 2018)。そこで、AirID または AirID-I κ B α を安定的に発現した HEK293T 細胞をレンチウイルスシステムにより作製し、HEK293T 細胞の増殖への影響を調べた。AirID-I κ B α 安定発現細胞において、50 μM ビオチン、6 hr の反応によって、RelA のビオチン化を確認することができたが、AirID 発現細胞においては、RelA のビオチン化は確認できなかった(Figure 4—figure supplement 1)。さらに、細胞の増殖に関して、50 μM のビオチン添加条件においても、阻害は確認されなかった(Figure 4E)。このことから、AirID は細胞毒性をほとんど有さない酵素であることが示唆された。TurboID は 50 μM のビオチン添加時、48 hr 以内に細胞毒性を示すことが報告されている(Branon et al., 2018)。そこで、AirID または TurboID を一過的に発現させた細胞を用いて、ビオチンの存在下、非存在下で 48 時間後の細胞性生存を調べた。Control(Mock)と比較して、TurboID 発現細胞の生存率は有意に減少したが、AirID 発現細胞の生存率に関して有意な影響は見られなかった(Figure 4—figure supplement 2)。

4-11 細胞における AirID による内在性タンパク質のビオチン化

次に筆者らは AirID が相互作用依存的に細胞内在のタンパク質をビオチン化できるかどうかを調べた。細胞ライセートからビオチン化されたタンパク質を回収するために、過去の報告と同様にストレプトアビジン融合ビーズが使用された(Van Itallie et al., 2013)。AGIA-AirID-I κ B α をいくつかのビオチン濃度で HEK293T 細胞へ一過的に発現させ、ストラプトアビジンプルダウン及び特異

的抗体によるビオチン化タンパク質の検出を行なった。AGIA-AirID-I κ B α を一過的に発現させることで、ビオチン添加なしで RelA タンパク質のビオチン化が確認された(IB: RelA, 0 μ M biotin conc. in Figure 5A)。さらに、ビオチンを添加することによって、I κ B α と相互作用することが知られている p50 及び p105 のビオチン化が促進された(IB: p50/p105 and p50, 5 or 10 μ M biotin conc.)。また、これらのビオチン化は AGIA-AirID 単独では確認されなかった。この結果から、AGIA-AirID-I κ B α はビオチンを添加せず、内在のビオチンのみで細胞内存在性相互作用タンパク質 RelA のビオチン化ができる可能性を示している。さらに RelA がビオチン化されていることを実証するために、ビオチン化反応後、1%SDS を用いて相互作用を乖離させ、RelA 抗体を用いて内在の RelA を回収した。回収した RelA をビオチン抗体により検出した。結果として、RelA 抗体を用いた免疫沈降により内在 RelA が回収され、ビオチン抗体によっても検出された(Figure 5B)。同様のライセートからストレプトアビジンプルダウンにより、ビオチン化タンパク質の回収も行い、RelA 抗体によりバンドも確認されたことから、RelA が AGIA-AirID-I κ B α 依存的にビオチン化されていることが示された。CRL4^{AirID-CRBN}において関連タンパク質のビオチン化が *in vitro* にて確認されたため(Figure 3E)、筆者らは AirID 融合 CRBN による CRL4 複合体のビオチン化を細胞にて行なった。AGIA-AirID-CRBN を HE293T 細胞に一過的に発現させ、細胞ライセートを、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンした。5 μ M のビオチン添加により、CUL4 及び RBX1 のビオチン化は確認されたが、DDB1 のビオチン化は確認できなかった(Figure 5C)。これらの結果から、AirID 融合タンパク質を用いたビオチン化は、細胞内での PPI 解析に役立つ

ールであることが示された。

4-12. AirID-IκBα 依存的にビオチン化されたタンパク質の質量分析解析

BioID は質量分析を用いた PPI の同定に幅広く利用されている(Ikeda et al., 2019)。そのため、筆者らもまた、AirID 単独または AirID-IκBα 発現細胞を用いて、LC-MS/MS によるビオチン化タンパク質の解析を行なった。ビオチン化されたペプチドを解析するフローチャートを Figure 6A に示した。これらの細胞は 50 μM ビオチンを 6 時間処理された。細胞を破碎後、タンパク質をトリプシンによって切断し、ビオチン化されたペプチドを Tamavidin®2-Rev により回収した。Tamavidin®2-Rev はビオチン標識された基質を結合・回収し、高濃度のビオチンによりそれを溶出することが可能である(Takakura et al., 2013)。この活性を用いて、ビオチン化ペプチドを 2 mM のビオチンで溶出し、溶出したペプチドを LC-MS/MS により解析した。biotinoyl-5'-AMP によるビオチン化はタンパク質上の Lys 残基上にビオチンを付加する(Choi-Rhee et al., 2004)。そしてトリプシンはリジン残基またはアルギニン残基を切断するが、ビオチン化リジンのような修飾されたリジン残基は切断できない(Bheda et al., 2019)。これらの特徴から、溶出されたペプチドがビオチンを有していることが分かり、ペプチド上のビオチン化サイトを決定づけることが可能となる。この手法を用いて、筆者らは AirID 単独と比較し存在比が 5 倍以上のペプチド 12 種類を見出した(Figure 6B and 6C, supplementary Table 1)。上位 5 種類のペプチドの中には、RelA 由来のペプチドが 3 種類存在しており(Figure 6C)、AirID-IκBα が細胞内において、主要な相互作用タンパク質である RelA をビオチン化している

ことが示唆された。さらに、筆者らは AirID 依存的なビオチン化が行われる際、特徴的な領域をビオチン化しているのかどうかを調べた。上位 20 種類のビオチン化ペプチド間において、ビオチン化リジン残基前後のアミノ酸配列を比較したところリジン残基を除き、特徴的な配列を見出すことはできなかった(Figure 6—figure supplement 1)。このことから、AirID によるビオチン化は配列に依存的することなくリジン残基上に行われると考えられる。

Figure 5A において、ストレプトアビジンプルダウンにより、一過的に AirID-I κ B α を発現した細胞において、内在の RelA がビオチン化されることを示した。筆者らは次に、AirID-I κ B α を一過的に発現した細胞であっても、LC-MS/MS により AirID-I κ B α 依存的な RelA のビオチン化が検出可能であるかどうかを調べた。恒常発現細胞の時と同様に、一過的に AirID-I κ B α 発現細胞を用いて解析した結果、期待通り、上位のビオチン化ペプチドとして RelA 由来のペプチドが確認された(Figure 6E)。これらの結果から、LC-MS/MS を用いた AirID 依存的なビオチン化は細胞内の PPI 解析に役立つことが示唆された。

4-13. 新規抗体依存性ビオチン標識技術 AGIAiD の開発

筆者が所属する研究室では AirID の応用として、抗体と AirID の融合を試みている。AirID は約 30 kDa のタンパク質であるため、直接的に AirID を標的タンパク質へ融合すると、融合タンパク質の構造や相互作用に影響を及ぼす可能性がある。抗体と AirID の融合は抗体の高い特異性を利用して、抗体が結合したタンパク質及び、その相互作用タンパク質のビオチン化を可能とする(Figure 7A)。そのため、AirID 融合タンパク質の恒常発現やノックインすることなしで相互

作用タンパク質の解析が可能となる。この技術は、特に受容体解析などにおいて役立つ可能性が高い。高親和性のウサギモノクローナル抗体 AGIA 抗体(Yano, et al., 2016)を用いて、その Fab 抗体へ AirID を融合させた(AGIAiD)。AGIAiD は研究室に所属していた塩屋亮平氏が構築し、筆者は構築された AGIAiD の機能や有用性の評価を行った。まず、AGIA タグへの十分な結合能を有していることを確認するために、精製した AGIA タグ融合 GST をセンサーチップ上に固定し、AGIAiD の親和性を、Biacore を用いて測定した。結果として AGIAiD の親和性は $K_D = 1.91 \times 10^{-8}$ M であった(Figure 7B)。AGIA 抗体及び AGIA Fab の K_D はそれぞれ 2.65×10^{-9} と 1.04×10^{-8} であることから(Figure 7—figure supplement 1)、AGIAiD は十分な結合能を有していることが示された。コムギ無細胞タンパク質合成系により合成した AGIA-p53 及び FLAG-GST-MDM2 のビオチン化を試みた。結果として、p53 及び MDM2 のビオチン化を確認することができた(Figure 7C)。また、大腸菌を用いて、AGIA-His-TNF α 及び His-TNF α を合成し、精製した。精製した TNF α を HeLa 細胞へ添加し、30 min 後にビオチンと ATP、AGIAiD を添加した。6 hr のインキュベート後、細胞を回収し、ストレプトアビジンプルダウンを行い、TNFR1 がビオチン化されているかどうかをイムノブロットにより検出した。結果として、TNFR1 のビオチン化を検出することはできなかつた。そこで、TNF α を HeLa 細胞へ添加し、30 min 後に細胞を回収し、Lysis buffer (1% Triton X-100、50 mM HEPES-NaOH (pH7.5)、100 mM NaCl)を用いて細胞を破碎した。そのライセートへビオチンと ATP、AGIAiD を添加し、6 hr、26°C で反応させた。結果として、この手法でもビオチン化を確認することはできなかつた。現在、このアッセイについては、条件

検討を行っている。

5. 考察

筆者らは巨大なゲノムデータベースを用いて、祖先型酵素の再構成アルゴリズムを利用することで、5つの祖先型 BirA を獲得した。さらに、そこから生化学的な実験を組み合わせることで、祖先型 BirA の RS 変異体として PPI 解析に適した近位依存性ビオチン化酵素 AirID の開発に成功した。これまでの進化学的タンパク質工学においては活性をかく利用するために PCR などによるランダム変異を用いる手法が一般的であった(Branon et al., 2018)。しかし、PCR によるランダム変異では、極端な配列の変化を行うことは不可能であるため、配列の相同性は極めて高い(90%以上)。今回筆者らが用いた手法においては、40%-80%の相同性を有する酵素が獲得されている。このことから、本研究のようなコンピューターを用いた酵素改変アプローチは、既存のものとは全くことなる性質の酵素を設計できる可能性が示唆された。本研究にて用いたアプローチにおける特徴として、BirA の活性領域(115GRGRRG121) (Kwon and Beckett, 2000) が保存されていることにある。そしてこの活性領域の変異体(RG 及び RS)を作製することで、既存の報告と同様に近位依存性ビオチン化能の獲得にも成功している。

このことから、本手法は、活性ポケットを保存したままタンパク質の骨格領域を大幅に変えることが可能であると考えられる。さらに大幅に酵素活性領域を変えるためには、酵素機能と配列に関する知識の蓄積が必要とされるだろう。

BioID と TurboID、AirID において、BioID のビオチン化活性は AirID 及び TurboID よりも低いと考えている (Figure 2A and Figure 2—figure supplement 1)。対して、TurboID は最も高いビオチン化活性を有している (Figure 2A and Figure 2—figure supplement 1)。この酵素は 1 時間以内、最短

10 分でのビオチン化を可能としている(Branon et al., 2018)。しかし、TurboID の活性は高すぎるために、長時間のビオチン化反応や高濃度のビオチン存在下では、非相互作用タンパク質のビオチン化(Figure 2D)や細胞毒性を誘導してしまう(Figure 4—figure supplement 2)ため、制御の難しい酵素である。TurboID が開発された論文の中でも、PPI に対する近位依存性ビオチン化酵素というよりビオチン標識酵素としての利用が想定されている(Branon et al., 2018)。PPI 解析に利用する場合、TurboID は精密な時間制御や条件検討が必要とされる可能性がある。

AirID の場合、24 時間の反応においても非相互作用タンパク質(Figure 2D における GFP 及び Tubulin)のビオチン化は確認されておらず、細胞毒性も見られない(Figure 4—figure supplement 2)。ストレプトアビジンプルダウンアッセイや LC-MS/MS 解析を用いて、AirID を一過的に発現させた細胞や恒常的に発現させた細胞どちらにおいても既知の相互作用タンパク質を検出することにも成功している(Figures 5 and 6)。また、biotinoyl-5'-AMP の形成は、1 μ M という低濃度の ATP 存在下では、TurboID よりも AirID の方が多い(Figure 2—figure supplement 4C)。さらに、AirID はビオチン濃度の要求性も低い(細胞においては、5 μ M ビオチンまたはビオチン添加なし) (Figure 2—figure supplement 2)。加えて、LC-MS/MS からビオチン化サイトの嗜好性もなく、近傍の Lys 残基上にビオチンを付加する(Figure 6—figure supplement 1)。これらのことから、筆者らが開発した AirID は PPI 依存的なビオチン化の正確性を高めることが期待でき、PPI 解析に適した酵素であると考えている。

Nutlin-2 による MDM2-p53 相互作用の阻害を、AirID を用いて検出すること

に成功した(Figure 3A 及び C)。そして、Pomalidomide 依存的な CRBN とネオ基質間の相互作用も AirID により検出可能であった(Figure 3D)。これらの結果から、AirID 依存的なビオチン化は化合物を介した PPI 解析に役立つことが期待される。さらに、BioID を用いた *in vivo* でのビオチン化解析が多くの研究で行われている(Odeh et al., 2018; Motani and Kosako, 2018)。AirID は幅広い反応条件で利用可能であり、毒性も示さないため、条件の調整が困難な *in vivo* における解析に極めて適した酵素であると考えられる。結果として、AirID は PPI 解析における強力なツールとなることが期待できる。

AGIAiD を用いた抗体依存的なビオチン化は AirID の応用の一つである。AGIAiD を用いて AGIA タグタンパク質及びそれに相互作用するタンパク質のビオチン化に成功すれば、AirID のような巨大なタンパク質ではなく、僅か 9 アミノ酸の AGIA タグを融合するだけで、相互作用解析が可能となる。さらに、AGIA 抗体に限らず、ウイルスや細菌を検出する抗体へ AirID を融合させることで、それらの受容体をビオチン化することが可能となる。そのため、受容体探索への大きな貢献が期待される技術でもある。現在、リガンドを介した受容体のビオチン化を検出することはできていない。この理由として、ビオチン化可能な領域に Lys 残基が存在しない可能性が考えられる。これは BioID 法の最大の弱点とも言える点である。この問題を解決するために、AirID の可動域を増加させるためのリンカーの検討や AirID を用いた受容体解析に適した実験系の構築など、さらなる改良が必要であると考えられる。

6. 図・表

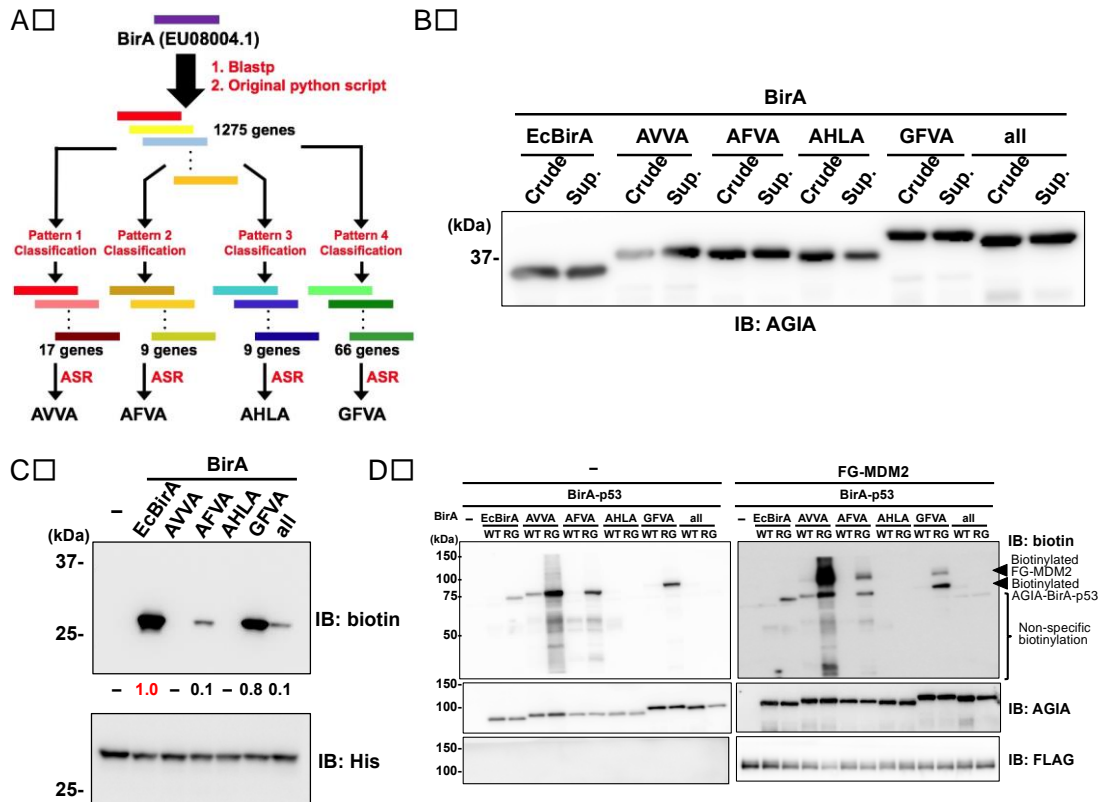


Figure 1. メタゲノムデータを用いた新規 BirA 酵素の特徴

(A)大腸菌由来のホモログライブラリーを、blasp を用いて作製し、オリジナルの python スクリプトを用いてそれを整理した。整理されたライブラリーを、INTMSAlign を用いてアライメントし、配列を 4 つのグループに分けた。各グループの系統解析を行うことで、祖先型配列を設計した。(B) コムギ無細胞系を用いて AGIA タグ融合 BirAs を合成し、それらの発現をイムノプロットにより確認した。(C) His-bls-FLAG-GST を合成する際に、各 BirA を添加し、bls のビオチン化を試みた。それぞれのビオチン化をビオチン抗体により検出し、タンパク質の発現を His タグ抗体により検出した。

His-bls-FLAG-GST のビオチン化のバンド強度を、image J を用いて定量した。基準となるバンド強度を赤字で示している。(D) 各種 BirA の WT または RG 変異体を p53 へ融合した。BirA-p53 について、FLAG-GST-MDM2 の存在下または非存在下にてビオチン

化活性を解析した。ビオチン化をビオチン抗体で検出し、タンパク質の発現を AGIA 抗体及び FLAG 抗体で確認した。

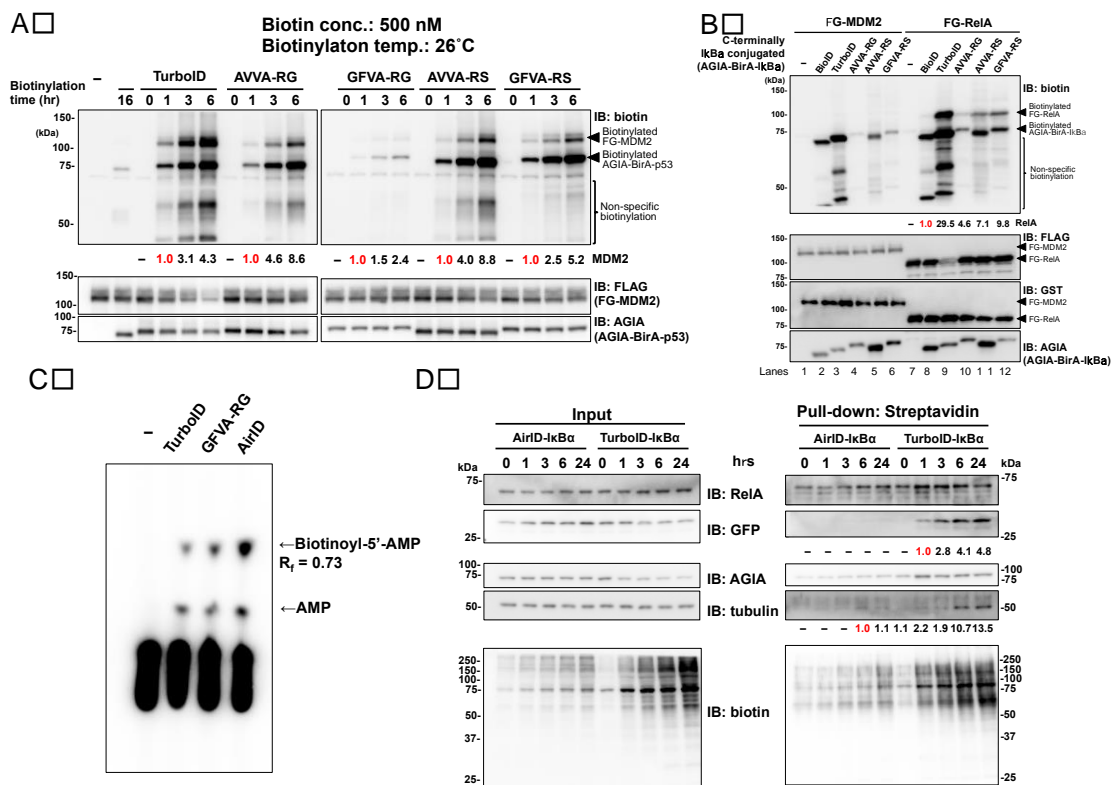
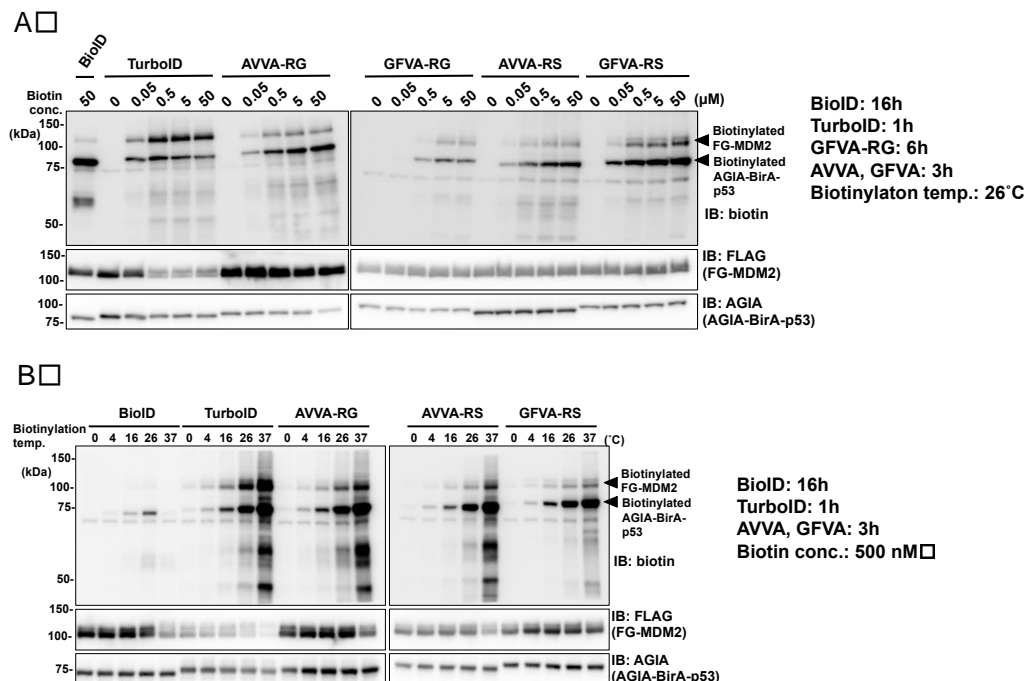


Figure 2. 新たに設計された BirA 酵素における PPI 依存性の検証

(A) AVVA 及び GFVA の RS 変異体が作成され、RS 変異体を含む BirA-p53 により FLAG-GST-MDM2(FG-MDM2)のビオチン化が解析された。500 nM のビオチン存在下、26°C で図に記述された時間で反応を行った。ビオチン化はビオチン抗体を用いて検出し、MDM2 及び p53 の発現は AGIA 抗体及び FLAG 抗体で検出した。Image J を用いて、MDM2 のビオチン化におけるバンド強度を定量した。基準となる強度を赤字で示している。(B) BirA-IkBα による FG-RelA のビオチン化を調べた。ネガティブコントロールとして FG-MDM2 を用いた。ビオチン化反応は 500 nM のビオチン存在下で 26°C、1 hr (TurboID)、3 hr (AVVA-RG、AVVA-RS、GFVA-RS)、または 16 hr (BioID)行われた。BirA-p53 と MDM2 の発現を AGIA 抗体及び FLAG 抗

体、GST 抗体で確認した。ビオチン化された RelA のバンド強度を、image J を用いて定量した。基準となる強度は赤字で示した。(C) 大腸菌で発現させた GFVA-RG 及び GFVA-RS を Ni ビーズにより精製した。さらに、His-bls-FLAG-GST をコムギ無細胞系により合成し、グルタチオンビーズで精製した後、GFVA-RG 及び GFVA-RS と混合した。混合液へ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と非標識 ATP 及びビオチンを添加し、 37°C で 30 min インキュベートした。産生した biotinyl-5'-AMP 及び未反応の ATP を、薄層クロマトグラフィー(TLC)により分離し、検出した。(D) GFP と AirID-I κ B α または TurboID-I κ B α を HEK293T にてトランスフェクションした。そして、ビオチンを 5 μM の濃度で添加し、記述された時間処理した。24 時間後、細胞を、protease inhibitor を含む RIPA buffer で破碎した。ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズによりプルダウンした。各種タンパク質の発現は各タンパク質の特異的抗体を用いて検出した(left panel)。プルダウンされた GFP と Tubulin のバンド強度を image J により定量した。基準となる強度は赤字で示した。



BioID、TurboID、AAVA-RG、GFVA-RG、AVVA-RG、AVVA-RS 及び GFVA-RS を p53 へ融合し、それらを用いて FG-MDM2 のビオチン化を行った。In vitro におけるビオチン化に関して、(A)ビオチン濃度と(B)反応温度を比較した。BirA-p53 及び MDM2 の発現は AGIA 抗体と FLAG 抗体を用いて検出した。

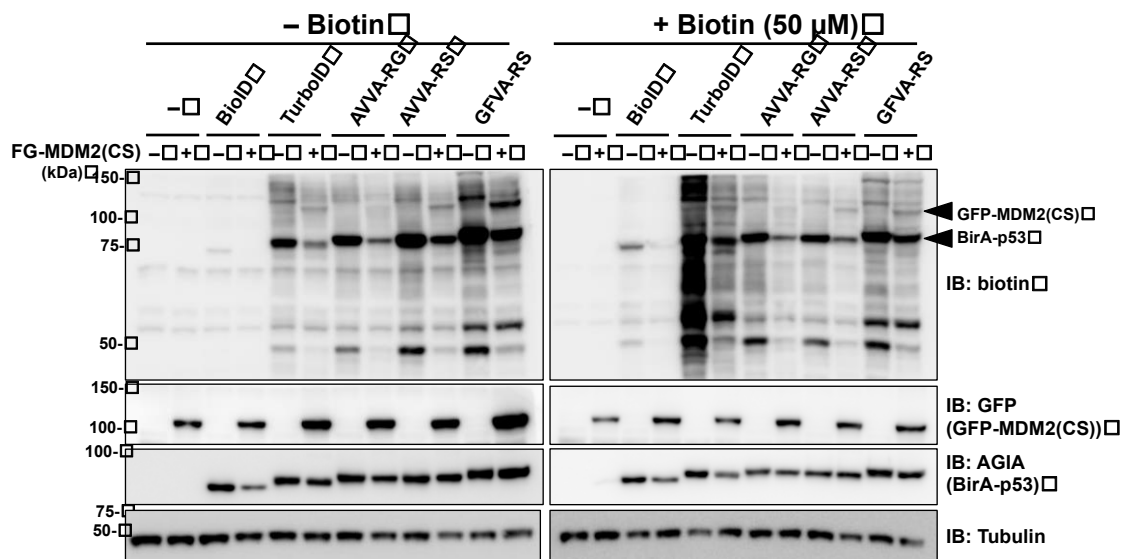


Figure 2—figure supplement 2. BirA-p53 による MDM2 の細胞内ビオチン化の比較
 BirA-p53 を過剰発現した HEK293T 細胞において、GFP-MDM2(CS 変異体)及び 50 μ M のビオチンそれぞれの存在下、非存在下でビオチン化タンパク質を検出した。ビオチン化 p53 及び MDM2 をビオチン抗体により検出した。また、BirA-p53 及び MDM2 の発現は、AGIA 抗体及び GFP 抗体を用いて検出した。

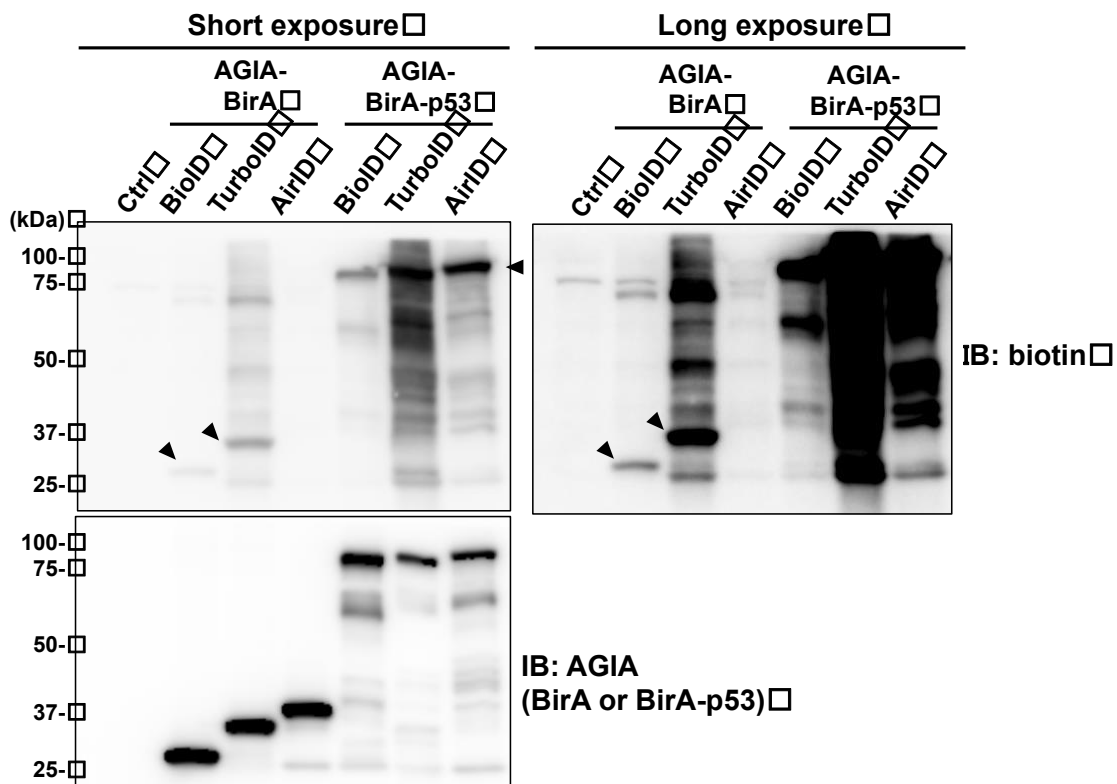


Figure 2—figure supplement 3. 新規ビオチン化酵素の自己ビオチン化活性

各 BirA 及び BirA-p53 をコムギ無細胞系により合成し、ビオチンを 500 nM の濃度で添加した後、26°C で一晩インキュベートした。反応後、SDS-sample buffer を mixture に添加し、自己ビオチン化の程度をイムノブロットにより解析した。矢印は自己ビオチン化のバンドを示している。タンパク質の発現は AGIA 抗体により確認した。

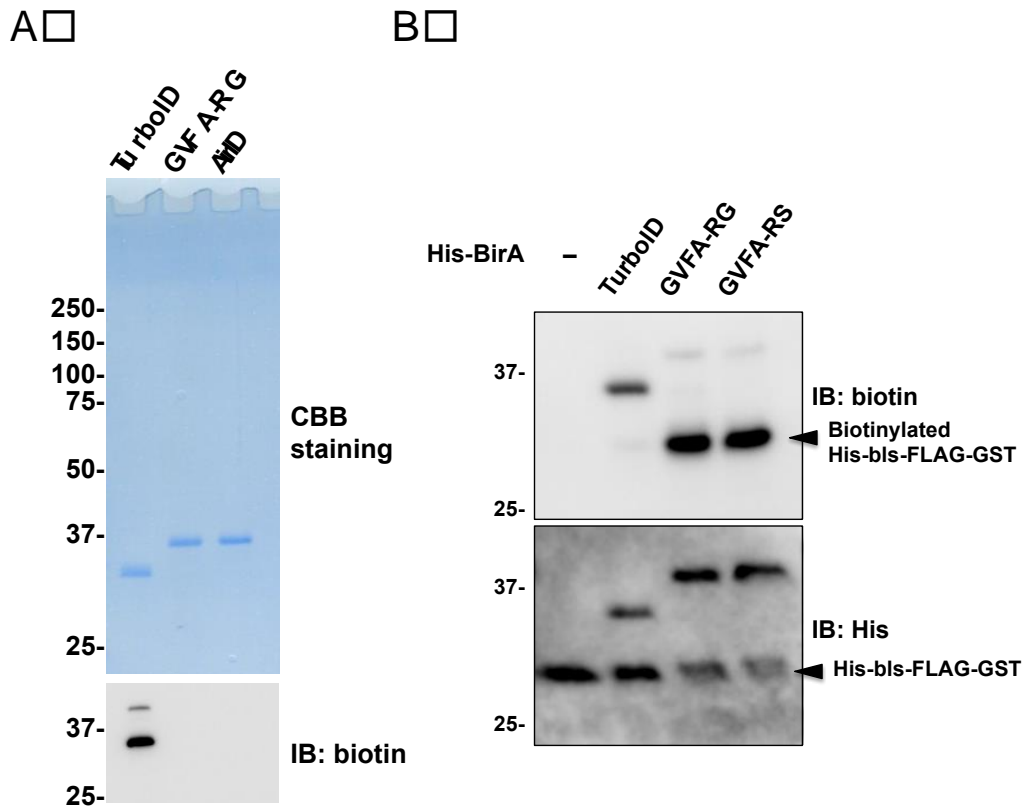
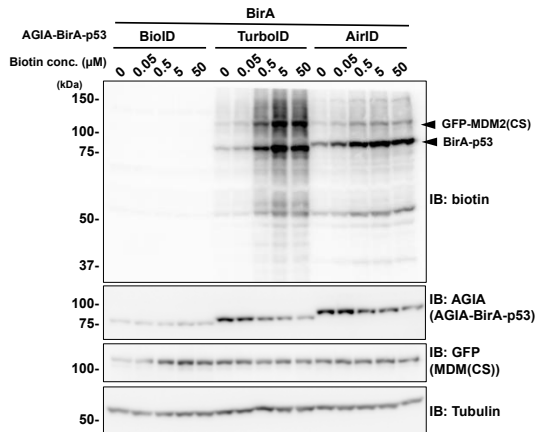


Figure 2—figure supplement 4. GFVA-RG と AirID (GFVA-RS)、TurboID 間の酵素活性比較

GFVA-RG と AirID (GFVA-RS)、TurboID を合成した。合成タンパク質を精製し、CBB 染色により精製度を確認した(panel A, top)。さらに精製タンパク質をビオチン抗体により検出し、ビオチン化されているかどうかを調べた(panel A, bottom)。(B) His-bls-FLAG-GST を精製した TurboID または GFVA-RG、GFVA-RS にてビオチン化し、ビオチン抗体によりビオチン化を検出した。タンパク質の発現を His 抗体にて検出した。

A□



B□

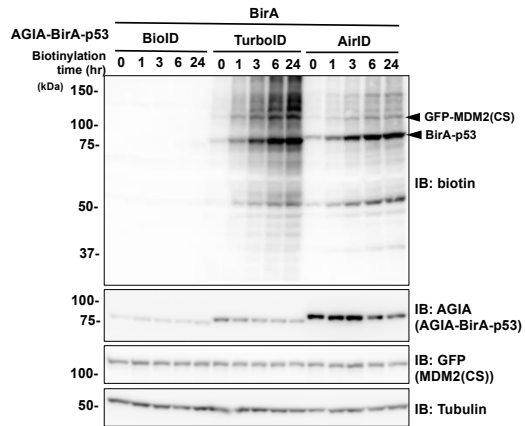
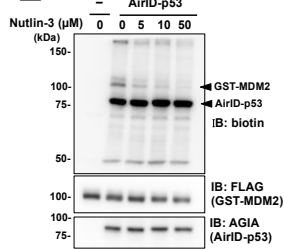


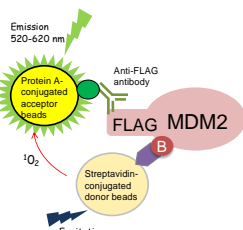
Figure 2—figure supplement 5. 細胞内における AirID 依存的ビオチン化条件の最適化

BioID-または TurboID-、AirID-p53 を用いて、GFP-MDM2 のビオチン化を検出した。 (A) ビオチン濃度および (B) ビオチン化時間の条件を調べた。 BirA-p53 の発現と GFP-MDM2 の発現をそれぞれ AGIA 抗体と GFP 抗体を用いて検出した。

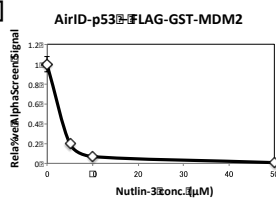
A□



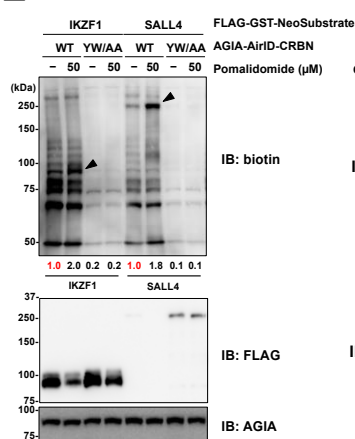
B□



C□



D□



E□

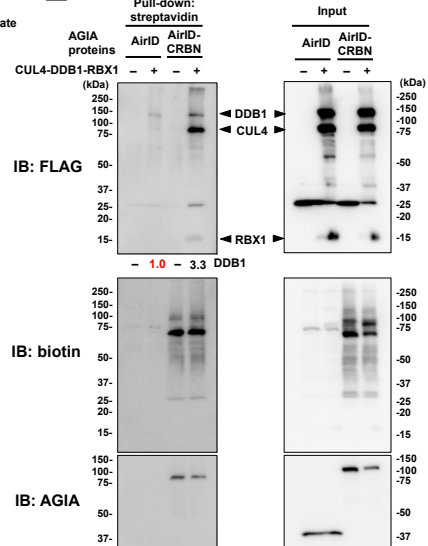


Figure 3. PPI における AirID 依存的ビオチン化の生化学的応用

(A) AirID-p53 による FG-MDM2 のビオチン化を、p53-MDM2 の阻害剤である Nutlin-3 の存在下、非存在下で行った。反応条件はビオチン濃度 500 nM、26°C、3 hr で行った。ビオチン化 MDM2 は免疫ブロットにて行った。BirA-p53 と MDM2 の発現を AGIA 抗体及び FLAG 抗体で検出した。(B) MDM2 のビオチン化を、(A) における反応液に対して、AlphaScreen にて検出した。ビオチン化した MDM2 は、ストレプトアビジンドナービーズ及び FLAG 抗体を結合したプロテイン A アクセプタービーズと相互作用する。AlphaScreen の結果は(C)に示した。(D) AirID-CRBN による Pomalidomide 依存的な FG-IKZF1 及び FG-SALL4 のビオチン化を解析した。500 nM ビオチン、26°C、3 hr の条件で、Pomalidomide 存在下、非存在下において FG-IKZF1、FG-SALL4 をビオチン化した。AirID-CRBN における Pomalidomide と結合しない YW/AA 変異体をネガティブコントロールとして用いた。AirID-CRBN 及び IKZF1、SALL4 の発現を AGIA 抗体と FLAG 抗体を用いて検出した。ビオチン化 IKZF1 または SALL4 のバンド強度は image J により定量した。基準となるバンド強度は赤字で示した。(E) AirID または AirID-CRBN を用いて、CRL4^{CRBN} 複合体タンパク質をビオチン化した。ビオチン化したタンパク質はストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンした。AirID-CRBN と複合体タンパク質の発現は AGIA 抗体及び FLAG 抗体により検出した。ビオチン化された DDB1 のバンド強度を image J で定量した。基準となるバンド強度は赤字にて示した。

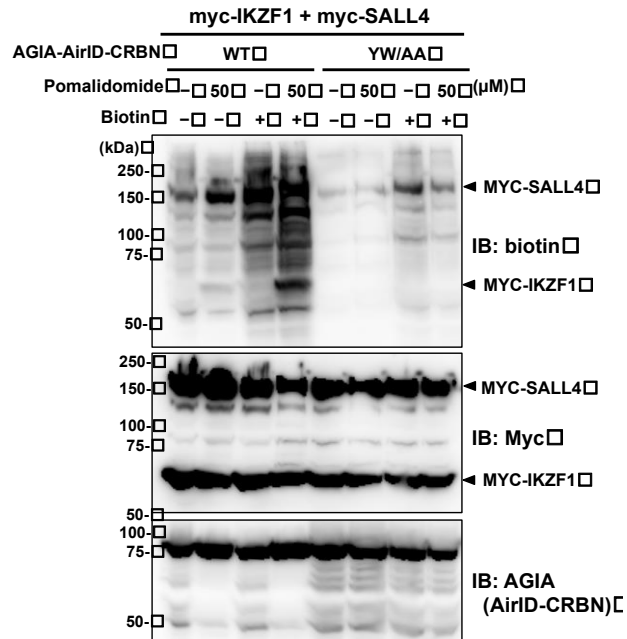


Figure 3—figure supplement 1. Pomalidomide を用いた IKZF1 と SALL4 の CRBN 依存的なビオチン化

AGIA-AirID-CRBN と myc-IKZF1、myc-SALL4 を HEK293T 細胞内で共発現させた。Pomalidomide と MF132 を 6 hr 処理後、ビオチンを添加し、免疫ブロットによりビオチン化を検出した。AirID-CRBN と IKZF1 及び SALL4 の発現は AGIA 抗体と myc 抗体を用いて検出した。

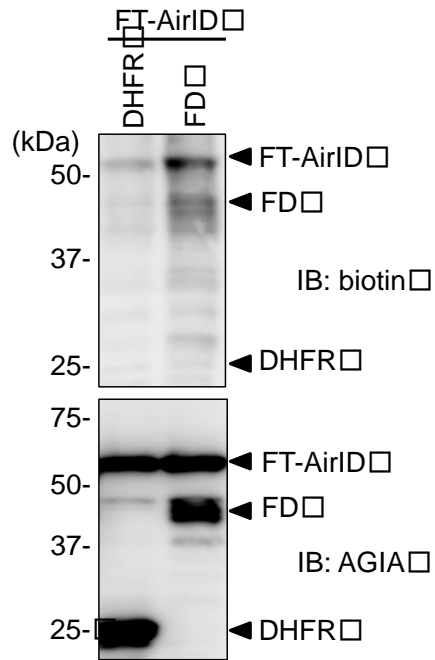


Figure 3—figure supplement 2. コムギ無細胞系を基盤とした共発現条件下における FT 依存的な FD のビオチン化

ビオチン条件下において、AGIA-FD または AGIA-DHFR と FT-AGIA-AirID をコムギ無細胞系により合成した。合成反応後、ビオチン化タンパク質(upper panel)と合成タンパク質(lower panel)をイムノブロットにより検出した。

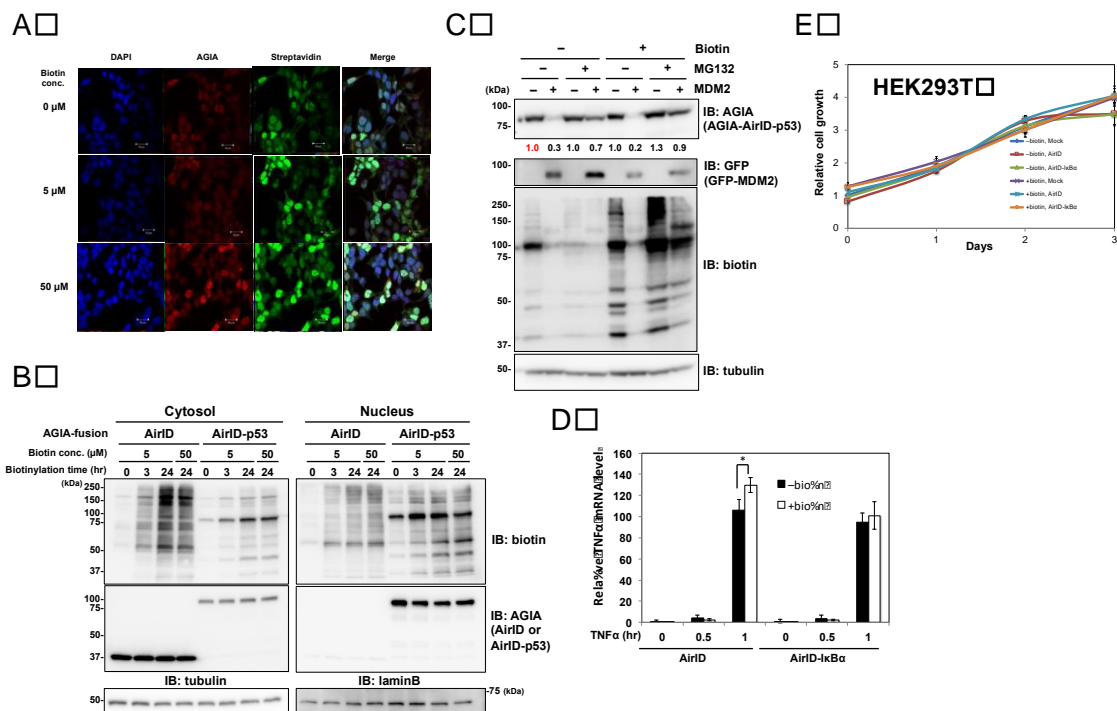


Figure 4. 細胞における AirID 及び AirID 融合タンパク質の動態と影響

(A) 免疫染色と(B) 細胞分画を用いて、AirID の局在解析を行った。免疫染色に関して、AGIA-AirID-p53 を過剰発現した HEK293T 細胞へ記載された濃度のビオチンを 3 hr 処理した。その後、細胞へ AGIA 抗体を反応させた後、anti-rabbit IgG antibody-AlexaFluor555 及び streptavidin-AlexaFluor488 を用いて可視化した。AGIA タグ融合 AirID または AirID-p53 を細胞分画のために、HEK293T 細胞へトランスフェクションした。翌日、ビオチンを 5 μ M または 50 μ M で記述した時間処理した。細胞質タンパク質及び核タンパク質を、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction kit (Merck)を使って分画した。AirID または AirID-p53 の発現を AGIA 抗体を用いて検出した。(C) AGIA タグ融合 AirID-p53 を HEK293T 細胞へ GFP-MDM2 存在下、非存在下において共発現した。ビオチンを 50 μ M の濃度で同じ時間処理した。回収 6 hr 前に、DMSO または 10 μ M の MG132 を添加した。MDM2 及び AirID-p53 の発現は、GFP 抗体と AGIA 抗体を用いて検出した。AirID-p53 のバンド強度を image J により定量した。基準となる強度は赤字で示した。

(D) AGIA タグ融合 AirID または AirID-I κ B α を、レンチウイルスを用いて HEK293T 細胞へ安定的に発現させた。96-well plate へ細胞を播種し、同時にビオチンを添加した。翌日、TNF α (20 ng/mL)を細胞へ 0、0.5、1 hr 処理し、TNF α の mRNA レベルを 1RT-PCR により解析した。Mean \pm S.D. (n = 3). *, p<0.05. (E) AGIA タグ融合 AirID または AirID-I κ B α を HEK293T 細胞へレンチウイルスを用いて安定的に発現させた。細胞を 96-well plate へ播種し、翌日、ビオチンを添加した。ビオチン添加後、0、1、2、3 日目の細胞生存を MTS アッセイによって、検出した。

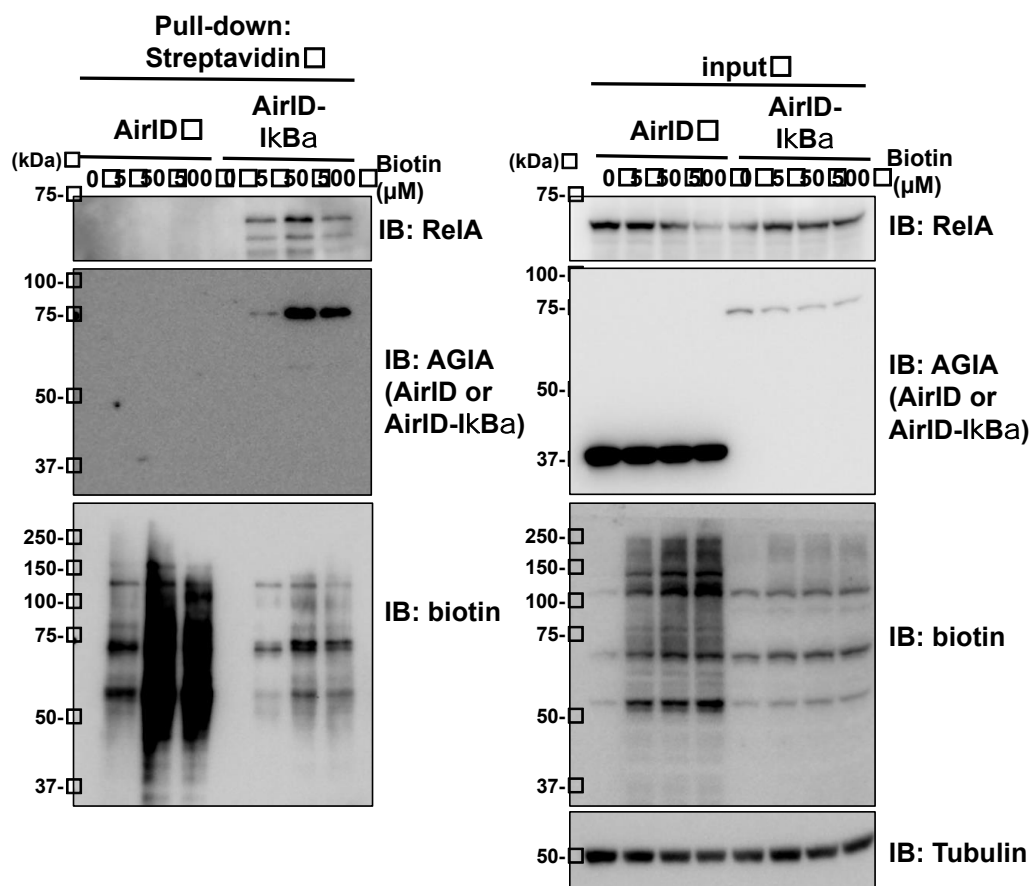


Figure 4—figure supplement 1. 安定的に AirID を発現した細胞のビオチン化条件 AGIA-AirID または AGIA-AirID-I κ B α を HEK293T 細胞へ安定的に発現させた。イムノブロットによって発現を調べた。内在 RelA の AirID 依存的なビオチン化を、(A) 異なるビオチン濃度または(B)異なる反応時間で調べた。AirID または AirID-I κ B α

及び RelA の発現を AGIA 抗体と RelA 抗体を用いて検出した。

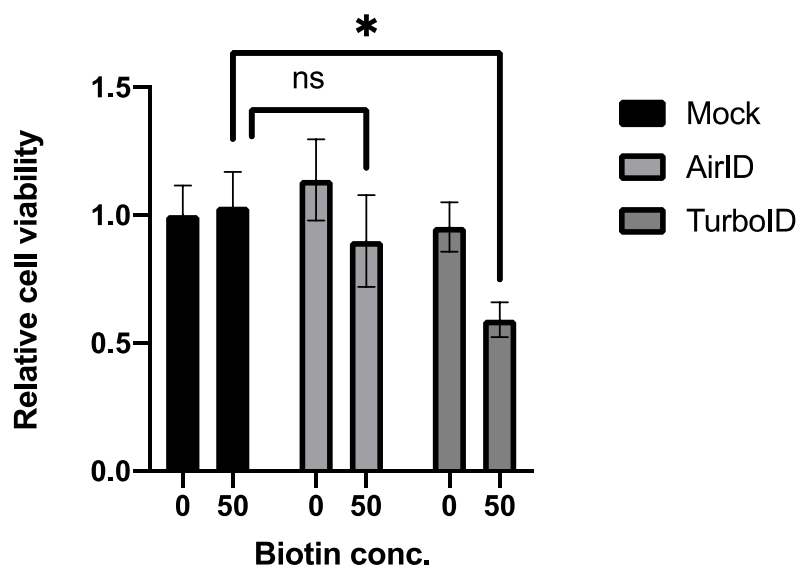


Figure 4—figure supplement 2. TurboID 及び AirID の細胞増殖への影響比較

AirID と TurboID を HEK293T 細胞へ一過的に発現させ、ビオチン添加後 2 日目の細胞生存率を CellTiter-Glo luminescent cell viability assay を用いて測定した。

Mean ± S.D. (n = 3). *, p < 0.05.

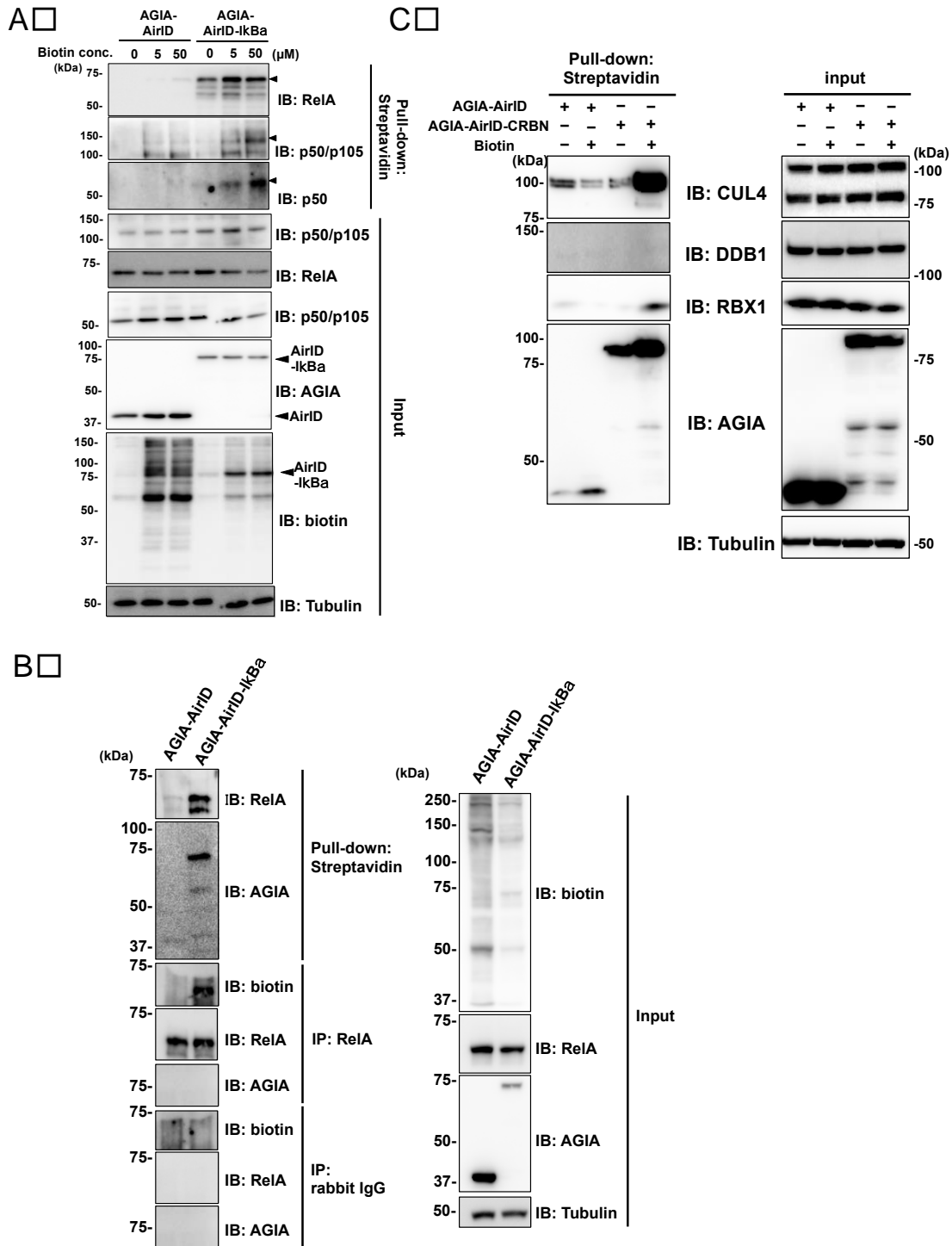


Figure 5. 細胞における AirID 依存的ビオチン化を用いた内在性相互作用における ストレプトアビジンプルダウンアッセイ

(A) AirID または AirID-IkBa を発現させた HEK293T 細胞へ 0、5、50 μ M の濃度で ビオチンを添加し、3 hr インキュベートした。細胞を破碎し、ストレプトアビジン

ビーズを用いて、プルダウンした。プルダウンしたタンパク質を記載した抗体でイムノブロットにより検出した。(B) AirID または AirID-IκBα を発現させた HEK293T 細胞へ 5 μM のビオチンを 3 hr 処理した。細胞を破碎し、ストオレプトアビジンビーズを用いたプルダウン及び RelA 抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降のネガティブコントロールとして、Normal rabbit-IgG を使用した。プルダウンまたは免疫沈降したタンパク質をイムノブロットにより検出した。(C) AirID-CRBN を用いて、CRL4^{CRBN} 複合体のビオチン化を行った。AirID または AirID-CRBN 発現 HEK293T 細胞を 5 μM の濃度のビオチン存在下、非存在下で 3 hr 処理した。細胞を破碎し、ストレプトアビジンビーズによりプルダウンした。CUL4 及び DDB1、RBX1 を各種抗体を用いてイムノブロットにより検出した。

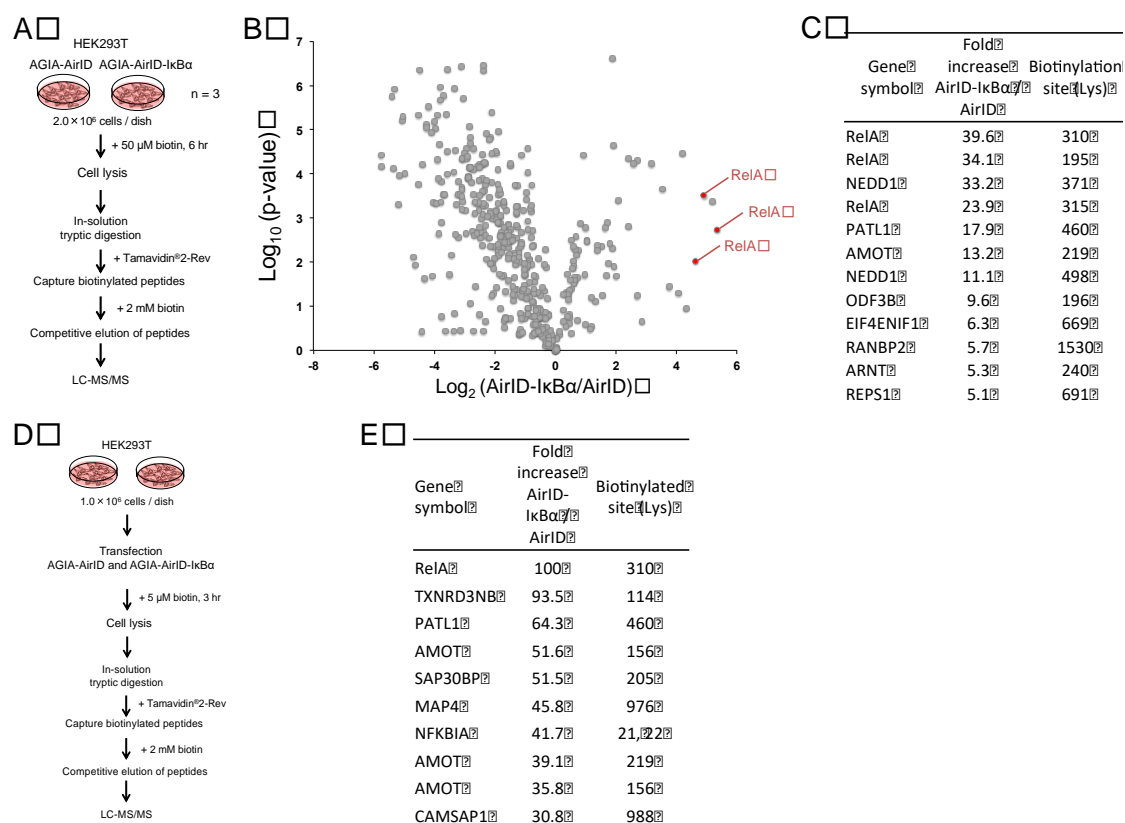


Figure 6. AirID-IκBα 発現細胞におけるビオチン化タンパク質の質量分析

(A) AirID 安定発現細胞を用いたビオチン化タンパク質検出の模式図。AGIA-AirID

または AGIA-AirID-IκBα を安定的に発現させた HEK293T 細胞を 50 μM のビオチンを含む DMEM で 6 hr 培養した(n = 3)。回収した細胞を破碎し、トリプシンを用いて溶液内でタンパク質を消化した。2 mM のビオチンを用いて結合物質を溶出することが可能な Tamavidin2-Rev ビーズ(Wako)を用いて、消化されたペプチド溶液から、ビオチン化ペプチドを回収した。LC-MS/MS を用いて溶出したペプチドを検出した。(B) p-value に対する AirID-IκBα と AirID の比率を示す volcano plot (C) 5 倍以上増加したペプチドのリスト (D) AirID を一過的に発現した細胞を用いてビオチン化タンパク質を検出する際の模式図を示した。AGIA-AirID または AGIA-AirID-IκBα を一過的に発現した HEK293T 細胞を、5 μM のビオチンを含む DMEM で 3 hr 培養した(n = 1)。細胞を回収し、ビオチン化タンパク質を安定発現細胞の時と同様の手法で検出した。(E) AirID-IκBα によって増加した上位 10 ペプチド

A

No.	Compared Sequence (red: biotinylated peptide) (blue: biotinylated lysine residue)
1	DTHSKR TL L I K T V E T R DGQVI
2	GKKAAATPAK K T V T PA KAVTT
3	EMMRR Q Q E G F K G T F D A R E Q E
4	ASAPAK G T P G K G A T P A P P G K A
5	ER L D P F A D G G K T P D P K M N A R T
6	EE P Q Q R G Q G E K S A T P S R K I L D
7	PTAAAVAK I V K P G M K L T E L Y N
8	DFR M E E S F S S K Y V P K Y V P L A D
9	EDVK L L S I S G K R S A P G G S K V
10	F G F A I G S Q T T K K A S A I S I K L G
11	AVDK K A A G A G K V T K S A Q K A Q K
12	ISHK R L N P D G K S I R N E D K I L T
13	R P D Q L Q G E G K I I D R R P E R R P
14	TR L K S R V L G P K I E A V Q K V N K A
15	TK E G V L Y V G S K T K E G V V H G V A
16	PA K K A A V T P G K K A A T P A K K T
17	T S P S F S K A E N K G I S P V V S E H R
18	F S K G T L K I A N K Q F T A V K N D Y E
19	D I P A I F R E G M K N T S Y V L K H P S
20	A E M Y V A K F A A K G E G Q L G P A E R

B

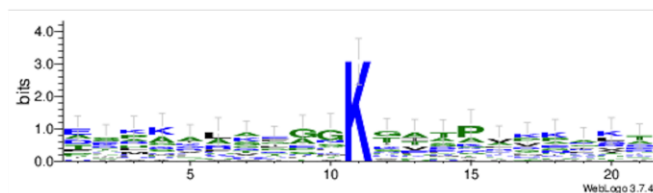


Figure 6—figure supplement 1. ビオチン化サイトの特徴

LC-MS/MS による解析結果を基準として、ビオチン化サイト周辺の 20 配列を比較した。その結果を (A) リスト化し、(B) シーケンスロゴを WebLogo(<http://weblogo.berkeley.edu/>)により作製した。

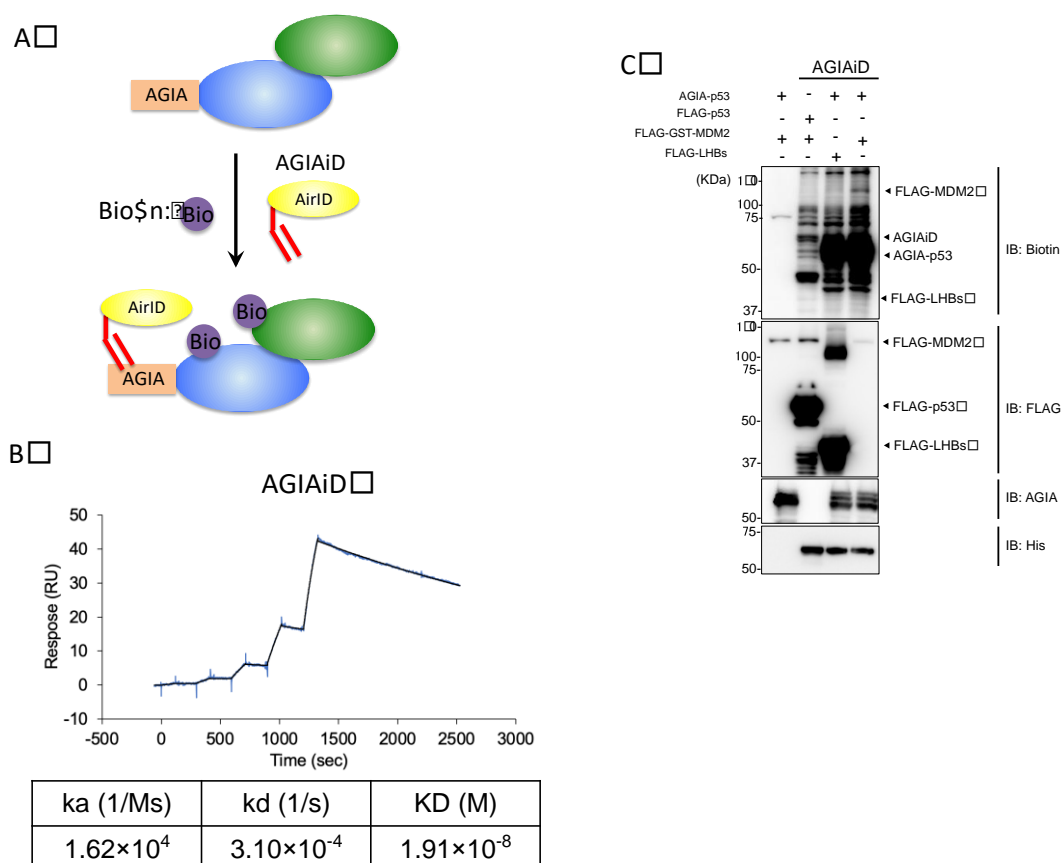


Figure 7. AGIAiD の特徴と相互作用解析への利用

(A) AirID 融合 AGIA Fab 抗体(AGIAiD)を用いた相互作用タンパク質のビオチン化における模式図を示した。AirID を融合した Fab 抗体は AGIA タグを融合した標的タンパク質と相互作用し、その標的タンパク質に相互作用するタンパク質をビオチン化することが可能となる。(B) AGIAiD と精製した FLAG-GST 融合 DRD1 の C-terminus (FG-DRD1(C))との親和性を SPR によって検出した。NHS センサーチップ上に FG-DRD1(C)を共有結合させ、AGIAiD の親和性をシングルサイクル法に

より検出した。(C) AGIA-p53 と FG-MDM2 との相互作用を、AGIAiD を用いて検出した。AGIA-p53 または FLAG-p53 と FG-MDM2 または FLAG-LHBs を混合し、26°C で 1 hr 静置後、AGIAiD 及びビオチンを添加し、26°C で 6 hr 反応させた。ビオチン化されたタンパク質をビオチン抗体により検出した。LHBs 及び FLAG-p53 はネガティブコントロールとして使用された。タンパク質の発現は、FLAG 抗体及び AGIA 抗体を用いて検出した。

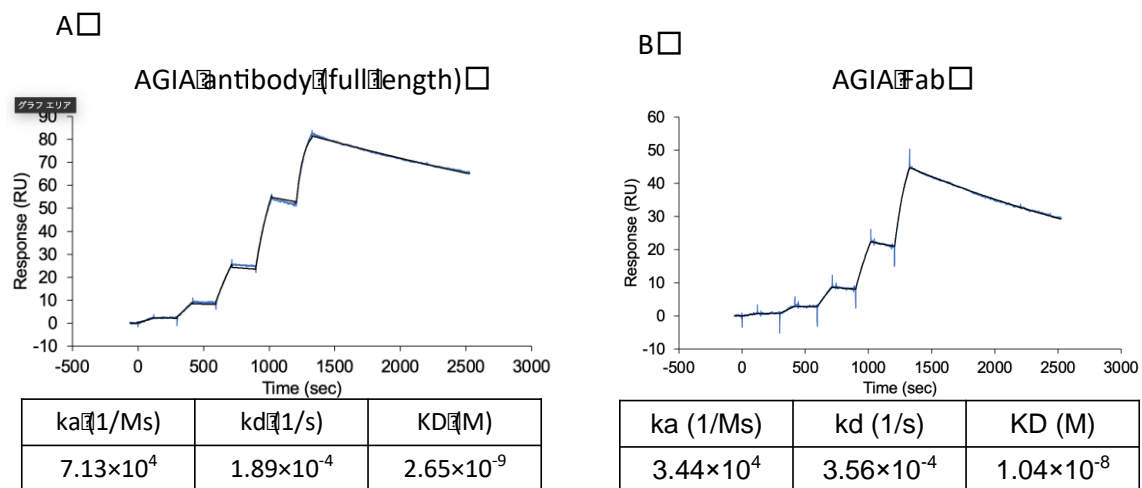


Figure 7—figure supplement 1. AGIA 抗体及び AGIA Fab の親和性

NHS センサーチップ上に FG-DRD1(C)を共有結合させ、(A)AGIA 抗体(full length) または(B)AGIA Fab をアナライトとしてそれぞれ流し、FG-DRD1(C)への親和性を SPR により測定した。測定はシングルサイクル法で行われた。

supplementary Table 1. 祖先型 BirA の配列情報

Name	Amino acids	Nucleotides
		ATGTCTGAGCAGTGGTCTAGGAAGAGAGAG
		ATCCTTGCTCTCCTCAGCTCTGGACATTTTCG
		TGTCTGGTGAGGAACTTGCTACTCAGCTCG
		GAATCTCTAGAACCGCTGTGAGCAAACATAT
		CGCTGCCCTTGAAGAGTACGGCGTGGACAT
		CTATAGCGTGAAAGGTAAGGGATACAAGCT
		CGCGAACCCGATCTCTCTTATCGACGAGTC
		TAAGCTCAAGAGCGCCATCAACAACCGTTG
		CTTCTACTTCGACGAGATCCCGTCTACCAAC
	MSEQWSRKREILALLSSGHFVSGEEL	GGCTTCATGCTTAAACACGCTGAGGAACTC
	ATQLGISRTAVSKHIAALEEYGVDIYSV	AAGTCCGGGGATATCTGTGTTGCTGAGTAC
	KGKGYKLANPISLIDESKLSAINNRCF	CAGTCTGCTGGAAGAGGACGTAGAGGAAGA
	YFDEIPSTNGFMLKHAEELKSGDICVA	ACTTGGGTTTTACCTTACGGATGCCACCTCT
	EYQSAGRGRRTWVSPYGCHLYFS	ACTTCAGCCTTTATTGGAGGTTCCCGCAAG
	LYWRFPPQMAQAMGLSLVVACSLVK	GTATGGCTCAGGCTATGGGACTTTCTCTCG
AVVA	VLKSFGVDGVGVKWPNDIYLNHKKLA	TTGTTGCTTGCAGCCTCGTTAAGGTGCTCAA
	GVLIEMSGQADSECHLVIGIGINMAMS	GTCTTTCCGGAGTTGATGGTGTGGGAGTGAA
	EQQGKKIDQPWSDLSSLTSMPTKTEL	GTGGCCTAACGACATCTACCTCAACCATAA
	LIALQKQLKQDLELFEGLKAFQPR	GAAACTCGCCGGTGTGCTCATCGAGATGTC
	WQEADLFYGKQIKLLMGENQVEGICR	TGGACAAGCTGATTCTGAGTGCCATCTCGT
	GIDEQGAVLLETDDGIQAFIGGEISLRA	TATCGGCATCGGGATCAACATGGCTATGTC
	A	TGAACAGCAGGGGAAGAAGATCGATCAGCC
		TTGGTCTGACCTCTCCTCTCTCACTTCTATG
		CCTGACAAGACCGAGCTGCTTATCGCTCTC
		CAAAAGCAGCTTAAGCAGGACCTCGAGCTT
		TTCGAGAGAGAGGGACTTAAGGCTTTCCAG
		CCTAGATGGCAAGAGGCTGATCTCTTCTAC
		GGGAAGCAGATCAAGCTTCTCATGGGAGAG
		AATCAGGTGAGGGGAATCTGCAGAGGAATT
		GATGAGCAGGGTGCTGTTCTCCTCGAGACT

GATGATGGAATCCAGGCTTTTATCGGCGGG
GAGATCTCTTTGAGAGCTGCT

AFVA

MRNKQNPLKIEILADGQFHSGEELAS	ATGAGGAACAAGCAGAACCCGCTTAAGCTC
LFGITRAGINKYIKILREWGLVLSSVQG	ATCGAGATCCTTGCTGATGGACAGTTCCAC
KGYCLASKLDLLNKTKIEQHYHSKNRL	TCTGGTGAGGAACTCGCTTCTTTGTTCCGA
EILPIIDSTNQYLLDKIDSLQSGDCCVA	ATCACCCGTGCTGGGATCAACAAGTACATC
EFQSKARGRRGRQWFSPFGSNLYFS	AAGATCCTCAGAGAGTGGGGCCTCGTTCTC
MYWRLEQGIAAAMGLSLVVGIVIADVL	TCATCTGTTCAAGGTAAGGGATACTGCCTC
RQLSGQDIKVKWPNDLYLNDQKLAGI	GCCTCTAAGCTTGATCTCCTCAACAAGACCA
LVEIAGKTGDCAHVIGIGVNLMMTNP	AGATCGAGCAGCACTACCACAGCAAGAACA
DTNIVNQKWANLGNVDRNLLVASVAQ	GGCTTGAGATCCTTCCGATCATCGACTCGA
TLKAKLIEFEQQGLAAFINDWQRLDNF	CTAACCAGTACCTCCTCGACAAGATCGACT
VNRPVKLLIGDKIIRGIAKGINQQGALL	CTCTTCAGAGCGGAGATTGCTGTGTTGCTG
LEQEGEINAYIGGEISLRSDE	AGTTCCAGTCTAAGGCTAGAGGACGTAGAG
	GTAGGCAATGGTTCTCTCCGTTCCGGAAGCA
	ACCTCTACTTCAGCATGTATTGGAGACTCGA
	GCAGGGAATCGCTGCTGCTATGGGACTTTC
	TCTCGTTGTGGGAATCGTGATCGCTGATGT
	TCTCAGACAGCTCTCTGGACAGGACATCAA
	GGTTAAGTGGCCTAACGACCTCTACCTCAA
	CGATCAGAAGCTTGCTGGAATCCTCGTTGA
	GATCGCTGGAAAGACTGGTGATTGCGCTCA
	TGTGGTTATCGGAATCGGAGTGAACCTCAT
	GATGACTAACCCGGACACCAACATCGTGAA
	CCAGAAGTGGGCTAACCTCGGAAACGTTGA
	CAGAAACCTCCTCGTTGCTTCTGTGGCTCA
	GACTCTTAAGGCCAAGCTTATCGAGTTCGA
	GCAACAGGGACTTGCCGCTTTCATCAACGA
	TTGGCAGAGGCTCGATAACTTCGTGAACAG
	ACCTGTGAAGCTCCTCATCGGGGATAAGAT
	CATCAGGGGTATCGCCAAGGGAATCAACCA
	GCAAGGTGCTCTCTTGTGGAGCAAGAGGG

TGAGATTAACGCTTACATCGGAGGGGAGAT
CAGCCTCAGATCAGATGAA

	ATGAGGCCTTTTCCGCTTCTCAGACTCTTGT
	CTGATGGGGAGTTCCATTCTGGACAAGCTC
	TTGCTGAAGCTCTCGGAGTGTCTAGAGCTT
	CTATCTGGAACGCTCTCAGAAACGCTGAGG
	CTCTTGGAGTTGATGTGCATGCTGTTAGAG
	GACGTGGGTACAGACTTTCTGAGCCTCTTG
	ATTGGCTCGACGAGGCTATCGTTGCTAGAC
	ATCTTGGAGAGAAGGCCAGCTTCTTCGATC
MRPFLLRLLSDGEFHSGQALAEALG	TCCATGTTCTCGACTCTGTGGACTCTACTAA
VSRASIWNALRNAEALGVDVHAVRGR	CACGGCTCTCATGGAAAGGGCTCTCCAAGG
GYRLSEPLDWLDEAIVARHLGEKASF	TGCTCCTCATGGAAGTGTGTTGCTGCTGA
FDLHVLDSDSTNTALMERALQGAPH	GAGACAGACTGCTGGAAGAGGAAGAAGAG
GTCVAAERQTAGRGRRGRAWHAVL	GTAGAGCTTGGCATGCTGTGCTTGGAGGAT
GGSLTFSLWRFNLGLGSLGSLAV	CTCTTACCTTCTCTTCTCTGGCGTTTCAA
AHLA GLAVVRALNKLGVHGARLKWPNVLT	CCTCGGACTCGGATCTCTTTCTGGACTCTCT
DYRKLAGILIELQGDMLGPAAAVIGIGL	CTTGCTGTTGGACTCGCTGTTGTTAGGGCT
NVRLSEAARNAVDQAVVDLHSLCGAP	CTTAACAAGCTCGGAGTGCATGGTGCTAGA
ADRNTLLADLLRELAAMLTAFEQDGF	CTCAAGTGGCCTAACGATGTGCTCACCGAT
APLRAEWEAHHAYQDKAVRLLLPDGA	TACAGAAAGCTCGCTGGAATCCTCATCGAG
GVQGVARGVDEDGALLLE-TQSGERR	CTTCAGGGTGATATGCTTGGACCTGCTGCT
FHSGEISLRPAA	GCTGTTATCGGAATCGGACTTAACGTGAGA
	CTCTCTGAGGCTGCTAGGAACGCTGTTGAT
	CAGGCTGTTGTGGATCTCCATTCTCTTTGTG
	GTGCTCCGGCTGATAGAAATACCCTTCTTG
	CTGATCTCCTCCGTGAGCTTGCTGCTATGC
	TACTGCTTTTCGAGCAGGATGGATTGCTC
	CTCTTAGAGCTGAATGGGAAGCTCATCACG
	CTTACCAGGATAAGGCTGTGAGACTTCTTTT

GCCTGATGGTGCTGGTGTTCAGGGTGTTGC
TAGAGGTGTTGATGAGGATGGTGCTTTGCT
CCTCGAGACTCAATCTGGGGAGAGAAGATT
CCACAGCGGAGAGATTTCTCTTAGGCCTGC
TGCT

MKDNTVPLTLISILADGEFHSGEQLGE
QLGMSRAAINKHIKTLRDWGVDFRV
QGKGYCLPEPIQLLDEEKIRQQLDEG
SVTVLPVIDSTNQYLLDRLDELTSQDV
CIAEYQQAGRGRGRKWFSPFGANL
YLSMYWRLEQGPAAAMGLSLVIGIVM
GFVA AETLQKLGADGVRVKWPNDLYLNDR
KLAGILVEMTGKTGDAAHIVIGAGINLS
MREPETDEVDQSWINLQEAGITIDRN
QLAARLIKDLRSALRQFEQQGLAPFLS
RWEALDNFINRPVKLIIGDREIHGIARG
INEQGALLLEQDGVIKPWIGGEISLRS
A

ATGAAGGACAACACCGTTCCGCTCACGCTT
ATCTCTATCCTTGCTGATGGTGAGTTCCACT
CTGGTGAACAACCTTGGAGAGCAGCTCGGAA
TGTCTAGGGCTGCTATTAACAAGCACATCAA
GACCCTCCGTGACTGGGGAGTTGATGTGTT
CAGAGTTCAAGGTAAGGGGTAAGTGCCTTCC
TGAGCCTATCCAACCTTCTCGACGAAGAGAA
GATCAGGCAGCAGCTTGATGAGGGATCTGT
TACTGTTCTCCCGGTGATCGATTCGACCAA
CCAGTACCTTCTCGATAGGCTCGATGAGCT
TACCTCTGGTGATGTGTGTATCGCTGAGTA
CCAACAGGCTGGAAGAGGACGTAGAGGTA
GGAAGTGGTTTTCTCCGTTCCGAGCTAACC
TCTACCTCAGCATGTATTGGAGACTTGAGCA
AGGACCTGCTGCTGCTATGGGACTTTCTCT
CGTTATCGGAATCGTGATGGCTGAGACTCT
CCAAAAGCTTGGAGCTGACGGTGTTAGAGT
GAAGTGGCCTAACGACCTTTACCTCAACGA
TAGGAAGCTCGCTGGAATCCTCGTTGAGAT
GACTGGAAAGACTGGTGACGCTGCTCATAT
CGTGATTGGAGCTGGAATCAACCTCTCTAT
GCGTGAGCCTGAGACTGATGAGGTTGACCA
GTCTTGGATCAACCTCCAAGAGGCTGGTAT
CACCATCGATAGAAACCAGCTTGCTGCCAG

GCTCATCAAGGATCTTAGATCTGCTCTCAG
GCAGTTTCGAGCAACAAGGACTTGCTCCATT
CCTCAGCAGATGGGAAGCTCTCGACAACCT
CATCAACAGGCCAGTGAAGCTCATCATCGG
TGATAGAGAGATCCACGGAATCGCTAGGGG
AATCAACGAACAAGGGGCTCTTTTGCTTGA
GCAGGACGGTGTGATTAAGCCTTGATTGG
AGGTGAGATCAGCCTCAGATCTGCT

all

MKDKTRPLKLIAILADGQFHSGEELAT
QLGISRAAINKHIKTLREWGVDVFSVQ
GKGYCLANPIQLLDETNIKQQLKNRVT
VLPVIDSTNQYLLDRLDELKSGDVCVA
EYQSAGRGRGRKWFSPFGSNLYFS
MYWRLEQGMAAAMGLSLVVGIVMAE
VLKKGADGVRVKWPNDLYLNDRKLA
GILVEMTGKTGDAAHIVIGIGINLSMSE
PETNEVDQSWANLSNVGITIDRNQLV
ASLAKDLKSALRQFEQQGLAAFLSRW
QALDNFINRPVKLLIGDKEIHGIARGIN
EQGALLLEQDGGIKAYIGGEISLRSA

ATGAAGGACAAGACCAGACCGCTCAAGCTT
ATCGCTATCCTTGCTGATGGACAGTTCCACT
CTGGTGAGGAACTTGCTACTCAGCTCGGAA
TTTCTAGGGCCGCTATCAACAAGCACATCAA
GACTCTCCGTGAGTGGGGAGTTGATGTGTT
CTCTGTTCAAGGTAAGGGGTACTGCCTCGC
TAACCCTATCCAACCTTCTCGACGAGACTAAG
ATCAAGCAGCAGCTCAAGAACAGGGTGACA
GTTCTCCCTGTGATCGACTCTACTAACCAGT
ACCTCCTCGATAGGCTCGACGAGCTTAAGT
CTGGTGATGTTTGTGTGGCCGAGTACCAGT
CTGCTGGAAGAGGACGTAGAGGTAGGAAGT
GGTTTAGCCCGTTTCGGAAGCAACCTCTACT
TCAGCATGTATTGGAGGCTCGAGCAAGGTA
TGGCTGCTGCTATGGGACTTTCTCTCGTTGT
GGGAATCGTGATGGCTGAGGTGCTCAAGAA
GCTTGGAGCTGACGGGGTTAGAGTTAAGTG
GCCTAACGATCTCTACCTCAACGACAGAAA
GCTCGCTGGAATCCTCGTTGAGATGACTGG
AAAGACTGGTGACGCTGCTCATATCGTGAT
CGGAATCGGTATCAACCTCAGCATGTCTGA
GCCTGAGACTAACGAGGTTGACCAGTCTTG

GGCTAACCTCTCTAACGTGGGAATCACCAT
CGATAGGAACCAGCTCGTTGCTTCTCTCGC
TAAGGATCTCAAGTCTGCTCTCAGACAATTC
GAGCAGCAGGGACTTGCTGCTTTCTTGTCT
AGATGGCAGGCTCTCGACAAC TTCATCAAC
AGACCTGTGAAGCTCCTCATCGGGGACAAA
GAGATTCACGGAATCGCTAGGGGAATCAAC
GAACAAGGGGCTCTTTTGCTTGAGCAGGAC
GGTGAATCAAGGCTTACATCGGAGGTGAG
ATCAGCCTCAGATCTGCT

7. 参考文献

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309(5737): 1052-6. doi: 10.1126/science.1115983, PMID: 16099979

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796-815. PMID: 11130711

Ashkenazy H, Penn O, Doron-Faigenboim A, Cohen O, Cannarozzi G, Zomer O, Pupko T. 2012. FastML: a web server for probabilistic reconstruction of ancestral sequences. *Nucleic Acids Research* 40(Web Server issue): W580-4. doi: 10.1093/nar/gks498, PMID: 22661579

Baeuerle PA, Baltimore D. 1998. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242(4878): 540-6. doi: 10.1126/science.3140380, PMID: 3140380

Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS Jr. 1992. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes & Development* 6(10): 1899-913. doi:

10.1101/gad.6.10.1899, PMID: 1340770

Bheda P, Swatkoski S, Fiedler KL, Boeke JD, Cotter RJ, Wolberger C. 2019.

Biotinylation of lysine method identifies acetylated histone H3 lysine 79 in

Saccharomyces cerevisiae as a substrate for Sir2. *PNAS* 109(16): E916-25. doi:

10.1073/pnas.1121471109, PMID: 22474337

Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL,

Perrimon N, Ting AY. 2018. Efficient proximity labeling in living cells and organisms

with TurboID. *Nature Biotechnology* 36(9):880-887. doi: 10.1038/nbt.4201, PMID:

30125270

Chang L, Chen YJ, Fan CY, Tang CJ, Chen YH, Low PY, Ventura A, Lin CC, Chen YJ,

Angata T. 2017. Identification of Siglec Ligands Using a Proximity Labeling Method.

Journal of Proteome Research 16(10): 3929-3941. doi:

10.1021/acs.jproteome.7b00625, PMID: 28899088

Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan JE. 2004. Promiscuous protein biotinylation by

Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Science* 13(11): 3043-50. doi:

10.1110/ps.04911804, PMID: 15459338

Delphin C, Cahen P, Lawrence JJ, Baudier J. 1994. Characterization of baculovirus recombinant wild-type p53. Dimerization of p53 is required for high-affinity DNA binding and cysteine oxidation inhibits p53 DNA binding. *European Journal of Biochemistry* 223(2): 683-92. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19041.x, PMID: 8055938

Fischer ES, Park E, Eck MJ, Thomä NH. 2016. SPLINTS: small-molecule protein ligand interface stabilizers. *Current Opinion in Structural Biology* 37:115-22. doi: 10.1016/j.sbi.2016.01.004, PMID: 26829757

Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, Yang H, Stadler MB, Cavadini S, Nagel J, Serluca F, Acker V, Lingaraju GM, Tichkule RB, Schebesta M, Forrester WC, Schirle M, Hassiepen U, Ottl J, Hild M, Beckwith RE, Harper JW, Jenkins JL, Thomä NH. 2014. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* 512(7512): 49-53. doi: 10.1038/nature13527, PMID: 25043012

Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C. 1993. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *PNAS* 90(8): 3319-23. doi: 10.1073/pnas.90.8.3319, PMID: 8475074

Ganchi PA, Sun SC, Greene WC, Ballard DW. 1992. I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Molecular Biology of the Cell* 3(12): 1339-52. doi: 10.1091/mbc.3.12.1339, PMID: 1493333

Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. 2000. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50(4-5): 251-7. doi: 10.1080/713803727, PMID: 11327318

Han J, Zhang M, Froese S, Dai FF, Robitaille M, Bhattacharjee A, Huang X, Jia W, Angers S, Wheeler MB, Wei L. 2015. The Identification of Novel Protein-Protein Interactions in Liver that Affect Glucagon Receptor Activity. *PLoS One* 10(6): e0129226. doi: 10.1371/journal.pone.0129226, PMID: 26075596

Henke SK, Cronan JE. 2014. Successful conversion of the *Bacillus subtilis* BirA Group II biotin protein ligase into a Group I ligase. *PLoS One* 9(5): e96757. doi: 10.1371/journal.pone.0096757, PMID: 24816803

Honke K, Kotani N. 2012. Identification of cell-surface molecular interactions under living conditions by using the enzyme-mediated activation of radical sources

(EMARS) method. *Sensors* 12(12): 16037-45. doi: 10.3390/s121216037, PMID: 23443365

Ikeda KN, Freeman M. 2019. Spatial proteomics reveal that the protein phosphatase PTP1B interacts with and may modify tyrosine phosphorylation of the rhomboid protease RHBDL4. *Journal of Biological Chemistry* 294(30): 11486-11497. doi: 10.1074/jbc.RA118.007074, PMID: 31177093

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327(5971):1345-50. doi: 10.1126/science.1177319. PMID: 20223979

Jaeger KE, Graf A, Wigge PA. 2006. The control of flowering in time and space. *J Exp Bot.*; 57(13): 3415-8. doi:10.1093/jxb/erl159, PMID: 17005922

James C, Müller M, Goldberg MW, Lenz C, Urlaub H, Kehlenbach RH. 2019. Proteomic mapping by rapamycin-dependent targeting of APEX2 identifies binding partners of VAPB at the inner nuclear membrane. *Journal of Biological Chemistry* 294(44):16241-54. pii: jbc.RA118.007283. doi: 10.1074/jbc.RA118.007283, PMID: 31519755

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30(14): 3059-66. doi: 10.1093/nar/gkf436, PMID: 12136088

Kim DI, Birendra KC, Zhu W, Motamedchaboki K, Doye V, Roux KJ. 2014. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *PNAS* 111(24): E2453-61. doi: 10.1073/pnas.1406459111, PMID: 24927568

Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux KJ. 2016. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Molecular Biology of the Cell* 27(8): 1188–1196. doi: 10.1091/mbc.E15-12-0844, PMID: 26912792

Kwon K, Beckett D. 2000. Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Science* 9(8): 1530-9. doi: 10.1110/ps.9.8.1530, PMID: 10975574

Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. 2008. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *PNAS* 105(21): 7405-9. doi: 10.1073/pnas.0710346105, PMID: 18495923

Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl

D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. 2014. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 343(6168): 301-5. doi: 10.1126/science.1244851, PMID: 24292625

Li J, Gao J, Han L, Zhang Y, Guan W, Zhou L, Yu Y, Han W. 2016. Development of a membrane-anchored ligand and receptor yeast two-hybrid system for ligand-receptor interaction identification. *Scientific Reports* 6: 35631. doi: 10.1038/srep356313, PMID: 27762338

Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, Karasawa S, Carmel G, Jackson P, Abbasian M, Mahmoudi A, Cathers B, Rychak E, Gaidarova S, Chen R, Schafer PH, Handa H, Daniel TO, Evans JF, Chopra R. 2012. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* 26(11): 2326-35. doi: 10.1038/leu.2012.119, PMID: 22552008

Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniang M, Ott CJ, Mitsiades CS, Wong KK, Bradner JE, Kaelin WG Jr. 2014. The myeloma drug lenalidomide promotes the

cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* 343(6168): 305-9. doi: 10.1126/science.1244917, PMID: 24292623

Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, Ellisman MH, Ting AY. 2012. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology* 30(11): 1143-8. doi: 10.1038/nbt.2375, PMID: 23086203

Matyskiela ME, Couto S, Zheng X, Lu G, Hui J, Stamp K, Drew C, Ren Y, Wang M, Carpenter A, Lee CW, Clayton T, Fang W, Lu CC, Riley M, Abdubek P, Blease K, Hartke J, Kumar G, Vessey R, Rolfe M, Hamann LG, Chamberlain PP. 2018. SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. *Nature Chemical Biology* 14(10): 981-987. doi: 10.1038/s41589-018-0129-x, PMID: 30190590

Michael D, Oren M. 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13(1): 49-58. PMID: 12507556

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated

transactivation. *Cell* 69(7): 1237-45. doi: 10.1016/0092-8674(92)90644-r, PMID: 1535557

Motani K, Kosako H. 2018. Activation of stimulator of interferon genes (STING) induces ADAM17-mediated shedding of the immune semaphorin SEMA4D. *Journal of Biological Chemistry* 293(20): 7717-7726. doi: 10.1074/jbc.RA118.002175, PMID: 29618514

Nakano S, Asano Y. 2015. Protein evolution analysis of S-hydroxynitrile lyase by complete sequence design utilizing the INTMSAlign software. *Scientific Reports* 5:8193. doi: 10.1038/srep08193, PMID: 25645341

Nakano S, Motoyama T, Miyashita Y, Ishizuka Y, Matsuo N, Tokiwa H, Shinoda S, Asano Y, Ito S. 2018. Benchmark Analysis of Native and Artificial NAD⁺-Dependent Enzymes Generated by a Sequence-Based Design Method with or without Phylogenetic Data. *Biochemistry* 57(26): 3722-3732. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00339, PMID: 29787243

Nakano S, Niwa M, Asano Y, Ito S. 2019. Following the Evolutionary Track of a Highly Specific L-Arginine Oxidase by Reconstruction and Biochemical Analysis of Ancestral

and Native Enzymes. *Applied and Environment Microbiology* 85(12). pii: e00459-19.

doi: 10.1128/AEM.00459-19. PMID: 30979835

Nemoto K, Ramadan A, Arimura GI, Imai K, Tomii K, Shinozaki K, Sawasaki T. 2017.

Tyrosine phosphorylation of the GARU E3 ubiquitin ligase promotes gibberellin signalling by preventing GID1 degradation. *Nature Communications* 8: 1004. doi:

10.1038/s41467-017-01005-5.6, PMID: 29042542

Nemoto K, Kagawa M, Nozawa A, Hasegawa Y, Hayashi M, Imai K, Tomii K,

Sawasaki T. 2018. Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system. *Scientific Reports* 8(1):4268. doi:

10.1038/s41598-018-22538-9, PMID: 29523814

Nomura S, Takahashi H, Suzuki J, Kuwahara M, Yamashita M, Sawasaki T. 2019

Pyrrhothiogatain acts as an inhibitor of GATA family proteins and inhibits Th2 cell differentiation in vitro. *Scientific Reports* 9(1):17335. doi:

10.1038/s41598-019-53856-1, PMID: 31758034

Odeh HM, Coyaud E, Raught B, Matunis MJ. 2018. The SUMO-specific isopeptidase

SEN2 is targeted to intracellular membranes via a predicted N-terminal amphipathic

α -helix. *Molecular Biology of the Cell* 29(15): 1878-1890. doi:

10.1091/mbc.E17-07-0445, PMID: 29874116

Ohshiro K, Mudvari P, Meng QC, Rayala SK, Sahin AA, Fuqua SA, Kumar R. 2010.

Identification of a novel estrogen receptor- α variant and its upstream splicing regulator. *Molecular Endocrinology* 24(5): 914-22. doi: 10.1210/me.2009-04134,

PMID: 20304996

Prakash O, Eisenberg MA. 1979. Biotinyl 5'-adenylate: corepressor role in the regulation of the biotin genes of *Escherichia coli* K-12. *PNAS* 76(11): 5592-5. DOI:

10.1073/pnas.76.11.5592, PMID: 392507

Rotter V, Abutbul H, Ben-Ze'ev A. 1983. P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *The EMBO Journal* 2(7): 1041-7. PMID: 2455232

PMCID: PMC555232

Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 196(6): 801-10. doi: 10.1083/jcb.201112098. PMID: 22412018

PMID: 22412018

Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. 2002. *PNAS* 99(23): 14652-7. doi: 10.1073/pnas.232580399, PMID: 12409616

Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, Saeki M, Tsuchimochi M, Morishita R, Endo Y. 2008. Arabidopsis HY5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA microplate. *FEBS Letters* 582(2): 221-8. doi: 10.1016/j.febslet.2007.12.004, PMID: 18082144

Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology* 10(12): 6565-77. doi: 10.1128/mcb.10.12.6565, PMID: 2247074

Takakura Y, Sofuku K, Tsunashima M. 2013. Tamavidin 2-REV: an engineered tamavidin with reversible biotin-binding capability. *Journal of Biotechnology* 164(1): 19-25. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.01.006. PMID: 23333918

Takahashi H, Uematsu A, Yamanaka S, Imamura M, Nakajima T, Doi K, Yasuoka S, Takahashi C, Takeda H, Sawasaki T. 2016. Establishment of a Wheat Cell-Free

Synthesized Protein Array Containing 250 Human and Mouse E3 Ubiquitin Ligases to Identify Novel Interaction between E3 Ligases and Substrate Proteins. *PLoS One* 11(6): e0156718. doi: 10.1371/journal.pone.0156718, PMID: 27249653

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197, PMID: 24132122

Uematsu A, Kido K, Manabe E, Takeda H, Takahashi H, Hayashi M, Imai Y, Sawasaki T. 2018. DANFIN functions as an inhibitor of transcription factor NF- κ B and potentiates the antitumor effect of bortezomib in multiple myeloma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495(3): 2289-2295. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.142, PMID: 29284118

Van Itallie CM, Aponte A, Tietgens AJ, Gucek M, Fredriksson K, Anderson JM. 2013. The N and C termini of ZO-1 are surrounded by distinct proteins and functional protein networks. *Journal of Biological Chemistry* 288(19): 13775-88. doi: 10.1074/jbc.M113.466193, PMID: 23553632

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott

- U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303(5659): 844-8. doi: 10.1126/science.1092472, PMID: 14704432
- Yamanaka S, Sato Y, Oikawa D, Goto E, Fukai S, Tokunaga F, Takahashi H, Sawasaki T. 2020 Subquinocin, a small molecule inhibitor of CYLD and USP-family deubiquitinating enzymes, promotes NF- κ B signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* in press. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.049, PMID: 31898971
- Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, Sawasaki T. 2016. AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS One* 11(6): e0156716. doi: 10.1371/journal.pone.0156716, PMID: 27271343
- Zhao S, Guan G, Liu J, Liu A, Li Y, Yin H, Luo J. 2017. Screening and identification of host proteins interacting with *Theileria annulata* cysteine proteinase (TaCP) by yeast-two-hybrid system. *Parasites & Vectors* 10: 536. doi: 10.1186/s13071-017-2421-0, PMID: 29084576

8. 謝辭

本研究は愛媛大学プロテオサイエンスセンター無細胞生命科学部門の澤崎達也教授指導の下、実施致しました。

澤崎達也教授には、研究を円滑に行うための環境を提供して頂いた他、研究のご指導やご助言、論文作製など数多くの場面にて大いにサポートして頂き、研究における知識や考え方、進め方を深く学べましたことを心より感謝致します。

野澤彰講師には、植物タンパク質を用いたデータ獲得の他、RIを用いた解析においては直接的に指導・サポートして頂き、深く感謝致します。

高橋宏隆講師には、実験手法や知識面でのサポートのみならず、試薬購入などの快適な実験環境づくりも行ってもらったこと、深く感謝致します。

山中聡士博士には、本研究において CRBN 及び Thalidomide を用いた AirID による薬剤依存的なビオチン化解析を行って頂いた他、実験手法のご助言や日々の研究室環境づくりにも携わって頂きましたこと、大変感謝致します。

静岡県立大学の伊藤創平准教授、中野祥吾助教には、in silico での祖先型 BirA の設計実施して頂きました。本研究における AirID の獲得は先生方のご協力なしには実現しませんでした。心より御礼申し上げます。

徳島大学の小迫英尊教授、茂谷康講師には、質量分析による解析を実施して頂

きました。BioID 法を質量分析にて利用したご経験を持つ先生方に、最適化された手法のご提案やご助言をいただくことができたため、研究を円滑に進めることができました。深く感謝申し上げます。

澤崎研究室の博士研究員・技術員・後輩の皆様には公私ともに大変お世話になりました。AGIA タグを AGIA 抗体 Fab へ融合させた AGIAiD を作製して頂きました塩屋亮平さん、SPR によるカイネティクス測定を行って頂きました徳永聡さん、AGIAiD を用いた *in vitro* におけるビオチン化解析を行って頂きました山田航大さんに深く感謝いたします。また、愛媛大学プロテオサイエンスセンター事務室の皆様には日々の事務作業にてサポートして頂きましたこと大変感謝いたします。