

研究題目 BioID 法を用いた TCR シグナル伝達分子の定量的解析

研究組織

研究代表者：清水 謙次（東京大学定量生命科学研究所）

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：阿比留 龍喜（東京大学定量生命科学研究所）

岡崎 拓（東京大学定量生命科学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

免疫チェックポイント阻害療法は画期的な治療法ではあるものの、奏効率が限られていること、副作用として自己免疫疾患様の症状を発症することなどが問題となっている。免疫チェックポイント阻害療法をより効果的かつ安全に使用するには、各免疫補助受容体の機能を正確に理解することが重要である。

我々はこれまでの研究で、遺伝子によって PD-1 による発現抑制の程度が大きく異なること（Shimizu et al, Mol Cell, 2020）、TCR と抗原の親和性が低いほど PD-1 による抑制を強く受けることを明らかにした（Shimizu et al, PNAS, 2021）。しかしながらこれらの研究は遺伝子発現を指標に行われているため、PD-1 が実際に TCR シグナルを構成する分子をどのように変化させるのかについては不明である。そこで本研究では、近接依存性標識法を用いることで、抗原濃度や抗原親和性が TCR シグナル周辺に集まる分子に与える影響を定量的に解析することを試みた。そして、PD-1 をはじめとした免疫補助受容体がそれらにどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

近接依存性標識法は、目的タンパク質に酵素を融合し、その酵素が触媒することで近接した（相互作用した）タンパク質を標識する手法である。しかし、注目する分子に分子量の大きい酵素を直接付加すると、機能や局在、近傍に存在する分子の種類や数が増えることが懸念される。そこで本研究では、8～10 アミノ酸のペプチド配列（以下 pVHH、VHH 標的ペプチ

ド）を認識する VHH を利用した。

具体的には、TCR 複合体に含まれる分子および免疫シナプスに集まる分子に pVHH を付加し、T 細胞株に導入した。その細胞を抗原刺激し、刺激開始後任意の時間で固定した。高い空間分解能と酵素活性を有する改良型ビオチン化酵素である TurboID と VHH を融合させたキメラタンパク質を添加し、ビオチン存在化でインキュベートすることで、pVHH を付加した分子の近傍に存在するタンパク質のビオチンラベリングを行った。得られたサンプルを用いて、ビオチン化タンパク質の質量分析を行った。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

質量分析の結果、注目した分子自身を含め、多数の分子がビオチン化されていることが確認できた。特に、TCR シグナル関連分子が多く同定されていることから、固定および刺激条件など、本実験系が機能していることが強く示唆された。

また、複数の分子について解析を行った結果、それぞれに特徴的なビオチン化タンパク質が検出されたことから、免疫シナプスという狭い構造の中でも、周囲に集まる分子の種類や数、局在の変化を鋭敏に検出できていると考えられた。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまで T 細胞の活性化は、サイトカインや活性化マーカー分子等の遺伝子発現量、タンパク質発現量、および TCR シグナル下流分子のリン酸化の程度を指標に解析されてきた。本共

同研究で開発した近接依存性標識法を用いた実験系は、T細胞の活性化をTCRシグナル周辺に集まる分子の変化という、従来とは全く異なる観点から解析するものであり、新たなTCRシグナル伝達機構が見出される可能性がある。また、免疫補助受容体等、様々な分子がTCRシグナルに与える影響を解析する際にも応用可能であり、大きな波及効果が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Takeo K. Maeda, Jun Ikubo, Harunori Yoshikawa, Katsumi Maenaka, Naozumi Ishimaru, Hidetaka Kosako, Tatsuya Takemoto, Taku Okazaki. Binding of the inhibitory co-receptor LAG-3 to stable peptide-MHCII limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*. 2022 May 10;55(5):912-924.e8.

[3-2]学会発表

1) Kenji Shimizu, Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Takumi Maruhashi, and Taku Okazaki. PD-1 preferentially inhibits the activation of low affinity T cells. JSICR MMCB 2022 Joint Symposium, Tokyo, June 9-10, 2022

[3-3]成果資料等

該当なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究では、TCRシグナルに明らかに無関係な分子も多数検出されてしまっていたことから、さらなる条件の改良を行う必要がある。また、今回用いた分子以外の、TCR複合体に含まれる分子および免疫シナプスに集まる分子についても検討し、TCRシグナルの変化を鋭敏に検出できる分子を選別していく。最終的には、PD-1をはじめとする免疫補助受容体がTCRシグナルに与える影響を比較、解析することで、TCRシグナル調節機構の解明を目指す。