The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細胞内光クロスリンク法の改良とエピジェネティック調節因子の相互作用解析への応用
Author(s)	喜多, 絢海
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76497
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　喜多　絢海　　）	
論文題名	細胞内光クロスリンク法の改良とエピジェネティック調節因子の相互作用解析への応用

論文内容の要旨

生細胞内でタンパク質は単独で機能するのではなく、複雑な相互作用ネットワークを形成することで様々な細胞プロセスに関与している。相互作用ネットワークは細胞の種類や環境に応じて異なるため、各細胞内で実際に生じているタンパク質間相互作用の解析が必要である。我々は、生細胞内でのタンパク質間相互作用解析手法である「細胞内光クロスリンク法」を開発してきた。本法は、光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸を細胞内で解析対象とするタンパク質に特異的に導入し、その細胞に光を照射することで、近傍の相互作用因子と共有結合を形成させる手法である。従来の解析手法と比較し、複合体を安定化出来るため一過的な相互作用の解析が可能である、光照射時に細胞内で生じている相互作用を知ることが出来る、といった点で有用である。本研究では、細胞内光クロスリンク法の応用研究として、本法の改良および細胞内プロセスの制御機構の解明に向けた相互作用解析を行った。

人工アミノ酸Zlysおよびその誘導体pTmdZLysをタンパク質へ導入するには、UAG配列を認識するピロリジンtRNA($tRNA^{Pyl}$)の遺伝子、ピロリジルtRNA合成酵素を改変したZLysRSの遺伝子、人工アミノ酸を導入する部位をTAG配列で指定した目的タンパク質の遺伝子、の3つを細胞に同時に導入する必要がある。これら遺伝子の導入には一般的にプラスミドベクターが用いられており、人工アミノ酸導入法を適用可能な細胞種が制限されていた。そこで、多様な細胞への高効率な遺伝子導入が可能なアデノウイルスベクター(AdV)を用いた人工アミノ酸導入法の開発を行った。まず、AdVに搭載する$tRNA^{Pyl}$発現配列の最適化を行ったところ、U6およびH1プロモーターの下流に$tRNA^{Pyl}$をそれぞれ挿入したH1U6配列が最も適していた。次に、光クロスリンク能を持つ人工アミノ酸の導入効率の改善を目指した。従来用いていたpTmdZLysはZLysRSの基質結合部位と立体障害を起こす可能性が考えられたため、ジアジリン基の配置を変更したmTmdZLysを新たに合成したところ、pTmdZLysに比較してmTmdZLysの導入効率は向上した。続いて、H1U6配列とZLysRS遺伝子、H1U6配列とアンバー変異型EGFP(UAG)遺伝子を搭載した2種類のAdVを構築し、複数の癌モデル細胞およびヒト初代培養細胞に感染させたところ、用いた全ての細胞内でZLysをEGFPに導入することに成功した。同様に、HeLa細胞内でmTmdZLysをEGFPに導入することにも成功した。そこで、構築したAdVおよび新規アミノ酸mTmdZLysを用い、癌モデル細胞MDA-MB-468および正常細胞HUVEC内でのタンパク質間相互作用を細胞内光クロスリンク法により捕捉可能か検証したところ、EGFシグナル伝達ネットワークを構成するGRB2-EGFRおよびGRB2-SHCの直接的な相互作用を捉えることに成功した。以上より、AdVを用いた人工アミノ酸導入法の開発により、これまでは不可能であった細胞種において細胞内光クロスリンク法によるタンパク質間相互作用の解析を成し遂げた。

エピジェネティックな遺伝子発現制御機構のひとつにDNAのメチル化修飾が存在する。DNAの脱メチル化反応はten-eleven translocation proteins (TETs)による5mCの段階的な酸化反応により促進される。メチル化修飾は化学的遺伝的に安定だが、外的刺激によって細胞はその状態を劇的に変動させる。このことから、刺激に応じてTETsの活性を調節可能な相互作用因子の存在が示唆された。そこで、TETsを構成するTET1-3のうちTET1に着目し、その酵素活性領域であるcatalytic domain (CD)と直接相互作用するタンパク質を細胞内光クロスリンク法により探索した。その結果、Calmodulin (CaM)を同定することに成功した。CaMはCa^{2+}との結合により構造が変化し、他のタンパク質と相互作用する性質を持つ。実際に、TET1とCaMの複合体形成効率は細胞内Ca^{2+}濃度上昇により増加し、低下により減少したことから、両者の相互作用は細胞内Ca^{2+}流入により調節されることが示唆された。また、Ca^{2+}/CaMは相互作用する酵素の活性を直接的または間接的に調節することが知られる。まず、Ca^{2+}/CaM存在下でのTET1CDの活性を調べたところ、メチル化DNA酸化活性に影響は見られなかった。次に、CaM存在下でCa^{2+}濃度を上昇させた細胞から回収したTET1CDの活性を調べたところ、メチル化DNAの酸化が促進された。このことから、Ca^{2+}/CaMはTET1CDに何らかの変化を起こさせることでその活性を促進することが示唆された。そこで、TET1CDの翻訳後修飾について解析したところ、Ca^{2+}/CaMによりTET1CDのアセチル化が亢進することがわかった。さらに、このアセチル化の亢進は、Ca^{2+}/CaMがTET1CD-HDAC1の相互作用を阻

害することにより引き起こされる可能性が示された。このことは、Ca^{2+}/CaMがTET1CD-HDAC1の相互作用を阻害することでTET1のアセチル化を亢進し、その活性を促進する可能性を示しているが、実際にHDAC1阻害剤MS-275の添加によりTET1CDのアセチル化が亢進し、そのメチル化DNA酸化活性が亢進することが確認された。以上より、細胞内Ca^{2+}濃度上昇に応じてCa^{2+}/CaMがTET1-HDAC1の相互作用を阻害することで、TET1のアセチル化亢進を介し、その活性を促進するという新たなDNAメチル化調節機構が明らかとなった。

本研究において、細胞内光クロスリンク法の技術開発により、多様な細胞内でのタンパク質間相互作用ネットワークの解析方法を確立し、さらには、本法によって細胞内プロセスを担う新たなシグナル伝達経路の一旦を明らかにすることに成功した。本研究の成果によって、本法が多様な細胞内におけるタンパク質間相互作用解析に活用されることで、生理現象や病態発症メカニズムの解明、またそれらを利用した創薬研究へと貢献することが期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　喜多　絢海　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	土井　健史
	副 査	教授	水口　裕之
	副 査	教授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

タンパク質間相互作用解析法である細胞内光クロスリンク法は、細胞内において、光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸を導入した解析対象タンパク質と相互作用因子を共有結合させる手法であり、従来の解析法に比較し、様々な利便性を有する。本法の汎用性を制限する問題点として、光クロスリンカーのタンパク質への導入効率が低いこと、プラスミドベクターを用いた方法であるため解析可能な細胞種が限られていることが挙げられていた。喜多さんは、まず、細胞内光クロスリンク法の適用拡大を目指し、これら問題点を解決することで本法の改良に取り組んだ。その結果、以下の優れた成果を得ることが出来た。

1）新規光クロスリンカーmTmdZLysを設計、タンパク質への導入を可能とし、既存の光クロスリンカーに比較して、その導入効率を大きく向上させることに成功した。

2）人工アミノ酸を導入可能なアデノウイルスベクターを開発した。

3）開発したアデノウイルスベクターによって、タンパク質へmTmdZLysを導入することに成功し、これまでは解析不可能であった癌モデル細胞やヒト初代培養細胞内での細胞内光クロスリンク法によるタンパク質間相互作用解析を達成した。さらに、改良した細胞内光クロスリンク法を駆使することで、エピジェネティクス関連酵素であるTETファミリータンパク質の活性調節メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、以下の優れた成果を得ることが出来た。

4）細胞内光クロスリンク法によって、DNA脱メチル化調節酵素TETファミリータンパク質の新規相互作用因子としてCalmodulin（CaM）を同定した。

5）TET-CaM相互作用が細胞内Ca^{2+}濃度により制御されること、また、Ca^{2+}/CaMがTET1-HDAC1の相互作用を阻害することで、TET1の触媒ドメインのアセチル化調節を介して、その酵素活性を促進させることを明らかとした。このことは、カルシウムシグナルによるDNAメチル化修飾調節という全く新しいエピジェネティクス調節機構の存在を示している。

以上の成果は、細胞内光クロスリンク法が多様な細胞での相互作用解析へ適用可能であること、本法がエピジェネティクス調節機構のような複雑なタンパク質間相互作用ネットワークによって成り立つ現象の解明に有用であること、さらには、カルシウムシグナルという細胞外からの刺激に応答したエピジェネティクス調節機構を細胞が備えていることを示し、生命現象や疾患メカニズムの研究ひいては創薬研究への貢献が期待されることにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。