

RIME 法を利用したタンパク質間相互作用解析とその応用

東北大学大学院医学系研究科・分子内分泌学分野
准教授 横山 敦

Keywords: 質量分析、タンパク質間相互作用、RIME 法、前立腺癌、乳癌、AR、HER2

1.はじめに

近年、疾患の分子メカニズム解明や創薬標的の探索を目的として、遺伝子発現やエピゲノムなどの網羅的解析が急速に進展している。しかしながら、遺伝子配列や mRNA の発現量だけでは細胞機能や疾患病態の理解には不十分であり、その産物であるタンパク質群がどのように相互作用し細胞内機能ネットワークに影響を与えるかを解析することが重要である。すなわち、膜受容体や転写因子といった制御因子が形成するタンパク質複合体の動態を把握することは、疾患病態の理解において欠かせない要素となってきた^{1, 2)}。

タンパク質間相互作用の解析には、免疫沈降 (IP) やウェスタンブロッティング (WB) をはじめとする手法がこれまでも用いられてきたが、あらかじめ候補となる相互作用分子を想定せずに、無作為かつ網羅的に複合体構成因子を同定する手法、特に動物組織やヒト組織からそれを行う技術には長らく技術的な制約があった。近年、質量分析技術の進歩と試料調製プロトコルの工夫により、この課題を克服しつつある手法として注目されているのが、RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins) 法である³⁾。

本総説では、RIME 法の基本原理とその利点を概説するとともに、筆者らが行ってきた培養細胞 (前立腺癌由来細胞株におけるアンドロゲン受容体の複合体解析) やヒト病理検体 (乳癌検体における HER2 複合体の同定) を用いた RIME 法の応用研究について紹介する。とりわけ、ヒト病理検体からの複合体解析が可能であるという点は、RIME 法を臨床応用の文脈で捉える上で極めて意義深いと考えている。本稿が、分子生物学的な知見と病理・内分泌臨床をつなぎ、内分泌疾患研究における新たな視点を提供する一助となれば幸いである。

2.RIME法の原理と利点

RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins) 法は、標的となる内在性タンパク質に対する抗体を用いてタンパク質複合体を免疫沈降し、その構成因子を質量分析により同定する手法である。2013年に、乳癌由来培養細胞よりエストロゲン受容体の複合体解析法として初めて報告されている⁴⁾。RIME法では細胞あるいは組織をホルムアルデヒドで架橋固定したのち、抗体ビーズを用いて複合体をアフィニティー精製し、得られたビーズ上の複合体を直接トリプシン消化(オンビーズ消化)する^{3,5)}。消化されたペプチドはLC-MS/MSによって分析され、データベース検索を通じて構成タンパク質が同定される(図1)。精製からデータ取得までの所要日数が比較的短いこと(概ね3日間、Rapidの命名の由来)も特徴の一つである。

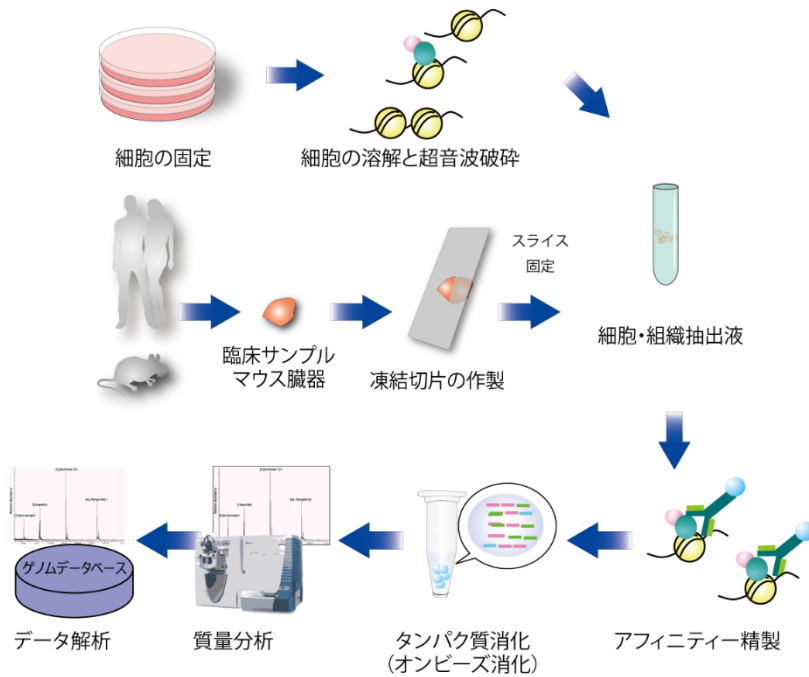


図1 RIME法によるタンパク質複合体同定の概略図

この手法の大きな利点は、外来性タグの導入や過剰発現を必要とせず、内在性のタンパク質に対する抗体を用いて複合体を同定できる点にある。これにより、細胞株だけでなく、マウス臓器やヒト病理検体などの実臨床に近い材料からも、解析目的とする因子の複合体構成を把握することが可能となった。また、固定操作により一過性あるいは弱い結合の相互作用因子も安定に回収できる点は、従来法では見逃されがちであった低アフィニティー結合の相互作用因子の同定に大きく貢献している³⁾。

類似の質量分析を利用した手法には、過剰発現タンパク質にタグを付加し

精製する IP-MS や、クロマチン免疫沈降と質量分析を組み合わせた ChIP-MS、ビオチン化酵素を用いて近傍タンパク質をラベルする BioID などがある¹⁾。これらの手法と比較して、RIME 法は特別な遺伝子操作を必要とせずに、核内あるいは細胞内のタンパク質ネットワーク全体を俯瞰できる点や、内在性発現レベルでの解析が可能である点において優位性を持つ。さらに、得られたスペクトルデータは同位体ラベルもしくはラベルフリー定量解析にも適しており、コントロール群との比較により、条件特異的な相互作用因子を統計的に抽出することも可能である。

3.応用例：培養細胞およびヒト病理検体を用いた RIME 解析

3.1. AR 相互作用因子の同定：EAP1 を例に

アンドロゲン受容体 (AR) は前立腺癌の発症・進展における鍵分子であり、その活性制御に関わる転写共役因子 (coregulator) は新たな創薬標的として注目されている。筆者らは、AR と相互作用するタンパク質複合体の全体像を明らかにすべく、前立腺癌細胞株 LNCaP において RIME 法による AR 複合体の解析を行った。その結果、クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾酵素を含む多様な既知の AR 相互作用因子に加え、EAP1 (Enhanced At Puberty1) という新規の coregulator 候補を同定した⁶⁾。

EAP1 は従来の免疫沈降法では AR との結合が検出されなかったが、RIME 法では再現性高く検出され、細胞内でのタンパク質相互作用検出法である Proximity Ligation Assay (PLA) によってその核内共局在性も確認された。さらに、EAP1 の病理解析からその発現と前立腺癌の予後との間に有意な相関があることが明らかとなった。これらの結果は、一過性かつ生化学的に不安定な相互作用の同定において RIME 法が有用であること、ならびに AR 制御における EAP1 の新たな役割を示唆している。

3.2. HER2 複合体の同定：病理検体を用いた RIME 法の応用

HER2 (ERBB2) は EGFR ファミリーに属するチロシンキナーゼ型膜受容体であり、乳癌の約 20~25% で過剰発現または遺伝子増幅が認められ、腫瘍の悪性度の増加や予後不良と関連することが知られている⁷⁻⁹⁾。こうした背景から、HER2 を標的とする分子標的治療 (トラスツズマブ、ペルツズマブなど) が開発され、HER2 陽性乳癌の治療成績は大きく改善されてきた。

しかし近年、HER2 と相互作用するタンパク質群 (interactome) の構成が、乳癌のサブタイプごとに多様であり、この複合体構成の違いが腫瘍の挙動や治療反応性に影響を与える可能性が示唆されている¹⁰⁻¹²⁾。HER2 の共

受容体やシグナル伝達関連因子の組み合わせが異なることで、同じ **HER2** 陽性乳癌でもその生物学的特性や治療反応性に差が生じることがあり、精密医療の観点から **HER2** 複合体の実態を明らかにすることが喫緊の課題となっている。

しかしながら、実際のヒト乳癌組織における **HER2** 複合体の網羅的解析は、試料調製や技術的制約のため困難であった。そこで筆者らは、膜画分のタンパク質から複合体解析を行えるよう **RIME** 法を改良し、乳癌の手術検体に応用することで、**HER2** と相互作用するタンパク質群の網羅的同定を試みた。**HER2** 発現陽性の乳癌病理標本から **RIME** 法を実施した結果、既知のパートナーに加え、**MARCKS** (**Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate**) を新規の相互作用因子として同定した¹³⁾。

MARCKS はアクチン細胞骨格の制御や細胞移動、シグナル伝達に関与する膜結合タンパク質であり、乳癌における腫瘍進展やホルモン非依存性との関与が報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。実際に、**TCGA** データ解析では、**MARCKS** 高発現例が **ER・PR** 陰性例と有意に相関し、腫瘍変異負荷の増加および若年発症と関連していた。このことは、**HER2** と **MARCKS** との複合体形成が、ホルモン抵抗性や悪性度に影響を与える可能性を示唆するとともに、病理検体からの **RIME** 解析の実現可能性を示すものであると考えている。

4. 今後の展望と課題

RIME 法は、内在性タンパク質を対象とした網羅的相互作用解析を比較的短期間かつ高感度で実施可能な手法であり、特に固定操作を行うことで複合体解析において既存手法では得られなかった相互作用の弱い因子に関する情報ももたらす点で極めて有用である。本稿で紹介したように、**AR** や **HER2** といった疾患関連性の高い因子の複合体構成を、細胞株にとどまらずヒト病理検体からも同定可能であるという点は、今後の臨床応用の可能性を大きく拓くものである。

一方で、**RIME** 法にはいくつかの技術的課題も存在する。たとえば、高品質な抗体の選定や最適化は成功の可否を大きく左右する。また、固定条件や抽出バッファの違いによって検出される複合体の構成が変化する可能性があるため、標準化されたプロトコルの整備が求められる。

大規模に得られたプロテオーム情報の解析には高度なバイオインフォマティクスが必要であり、今後は定量解析や **AI** を用いたネットワーク解析との統合が重要になると考えられる。また、**RIME** 法で同定された相互作用因子を、**PLA** (**Proximity Ligation Assay**) などの *in situ* 近接検出法を用いて組織スライド上で可視化・検証することで、空間的な情報を含めた相互作用

の存在を確認することも可能となる。こうした網羅解析と組織局在解析との連携は、分子病態の解像度を飛躍的に高めることが期待される。

さらに、**RIME**法は単なる基礎研究ツールにとどまらず、病理学的診断の次なるステージ“次世代病理学”への道を拓く技術としての可能性も秘めている。従来の形態学的所見に加えて、組織内で実際に形成されているタンパク質複合体の分子プロファイリングを導入することで、病理診断の概念そのものを拡張し個別化医療に貢献する可能性がある。今後、より多くの臨床検体を対象とした大規模な**RIME**解析が進むことで、その応用範囲はさらに拡大していこう。

5.おわりに

本稿では、内在性タンパク質の網羅的相互作用解析を可能とする**RIME**法の原理と特徴を概説し、筆者らの研究成果をもとに、前立腺癌細胞株を用いた**AR**複合体の解析、およびヒト乳癌病理検体を用いた**HER2**複合体の同定という応用例を紹介した。特に後者では、**RIME**法を用いることで従来の手法では困難であったヒト病理検体からの膜受容体複合体の同定が可能であることを示し、新たな相互作用因子**MARCKS**の発見につながった。

RIME法は、質量分析技術の進展と分子病理学的手法の融合によって生まれたプラットフォーム技術であり、今後、がんをはじめとする様々な疾患における病態解明やバイオマーカー探索の強力な手段となる可能性を有している。また、網羅解析と*in situ*検出との連携により、次世代病理学的診断への応用も視野に入る。分子生物学、病理学、臨床医学をつなぐ技術として、**RIME**法は今後さらに発展し、疾患理解と個別化医療に貢献することが期待される。

参考文献

- 1) Bludau, I., Aebersold, R.: Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 327-340, 2020.
- 2) Yokoyama, A., Fujiki, R., Ohtake, F. *et al.*: Regulated histone methyltransferase and demethylase complexes in the control of genes by nuclear receptors, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 165-173, 2011.
- 3) Mohammed, H., Taylor, C., Brown, G.D. *et al.*: Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes, *Nat Protoc*, 11, 316-326, 2016.
- 4) Mohammed, H., D'Santos, C., Serandour, A.A. *et al.*: Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor, *Cell Rep*, 3, 342-349, 2013.
- 5) Papachristou, E.K., Kishore, K., Holding, A.N. *et al.*: A quantitative mass spectrometry-based approach to monitor the dynamics of endogenous chromatin-associated protein complexes, *Nat Commun*, 9, 2311, 2018.
- 6) Yokoyama, A., Kouketsu, T., Otsubo, Y. *et al.*: Identification and Functional Characterization of a Novel Androgen Receptor Coregulator, EAP1, *J Endocr Soc*, 5, bvab,150, 2021.
- 7) Dowsett, M., Allred, C., Knox, J. *et al.*: Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial, *J Clin Oncol*, 26, 1059-1065, 2008.
- 8) Giaquinto, A.N., Sung, H., Miller, K.D. *et al.*: Breast Cancer Statistics, 2022, *CA Cancer J Clin*, 72, 524-541, 2022.
- 9) Knowlden, J.M., Hutcheson, I.R., Jones, H.E. *et al.*: Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells, *Endocrinology*, 144, 1032-1044, 2003.
- 10) Iwabuchi, E., Miki, Y., Sasano, H.: The Visualization of Protein-Protein Interactions in Breast Cancer: Deployment Study in Pathological Examination, *Acta Histochem Cytochem*, 54, 177-183, 2021.
- 11) Prat, A., Pascual, T., De Angelis, C. *et al.*: HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade, *J Natl Cancer Inst*, 112, 46-54, 2020.

- 12) Yarden, Y., Pines, G.: The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology, *Nat Rev Cancer*, 12, 553-563, 2012.
- 13) Yokoyama, A.S., S.; Ebata, A.; Miki, Y.; Otsubo, Y.; Suzuki, T.: HER2 Interactome Profiling Reveals MARCKS as a Candidate Marker Associated with Aggressive Breast Cancer. , submitted,
- 14) Fong, L.W.R., Yang, D.C., Chen, C.H.: Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS): a multirole signaling protein in cancers, *Cancer Metastasis Rev*, 36, 737-747, 2017.
- 15) Manai, M., I, E.L.-D., Finetti, P. *et al.*: MARCKS as a Potential Therapeutic Target in Inflammatory Breast Cancer, *Cells*, 11, 2022.
- 16) Manai, M., Thomassin-Piana, J., Gamoudi, A. *et al.*: MARCKS protein overexpression in inflammatory breast cancer, *Oncotarget*, 8, 6246-6257, 2017.

RIME法を利用したタンパク質間相互作用解析とその応用

2025年5月13日発行

公益財団法人山口内分泌疾患研究振興財団
〒105-0014 東京都港区芝2丁目28-11
E-Mail : office@yamaguchi-endocrine.org