

高速タンパク質インタラクトーム技術の開発

東京大学先端科学技術研究センター合成生物学分野

谷内江 望

1. 目的

癌をはじめとする多くの疾患は単一の遺伝子の欠損ではなく複雑な細胞内ネットワーク動態の欠損に起因する。したがって、哺乳動物細胞内で様々な条件下におけるタンパク質ネットワークをはじめとするネットワーク動態を網羅的に同定することは細胞内の複雑な分子の作用機序を理解するために非常に重要であるが、現在までにそのようなテクノロジーはない。

短DNAリードを大量に解読できる次世代シーケンシング技術の登場によって「DNAバーコード」という考え方が大規模な細胞の表現型解析を可能にした。例えば、出芽酵母の一遺伝子破壊株のコレクションはそれぞれ人工合成されたDNAバーコードを破壊された遺伝子座をもつ。このため全ての破壊株を混合して一斉に細胞プールを薬剤などの環境下でスクリーニングすることができ、スクリーニング後の不均質な細胞集団は破壊株毎のDNAバーコード数を次世代シーケンシングによって数え上げることで解析できる。同様に、ベクター上にshRNAやCRISPR sgRNAをエンコードするDNAもDNAバーコードとして扱うことができる^{1,2}。これらのベクターをプール化して一斉に培養細胞にトランスフェクションし、スクリーニング後にバーコード数を定量することで対応する遺伝子それぞれへ摂動応答を網羅的に解析することが可能になった。

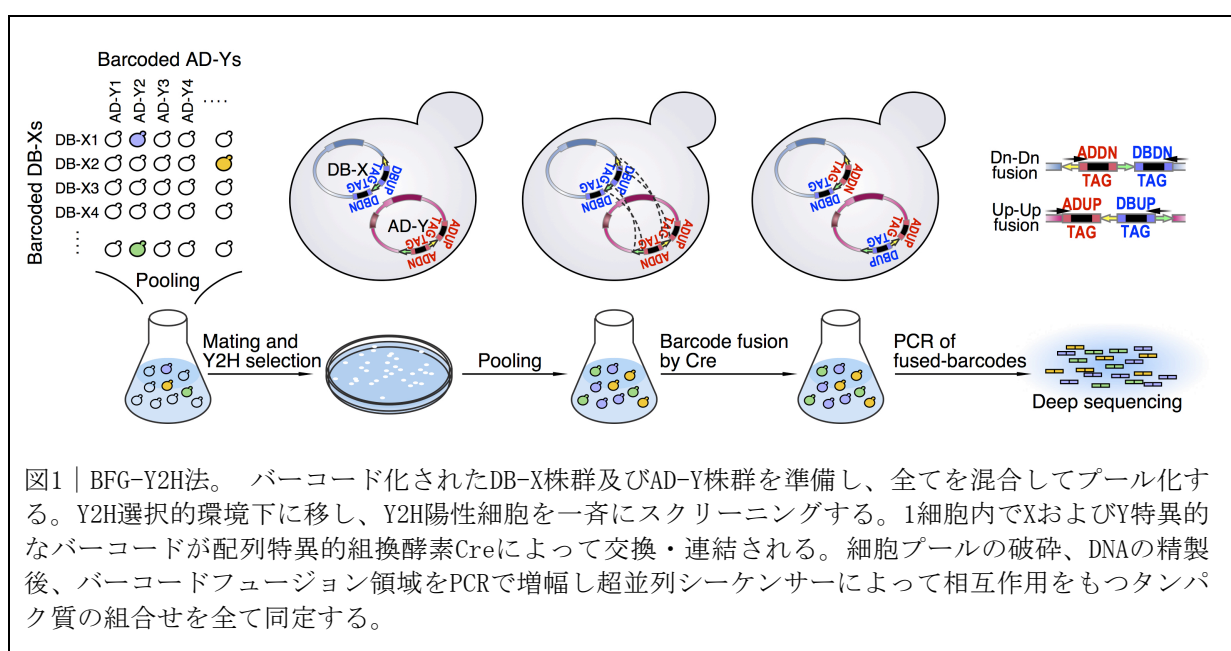


図1 | BFG-Y2H法。バーコード化されたDB-X株群及びAD-Y株群を準備し、全てを混合してプール化する。Y2H選択的环境下に移し、Y2H陽性細胞を一斉にスクリーニングする。1細胞内でXおよびY特異的なバーコードが配列特異的組換え酵素Creによって交換・連結される。細胞プールの破碎、DNAの精製後、バーコードフュージョン領域をPCRで増幅し超並列シーケンサーによって相互作用をもつタンパク質の組合せを全て同定する。

一方でこの方法論は細胞あたり改変や編集を二つ以上組み合わせた大規模スクリーニングに持ち込むためには、それぞれの組み合わせについて特異的なDNAバーコードを準備する必要があり、実現されていなかった。そこで申請者はCre-loxP反応を利用して、1細胞内それぞれで異なる二種類のバーコードを連結させ、細胞集団を超並列シーケンシングで一斉に解析する「Barcode Fusion法」を提案した。またこ

れをタンパク質の相互作用をスクリーニングする酵母ツーハイブリッド（Y2H）法³に応用したBarcode Fusion Genetics（BFG）-Y2H法を開発した。

2. 方法

BFG-Y2Hテクノロジーではターゲットとなるインタラクトームスクリーニングのスペースに対応する「バーコード化」された酵母一倍体DB-X株群及びAD-Y株群を準備する（図1）。すべての一倍体株はそれぞれDB-XまたはAD-Y特異的なDNAバーコードをDB-XまたはAD-Yベクターにそれぞれ二つずつ持つ。それぞれのDNAバーコードはCre DNA組換え酵素の認識配列であるlox配列に挟まれている。スクリーニングのために、バーコード化されたDB-X株群及びAD-Y株群はそれぞれ混合してプール化される。DB-Xプール及びAD-Yプールはさらに混合され、一つの試験管内のプール環境下でDB-X細胞とAD-Y細胞の接合が一斉に行われ、タンパク質間相互作用をもつY2H陽性の二倍体細胞は一斉にリポーター遺伝子スクリーニングによって選択される。プール内で選択されたY2H陽性の細胞それぞれについて細胞内でCre酵素を誘導的に発現させ、高効率のDNA組換えによってDB-XおよびAD-Y特異的なバーコードを連結させる（バーコードフュージョン）。その後、細胞は破碎され、プラスミドベクターが抽出され、DB-Xベクター及びAD-YベクターのフュージョンバーコードはPCR法によって増幅され、超並列シーケンサーで一斉に解読することにより、ターゲットスペースに含まれるインタラクトーム（Y2H陽性のXY組合せ全て）が網羅的に同定される。

3. 結果

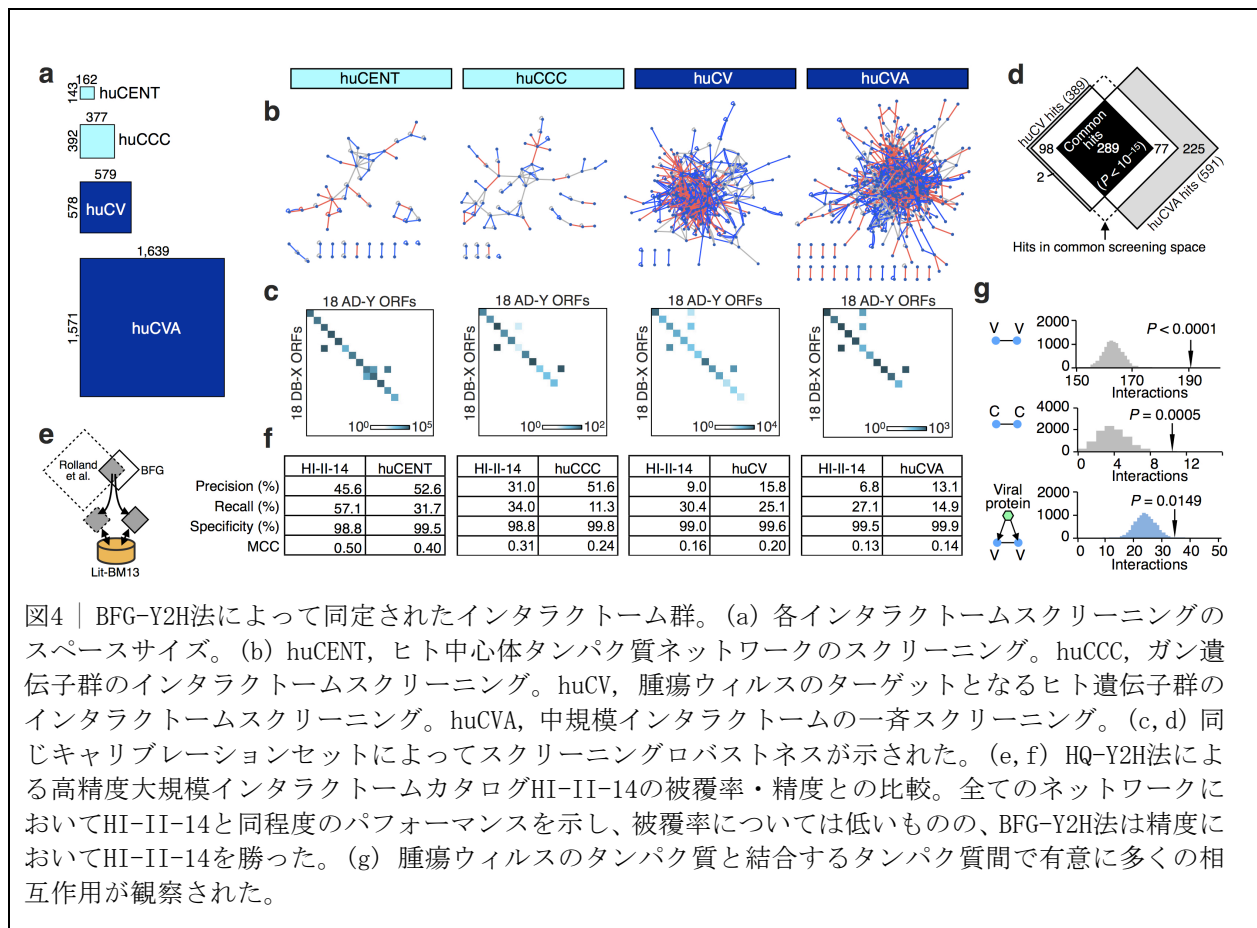


図4 | BFG-Y2H法によって同定されたインタラクトーム群。(a) 各インタラクトームスクリーニングのスペースサイズ。(b) huCENT, ヒト中心体タンパク質ネットワークのスクリーニング。huCCC, ガン遺伝子群のインタラクトームスクリーニング。huCV, 腫瘍ウィルスのターゲットとなるヒト遺伝子群のインタラクトームスクリーニング。huCVA, 中規模インタラクトームの一斉スクリーニング。(c, d) 同じキャリブレーションセットによってスクリーニングロバストネスが示された。(e, f) HQ-Y2H法による高精度大規模インタラクトームカタログHI-II-14の被覆率・精度との比較。全てのネットワークにおいてHI-II-14と同程度のパフォーマンスを示し、被覆率については低いものの、BFG-Y2H法は精度においてHI-II-14を勝った。(g) 腫瘍ウィルスのタンパク質と結合するタンパク質間で有意に多くの相互作用が観察された。

BFG-Y2H法を開発し、ヒトの中心体タンパク質ネットワーク（ $\sim 150 \times 150$ ）、腫瘍遺伝子ネットワーク（ $\sim 350 \times 350$ ）、腫瘍ウィルスターゲット遺伝子ネットワーク（ $\sim 600 \times 600$ ）、中規模ヒトインタラクトーム（ $\sim 1,500 \times 1,500$ ）をスクリーニングした結果、BFG-Y2H法が既存の高速Y2Hスクリーニング手法群と同等の精度をもつことを示した（図2）。

4. 考察

タンパク質1ペアの直接的な相互作用をアッセイする方法には通常のY2H法がある。Y2H法はこれまでに様々な生物種のインタラクトームを高品質で大規模に計測するために用いられてきた^{4,5}。Y2H法は主に物理的なタンパク質間相互作用を同定する。他にはPCA、MAPPIT、LUMIER法などがある。特にMAPPITとLUMIER法はヒト細胞を用いて生理的な相互作用を計測するのに用いられて来た。いずれも一つのアッセイで一つのタンパク質間相互作用を捉えるためにそのコストは高い。

一つのベイトタンパク質について、それが生理的に結合するタンパク質群を網羅的に同定する「一对多」スクリーニング手法には質量分析を用いたものがある(AP-MS)。AP-MSは直接的に相互作用するタンパク質と間接的なものを区別することができない。他の「一对多」手法には次世代シーケンサーとY2H法や ORFeomeプールのin vitro翻訳と組み合わせたものがある。これまで複数のタンパク質の組合せについて相互作用を全て一斉にスクリーニングする「多対多」の手法はなかったが、申請者はこれをBFG-Y2H法の開発によって実現し、貴財団の助成期間中に最大で250万のタンパク質ペアについて数週間程度でスクリーニングできることを実証した⁶。

5. 参考文献

1. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F (2014) Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 343: 84-87
2. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science* 343: 80-84
3. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
4. Rolland T, Tasan M, Charleat B, Pevzner SJ, Zhong Q, Sahni N, Yi S, Lemmens I, Fontanillo C, Mosca R, Kamburov A, Ghiassian SD, Yang X, Ghamsari L, Balcha D, Begg BE, Braun P, Brehme M, Broly MP, Carvunis AR et al (2014) A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* **159**: 1212-1226
5. Sahni N, Yi S, Taipale M, Fuxman Bass JI, Coulombe-Huntington J, Yang F, Peng J, Weile J, Karras GI, Wang Y, Kovacs IA, Kamburov A, Krykbaeva I, Lam MH, Tucker G, Khurana V, Sharma A, Liu YY, Yachie N, Zhong Q et al (2015) Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. *Cell* **161**: 647-660
6. Yachie N, Petsalaki E, Mellor JC, Weile J, Jacob Y, Verby M, Ozturk SB, Li S, Cote AG, Mosca R, Knapp JJ, Ko M, Yu A, Gebbia M, Sahni N, Yi S, Tyagi T, Sheykhkarimli D, Roth JF, Wong C, Musa L, Snider J, Liu Y-C, Yu H, Braun P, Stagljar I, Hao T, Calderwood MA, Pelletier L, Aloy P, Hill DE, Vidal M & Roth FP. Pooled-matrix protein interaction screens using Barcode Fusion Genetics. (in preparation)