

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		デジタル蛋白カウンティング技術の開発とそれを利用した蛋白間相互作用の絶対定量			
研究テーマ (欧文) AZ		Digital protein counting of interactome mapping			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)ヤザキ	名)ジュンシ	研究期間 B	2014 ~ 2016 年
	漢字 CB	矢崎	潤史	報告年度 YR	2016 年
	ローマ字 CZ	Yazaki	Junshi	研究機関名	理化学研究所
研究代表者 CD 所属機関・職名		理化学研究所・上級研究員、RIKEN/Senior Research Scientist			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) DNA バーコーディング技術は既に核酸分子の絶対定量法として確立されており、この技術と蛋白間相互作用解析技術を組み合わせることで、蛋白分子の絶対定量が可能となる。この目的を達成するために、予定していた次の1-4が終了した。1. アミド結合によるDNAバーコード-リガンド複合体作製、2. タグ蛋白-DNAバーコード複合体作製、3. DNAバーコードによる蛋白定量とルシフェラーゼ定量との比較、4. NGS を利用した陽性コントロール分子間相互作用検出。これらの結果、NGS による蛋白分子数測定が既存のルシフェラーゼ蛋白定量より、~10000 倍ダイナミックレンジが広いことが示され、更に既知の蛋白間相互作用 2 種の検出に成功した。計画した研究がほぼ終了し、蛋白-DNA バーコード複合体の NGS による蛋白測定が可能となったため、現在はより効率の良い複合体作製と実際の試料を用いた蛋白定量を目的とし研究を継続中である。上記 2, 3 における各複合体の精製と収率はどちらも 10-30%程度と低く、また、リガンド-DNAバーコード複合体作製におけるアミド結合は水溶液反応ができないので時間的・経済的・実験操作において非効率的であった。そこで新複合体作製法として、アミド結合とは異なる方法を利用しリガンド-DNAバーコード複合体を作製し、それに蛋白を結合させ蛋白-DNAバーコード複合体を作製した。新複合体作製方法では精製蛋白を用いた際、蛋白のほぼ 100%が DNAバーコードに結合した。現在、未精製蛋白を使用しこの新複合体作製法による蛋白-DNAバーコード複合体作製を行っている。新規複合体作製方法では高価格なリガンド、修飾DNAバーコードをムダにすることなく未精製蛋白に対して使用できるため時間的・経済的に効果が高く、この複合体作製ステップをほぼ 100%の効率で行えることは画期的である。今後この新規複合体作製方法を利用して作製された複合体を使用し、分子間相互作用が検出されることを統計的(n>10)に証明し、実際の生体試料における蛋白絶対定量を行う予定である。					
キーワード FA	蛋白定量	NGS	バーコーディング	インタラクトーム	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

DNA barcoding technologies enable investigation of the amount of the absolute numbers of molecules which the DNA barcode are attached using by next generation sequencing (NGS) technology. Using this approaches, we developed Protein-DNA barcode assays comprising target ORFs fused with DNA barcode. To develop this, we designed DNA barcode oligo, and introducing the modification using NHS Ester chemistry. The ester ligand was conjugated with the amine modified DNA barcode and purified by reverse phase HPLC. To prepare protein-DNA complex, we incubated purified proteins and the barcode as 1:5 in the PBS buffer for more than 1 hour. Then the protein-DNA barcode complexes were purified by HPLC anion exchange column. We used these complexes of protein-DNA to measure the dynamic range of the assay, and compared the detection sensitivity with the luciferase assay. Then the result showed the Protein-DNA barcode method showed up to more 1000 times than the luciferase assays, as revealed by direct detection of barcoded proteins using NGS. Barcoded protein query Protein G captured with immune globulin G (IgG), in agreement with previous reports as a positive reference interactions. Besides of these assays, Protein-DNA barcode can readily applied to other pairs of protein-molecule interaction, particularly auto immune systems for which antiserum collections already exist.