

(第3号様式)(Form No. 3)

## 学位論文要旨 Dissertation Summary

氏名 (Name) 城戸 康希

論文名:新規近位依存性ビオチン標識酵素AirIDの開発とその応用  
(Dissertation Title)

---

タンパク質は生体内において、複合体形成や翻訳後修飾など多彩な形で制御されている。いずれの場合においても、反応の第一段階としてタンパク質間相互作用を形成する。そのため、相互作用タンパク質の同定は、タンパク質の機能や制御機構を明らかにする上で非常に重要である。これまで、タンパク質相互作用解析技術が数多く開発・利用されてきた。我々はそれらのタンパク質相互作用解析技術の中でも近位依存性ビオチン化(BioID)法に着目した。BioID法では大腸菌由来のビオチンリガーゼ BirA の R118G 変異体(BirA\*)を用いる。通常 BirA は、特定の 15 アミノ酸を認識し、そのただ一つのリジン残基へビオチンを付加する酵素である。しかし、BirA\*は特定のアミノ酸配列ではなく、近傍に存在するリジン残基へと無作為にビオチンを付加する。そのため、BirA\*を標的タンパク質へと融合することで、相互作用したタンパク質のリジン残基をビオチン化することが可能となる。このようにビオチン化されたタンパク質を質量分析により同定することで、網羅的な相互作用タンパク質の同定が可能となる。この技術は、一度ビオチン化されさえすれば相互作用の安定性や強弱に関係なくタンパク質を検出可能なため、一過的相互作用や低親和性相互作用、局在変化の伴う相互作用も検出可能である。さらに、この手法は BirA\*融合タンパク質を細胞にて発現させ、ビオチンを添加するだけで達成可能であるため、簡便かつ細胞への影響も極めて小さい。しかし、BirA\*は活性が低く、ビオチン化に 16 時間以上もの反応時間を必要とした。そこで、高効率な BioID 酵素として TurboID が開発された。TurboID は 1 時間以内の反応時間で極めて高い活性を示す酵素である。しかしながら、その高すぎる活性故に、1 時間を超える反応では、非相互作用タンパク質までもビオチン化してしまうことに加え、細胞増殖に影響を与えることも報告された。そのため、反応条件の緻密な制御が必要とされる酵素であった。そこで本研究では、BioID 法の汎用性を高めるために、より利用しやすい BioID 酵素の創出を試みた。

### **新規 BioID 酵素 AirID の開発**

新規酵素創出のため、メタゲノムデータを用いて、コンピューターでの進化工学的なアプローチを利用した。このアプローチにより祖先型 BirA を設計し、それを基にして新規酵素を設計した。この新規 BioID 酵素を AirID と命名した。AirID に関して、ビオチン化活性や反応時間、ビオチン化特異性、細胞毒性において、既存のビオチン化酵素 BirA\*及び TurboID と比較した。各種 BioID 酵素を p53 あるいは I $\kappa$ B $\alpha$  へと融合し、その相互作用タンパク質 MDM2 または RelA のビオチンを指標として評価した。ビオチン化活性においては TurboID が最も高い活性を有したものの、AirID は BioID よりも極めて高い活性を有していた。さらに、TurboID は 1 時間、BioID は 16 時間の反応時間で十分な活性を示すのに対し、AirID は 3 時間で十分な活性を示す酵素であった。ビオチン化特異性に関して、TurboID は 1 時間を超える反応時間では非相互作用タンパク質のビオチン化が明確に確認されたが、AirID は 24 時間の反応時間においても、非相互作用タンパク質はビオチン化されなかった。また、細胞毒性の面においても、TurboID は過去の報告通り、48 時間の反応で細胞の増殖を大きく阻害するのに対し、AirID は有意な影響を与えなかった。これらの結果から、AirID は、タンパク質相互作用依存性が極めて高い酵素であり、高感度かつ高精度な相互作用解析が可能であることが示唆された。実際に AirID 融合 I $\kappa$ B $\alpha$  を細胞にて恒常的に発現させ、質量分析を行なった結果、相互作用タンパク質 RelA のビオチン化ペプチドが検出されたことから、質量分析を用いた網羅的な相互作用解析に利用可能であることも示されている。これらのことから、AirID は網羅的な相互作用タンパク質の同定における強力なツールとなることが期待できる。

### **AirID を応用した新規技術 AGIAiD**

現在、AirID の応用として、我々の研究室にて獲得した高親和性の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、抗体の結合依存的にビオチン化する新たなツール AGIAiD の開発を進めている。標的タンパク質へ AirID を直接融合するこれまでの異なり、この手法ではわずか 9 アミノ酸から成る AGIA タグをタンパク質へ融合するだけで相互作用タンパク質の同定が可能となる。そのため、AirID の融合による構造や結合への影響を最小限に抑えることが可能である。この手法は主に受容体解析など細胞表面タンパク質の解析に利用が期待できる。