

研究題目 マウス生体内汎用型近接タンパク質ビオチン標識法の開発

研究組織

研究代表者：谷内一郎（理化学研究所免疫転写制御研究チーム）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：奥山一生（理化学研究所免疫転写制御研究チーム）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

生体分子の機能や作用原理を理解するためには相互作用因子の同定が不可欠である。タンパク質-タンパク質間相互作用の検出系として、酵素活性を利用し標的タンパク質の近位に存在するタンパク質を網羅的に化学修飾する Proximity based labelling 法が開発された。ビオチン化酵素 BirA の R118G 変異型である BirA* を利用した BioID 法はその一つであり、標的とするタンパク質に BirA* を融合させ、標的タンパク質の近位約 10 nm に存在するタンパク質が網羅的にビオチン化される。現在では BirA* に改良が加えられ、愛媛大の澤崎らは特異性が向上した AirID を開発した。細胞レベルでの BioID 解析の報告は多いが、マウス生体内では外来性タンパク質の導入による成功例が数報あるのみであり、内在性タンパク質に BirA*/AirID を融合させたノックイン Tg マウスによる生体内 BioID 法の成功例は未だ報告が無い。研究代表者の谷内はこれまでに ES 細胞での相同組み換えを利用し SATB1 タンパク質、Runx 転写因子の機能に必須である Cbfb タンパク質に AirID 配列を付与したノックイン Tg マウスを作製し、これら AirID 融合タンパク質を発現する Tg マウスにビオチン水を 5 日間与えたのち、組織を採取し、小迫らが開発した Tamavidin 2-REV 法による質量分析解析によりビオチン化ペプチドの網羅的な同定を行い、SATB1、Cbfb のインターラクトーム解析に成功し、AirID を用いたマウス生体内 BioID 法の実施最適条件を検定した実績を有する。本研究課題では、生体内 BioID 法の汎用性を向上させる事を目的に、SunTag 系による AirID の標的分子(タンパク質、DNA、RNA)への集積を可能とする技術の開発を行う。

[1-2] 研究の方法・経過

SunTag 系は GCN4 抗原と反応する scFv 抗体を利用し、多コピーの scFV 融合タンパク質を目的の細胞内領域への集積させる実験系である。谷内は既に scFV-AirID 融合タンパク質を発現する Tg マウスを樹立している。理論的にはタンパク質を標的とした場合、GCN4 配列を標的タンパク質へ目的の生体分子に付与する事で標的タンパク質へ scFv-AirID 融合タンパク質を集積させることが可能である(SunTag BioID 法)(図 1A)。DNA を標的とした場合、dCas9-GCN4 を gRNA により目的の DNA 配列に集積させ、GCN4 配列を介して多コピーの scFv-AirID 融合タンパク質を標的ゲノム領域周辺に集積させることで可能であり、標的とするゲノム領域上の核タンパク質複合体の同定が可能となる(CRISPR on-site BioID 法)。同様に gRNA を介した Cas13 の RNA への標的を利用し、dCas13-GCN4 による標的 RNA への scFv-AirID 融合タンパク質の集積により RNA 結合タンパク質を同定(CRISPR RNA BioID 法)も可能と考えられる。

2022 年度の研究では膜タンパク質である CD4 の細胞内領域へ GCN4 配列(x3)を付与した CD4-GCN4 融合タンパク質を発現する Tg マウスを作製し、scFv-AirID Tg マウスと交配し、scFv-AirID 融合タンパク質が細胞膜に集積されることを観察した(図 1B)。胸腺細胞を用いてビオチン化タンパク質を小迫が行い、既存の CD4 相互作用タンパク質がビオチン化されていることが確認できた(図 1C)。

また dCas9-GCN4(x10)を発現するマウスを scFv-AirID Tg マウスと交配し、CD8T 細胞に gRNA を導入した後、クロマチン免疫沈降法に

より dCas9-GCN4 が目的のゲノム領域に結合していることを確認した。

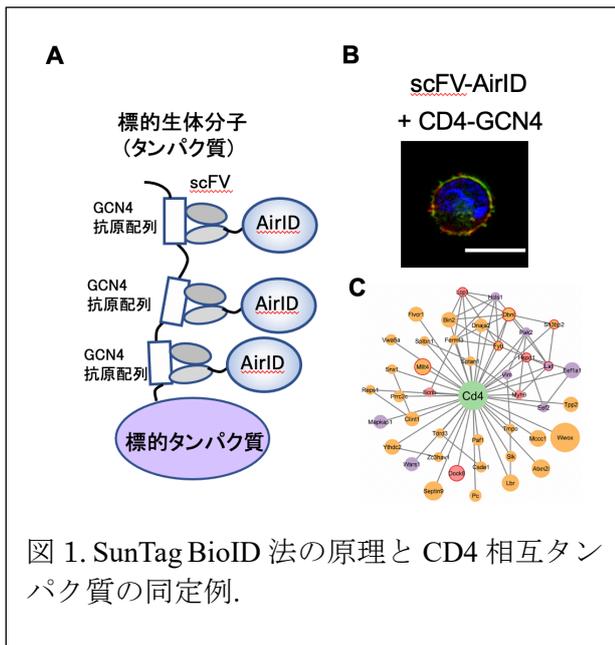


図 1. SunTag BioID 法の原理と CD4 相互タンパク質の同定例.

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

SunTag BioID 法がマウス生体内で機能することを強く支持する結果を得た。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

SunTag BioID 法がマウス生体内でのタンパク質-タンパク質間相互作用の検出系として汎用される効果が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

谷内一郎、生体内近接ビオチン標識法の開発と応用、第 95 回日本生化学会大会、名古屋、11 月 10 日、2022 年。

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、

CRISPR on-site BioID 法、CRISPR RNA BioID 法の開発。