

(第6号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	城戸 康希
審査委員	主査 澤崎 達也 副査 高井 和幸 副査 林 実 副査 坪井 敬文

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

審査結果の要旨 (2,000字以内 標準書式：日本工業規格 A4, 11ポイント, 左右余白 25mm)

タンパク質は生体内で修飾や脱修飾、切断など様々な形で制御されている。いずれ制御においても、反応の第一段階として、タンパク質が相互作用を形成する。そのため、相互作用するタンパク質の同定および解析は、生体内でのタンパク質の役割や動態を理解する上で非常に重要である。これまで、数多くのタンパク質相互作用解析技術が開発・利用されてきた。申請者は、数ある相互作用解析技術の中から、近位依存性標識技術の一つである近位依存性ビオチン標識(BioID)法に着目した。BioID法は大腸菌由来のビオチンリガーゼBirAのR118G変異体を用いて、近傍(10 nm以内)のタンパク質をビオチン標識する技術である。BioIDを融合した標的タンパク質は、相互作用することで近接したタンパク質を網羅的にビオチン標識することが可能であり、ビオチン化されたタンパク質を回収し、質量分析により相互作用タンパク質の網羅的な同定が可能となる。既知のBioID酵素として、BioIDおよびTurboIDが報告されているが、BioIDは活性が低く、ビオチン化反応のために16時間以上の時間が必要となる。この問題を改善するために、高効率なビオチン標識酵素TurboIDが開発された。しかし、TurboIDは長時間のビオチン化反応により、高い細胞毒性と非相互作用タンパク質の非特異的なビオチン化を行うことも同時に報告されており、タンパク質相互作用解析へ利用し難い酵素である。申請者の学位論文の目的は、タンパク質相互作用解析により適した新しいBioID酵素の開発である。

申請者は、新規のBioID酵素開発のために、in silicoにて祖先型BirAの開発を行った。5種類の祖先型BirA配列として、AVVA、AFVA、GFVA、AHLA、allのデザインを行った。これらの祖先型BirAのR118G変異体を作製し、近位依存性ビオチン化活性を評価した結果、高活性型ビオチン化酵素としてAVVA、高特異性型ビオチン化酵素としてGFVAの選抜に成功した。さらに、AVVAおよびGFVAのR118S変異体を作製した結果、GFVAにおいて大幅なビオチン化活性の上昇が確認された。加えて、GFVAのRS変異体は、細胞内にて、ビオチン非添加条件においても高いビオチン化活性を有することが確認された。以上のことから、ビオチン化特異性及び活性、ビオチン濃度要求性を考慮した結果、新規BioID酵素としてGFVAのR118S変異体を選抜し、AirIDと名付けた。

次に申請者は、TurboIDとAirIDの性質を比較した。TurboID及びAirIDをIkBaタンパク質へと融合し、その相互作用タンパク質RelA及び非相互作用タンパク質GFPに対して、ビオチン化を

確認した。その結果、TurboID、AirID共に相互作用タンパク質RelAのビオチン化が確認されたが、TurboIDでは1時間以上の反応により、非相互作用タンパク質GFPもビオチン化されたのに対し、AirIDでは24時間の反応においても、GFPのビオチン化は確認されなかった。さらに、TurboID及びAirID発現細胞にて、細胞増殖への影響を評価した。TurboIDでは、過去の報告と同様に48時間のビオチン化反応で、細胞増殖に有意な減少が確認されたが、AirIDでは細胞増殖への影響はまったく確認されなかった。以上のことから、AirIDはタンパク質相互作用依存性の高いビオチンを可能とし、細胞増殖への影響もない酵素であることが示された。

また、申請者は、AirID融合IkB α 発現細胞を用いて、質量分析による相互作用タンパク質のビオチン化を解析した。その結果、上位のペプチド断片において、相互作用タンパク質RelAのペプチド断片が複数含まれていることが確認された。このことから、AirIDは質量分析を用いた相互作用タンパク質の解析に利用可能であることが示された。

次に申請者はAirIDの応用として、抗AGIA Fab抗体にAirIDを融合したAGIAiDを用いて、抗体の結合依存的にビオチン標識を行う技術の開発を行った。この技術により、わずか9アミノ酸のAGIAタグ配列を標的タンパク質へ融合するだけでAGIA抗体の高い特異性と親和性を利用したビオチン標識が可能であることが示された。

以上のように、本学位論文研究は、新たな近位依存性ビオチン標識酵素として、高い活性と特異性を有し、細胞毒性のないAirIDの開発に成功し、AirIDを用いて質量分析による網羅的な相互作用タンパク質解析が可能であることを示した。さらに、AirIDを用いて抗体依存的にビオチン標識を行う技術を開発した。これらの研究は、今後のタンパク質相互作用解析における重要な成果である。従って、本論文は、博士（工学）の学位論文として十分価値があると判定した。