

“相互作用蛋白の同定をお引き受けします”

拝啓 皆様、お元気でご活躍のことと存じます。

私達は東北大学加齢医学研究所の加齢ゲノム制御プロテオーム寄付研究部門で、ヒト蛋白質の複合体解析技術を開発し、ゲノム安定性に関わる未知及び既知蛋白質の蛋白質複合体を解析してそれらの細胞内機能を研究して来ました。同時に、この技術を用いて附置研究所の義務である国内及び国際共同研究を行なって参りました（論文リストをご参照下さい）。その際にはタグ付きバイト蛋白の発現細胞の樹立と免疫沈降による相互作用蛋白質の同定法を用いました。この方法には幾つかの制限があり、その克服の為に、組換え蛋白を用いた相互作用蛋白質のアフィニティ精製技術を確立させました。この技術は細部内分子数の少ない結合蛋白質を見つけ、ES細胞や免疫細胞など種々の培養細胞に限らず、特定の臓器の細胞内の相互作用蛋白を同定することや、ミトコンドリアでの相互作用蛋白、膜蛋白や巨大複合体の結合も明らかにすることが可能です。大腸菌あるいはバキュロ細胞で作った組換え蛋白で全長や部分のドメインに結合する特定の細胞由来の結合蛋白の同定や、二つの似通った蛋白質の相互作用蛋白の違いを決めることも可能です。アフィニティを用いた相互作用蛋白の同定は、結合蛋白候補が数週間で決められる長所もあります。私はこの技術を是非皆様の研究対象の蛋白質に使って頂きたいと思い、共同研究や受託研究を募集しております。詳しくは、直接 akira.yasui.d8@tohoku.ac.jp 宛にメールでお尋ね下さい。

御連絡頂く事、お送り戴くもの、負担して頂く費用：

1) まずメール (akira.yasui.d8@tohoku.ac.jp 宛)で遺伝子の名称をお知らせ下さい。どのような細胞環境での相互作用蛋白を調べられたいかをお伝え下さい。遺伝子がコードする蛋白質のバイオインフォマティクスを検討し、実験の計画をご相談します。

2) その後にバイト蛋白をコードする遺伝子の cDNA をお送り下さい。ベクターに入っている制限酵素部位などをご存知の場合はお知らせ下さい。ヒト 293 細胞のエキストラクト（核及びサイトゾール分画）は準備していますが、他の細胞をご希望の場合はエキストラクト調整のために必要な細胞のペレット(1ml 以上)をお送り下さい。実験は直ちに開始しますが、条件検討などのために追加的な実験が必要な場合があります、2ヶ月程度の期間をお考え下さい。

3) 費用について；継続してのサポートを可能にする為に、組換え蛋白の作製と精製や結合蛋白のアフィニティ精製に必要な消耗品を納入していただきます（バイト蛋白質 1 本当り 3 万円とし、相当する消耗品をご連絡いたします）。SDS ゲルに展開した結合蛋白質候補の質量分析による同定には、そのゲルをお送りして質量分析をご依頼者にお任せするか、ご希望されれば、私達が技術指導する東北大学ベンチャーの（株）日本プロテオミクスで決定いたします。その際に、蛋白質バンド 1 本当り 3 万円のご負担をお願いします。多額の負担が掛からないような配慮をいたします。ご相談下さい。

東北大学・加齢医学研究所・加齢研フェロー

安井 明

実験例

早老症で有名なウエルナー症候群の原因蛋白 WRN のドメインを詳しく解析し、それぞれを大腸菌で GST 融合蛋白として作製し、カラムに結合させ、ヒト核エキストラクト中の結合蛋白を溶出してゲルに展開した後、質量分析でそれぞれのバンドを同定した結果です。WRN のように著名な蛋白であっても多くの新規結合蛋白とその結合部位が明らかになりました。

新しい技術で“新規相互作用タンパク質の探索”をサポートいたします。

通常に用いられているヒト培養細胞でのタグ付きバイト蛋白質の誘導発現と免沈法に加えて、当研究部門で開発したアフィニティカラムによる結合蛋白質の同定法は、これまでに知られていない新規の相互作用蛋白質の発見を可能にします(下図参照)。多くの重要な蛋白質は発現が制御され細胞内の分子数が少なく免疫沈降での同定が困難ですが、この方法で決定できます。また膜蛋白質など免沈の不可能な蛋白質の相互作用蛋白質や神経細胞等の特殊な細胞での相互作用蛋白質の同定も可能です。当研究部門では、件数を限って、新規相互作用蛋白質の同定をサポートいたします。詳細はメール (ayasui@idac.tohoku.ac.jp, #を@に変換して下さい) でお尋ね下さい。

ヒト細胞を使った二種類の相互作用タンパク質の同定法

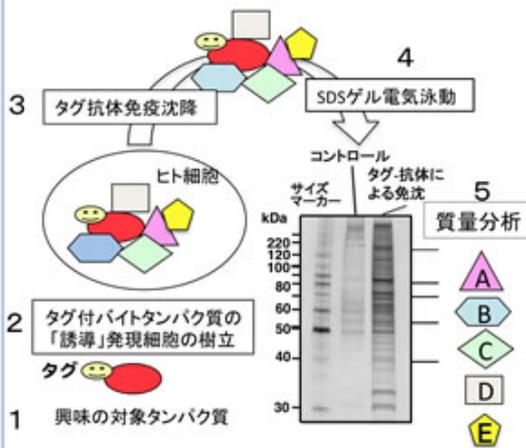


図1 細胞での発現と免沈
(一般に用いられている免沈法)

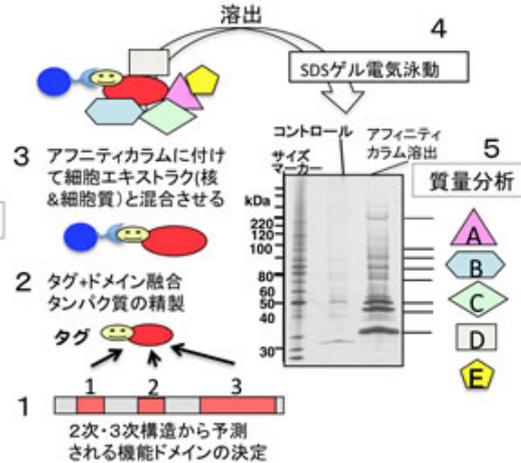
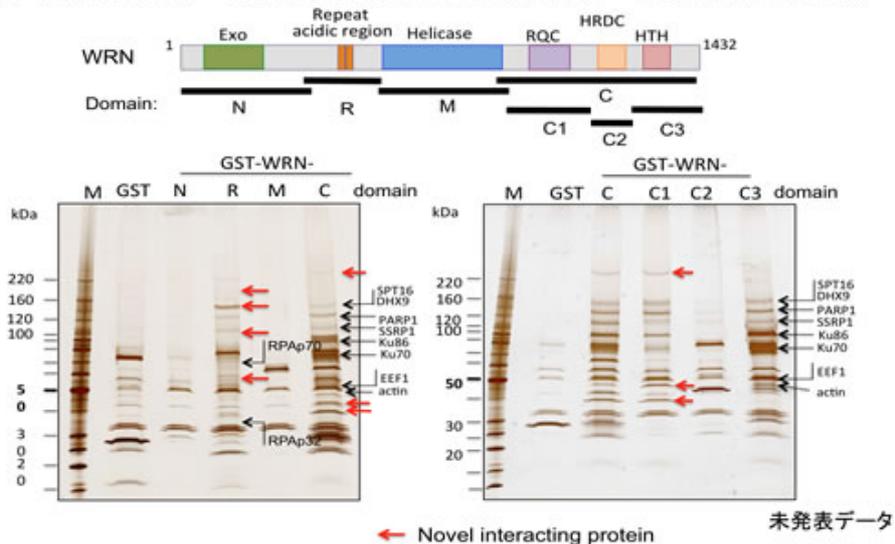


図2 アフィニティカラムでの結合と溶出
(独自開発の技術による免沈法の弱点の克服)

アフィニティカラムによる結合タンパク質同定の例

新規結合タンパク質の発見の例:バイトタンパク質は老化抑制機能があると考えられているWRN, ウエルナー早老症原因蛋白質で既に多数の結合タンパク質が知られている。蛋白質をバイオインフォマティクスで機能ドメインに分け、それぞれのGST-組換え蛋白質を作り、アフィニティカラムに付けてヒト細胞由来の核抽出物をアプライして、洗浄後溶出して質量分析器に掛け蛋白質を同定し7種の新規結合タンパク質を発見した。このように、機能ドメイン決定とアフィニティカラム法の組合せは新規結合タンパク質発見に重要です。



(文献) 私達の最近のプロテオミクス/共同研究の成果

1. Ui A, Nagaura Y., and Yasui A. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits Polycomb and switches off transcription for DSB repair. *Mol Cell*. 58:468-82, 2015
2. Homma Y, Kanno S, Sasaki K, Nishita M, Yasui A, Asano T, Ohashi K, Mizuno K. Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation. *J Biol Chem*. 289:26302-13 2014
3. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Mol Cell*, **53**, 101-14, 2014.
4. Musselman CA, Avvakumov N, Watanabe R, Abraham G, Allen C, Roy S, Nunez J, Nikolof J, Kulesza CA, Yasui A, Cote J and Kutateladze TG. Molecular basis for H3K36me3 recognition by the tudor domains of PHF1. *Nat. Struct. Mol Biol*. 19, 1266-1272, 2012.
5. Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, Tahara H, Neilan EG, Honma M, Nohmi T, Yasui A, and Tanaka K. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair.. *Nat Genet*. 44, 593-7, 2012.
6. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki SM, Ogiwara H, Kohno T, Kanno SI, and Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell* 40, 976-987, 2010.
7. Itoh G, Kanno SI, Uchida KS, Chiba S, Sugino S, Watanabe K, Mizuno K, Yasui A, Hirota T, and Tanaka K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J*. **30**, 130-144, 2011.