

研究題目 汎用型マウス生体内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）

研究分担者：原田淳司（理化学研究所免疫転写制御研究チーム）

【1】研究の概要

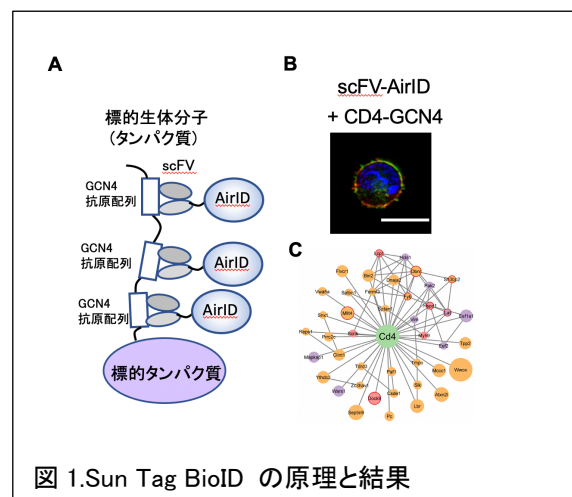
[1-1] 本研究の目的・概要

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 dependent 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*を融合させることで、標的タンパクの近位約 10 nm 径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に BirA*融合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トランスジェニック (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。

一方で、ES 細胞での相同組換えによる AirID の挿入は汎用性が低いことから、昨年度課題では汎

用性向上を目的に SunTag 系を応用した汎用型 BioID 法 (Sun Tag BioID) の開発を提案した。SunTag 系は GCN4 抗原ペプチドと反応する scFv 抗体を利用し、scFv-融合タンパク質を標的タンパク質に集積させる方法である [Cell.159:635,2014]。理論的には GCN4 配列を標的タンパク質に多コピー付与することで scFv-AirID 融合タンパク質を標的タンパク質周辺に集積させることが可能である (図 1A)。GCN4 配列はゲノム編集法で標的タンパク質への付与が容易に可能な長さであり、実際に昨年度の課題によりゲノム編集法により膜タンパク質である CD4 の細胞内領域への 3 コピーの GCN4 配列の付与に成功している。CD4-3xGCN4 Tg マウスと scFv-AirID Tg の交配で得られた産仔の T 細胞では scFv-AirID が細胞膜へ集積し (図 1B)、既存の CD4 会合分子がビオチン化されている事を確認している (図 1C)。GCN4 配列を利用した scFv-AirID の標的タンパク質への集積法では GCN4 のコピー数を増減することも可能であり、また GCN4 配列間に挿入されたヒンジ領域により高い可動性が予想され、AirID を直接標的タンパク質へ融合する手法に比し、より遠位に位置



するタンパク質のビオチン化が予想される。

本年度申請課題では、Runx1 の N 末端に AirID を融合させた AirID-Runx1 を Rosa26 遺伝子座から過剰量発現するマウス、内在性 Runx1 に AirID を付与し生理的量の AirID-Runx1 を発現するマウス、内在性 Runx1 に 3xGCN4 を付与した 3xGCN4-Runx1 を発現するマウスを作成し、その後 scFv-AirID を発現する Tg マウスと交配し、ダブル Tg マウスを作製する。これら種々のマウスから胸腺細胞を標的に、ビオチン標識されるタンパク質を比較検討することで、それぞれの実験系の特性を明らかにする課題を設定した。また CD8 の細胞内領域末端へ 3xGCN4 配列を付与した Tg マウスを作製し、cFv-AirID Tg マウスと交配することで、CD4 と CD8 の細胞内領域に会合する分子が異なるか検討する課題を設定した。

また SunTag 系の原理を CRISPR 系での single guide RNA (sgRNA) を介し Cas9 が目的とするゲノム DNA 配列へ標的出来る原理と併用すれば、gRNA/dCas9-GCN4(x10)/scFv-AirID 複合体を特定のゲノム DNA 配列へ標的し、標的ゲノム領域上で形成される核タンパク質複合体のビオチン化による同定が可能と考えられる (CRISPR on-site BioID 法)。本年度申請課題では CRISPR on-site BioID 法の最適条件化の検討を設定した。また本申請では sgRNA 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 の集積により RNA 結合タンパク質を同定する CRISPR RNA BioID 法の開発も設定した。

[1-2] 研究の方法・経過

2022 年度の研究で作製した CD4-GCN4 融合タンパク質を発現する Tg マウスを用いた検定では、CD4-GCN4/scFv-AirID ダブル Tg マウス由来の T 細胞では scFv-AirID 融合タンパク質が細胞膜に集積されること (図 1B)、小迫による胸腺細胞を用いたビオチン化タンパク質の質量分析解析により、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)。これら結果から Sun Tag BioID の有効性が確認された事を受けて、2023 年度ではヘルパー T 細胞とキラー T 細胞での CD4 会合分子の比較を行う為に、CD4-GCN4 をキラー T 細胞で発現させる目的で Cd4^{GCN4} アレルに対しゲノム編集を行い Cd4 silencer を欠損させたアレルを持つマウス系統を作製した。またゲノム編集法により CD8a 分子の細胞内領域に 3xGCN4 配列の挿入を行い、Cd8a^{GCN4} 変異アレルを有するマウス系統を作製し、scFv-AirID Tg マウスとの交配を行い、ダブル Tg マウスを作製した。現在

このマウスから質量分析解析用の細胞を調整した段階にある。

また 2022 年度に dCas9-GCN4(x10)由来の CD8⁺ T 細胞に sgRNA を導入した後、クロマチン免疫沈降法により dCas9-GCN4 の目的ゲノム領域への結合が濃縮されていることが確認できたので、本年度は scFv-AirID Tg マウスと交配を行い、ダブル Tg マウスを作製した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

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

奥山一生、谷内一郎、近接ビオチン標識法のマウス *in vivo* 解析への応用. 実験医学. 7 月号、2023.

[3-2] 学会発表

谷内一郎、マウス生体内近接ビオチン標識法の開発と応用、日本生化学会九州支部例会、長崎、6 月 24 日、2023 年。

奥山一生、マウス生体内 AirID 法の樹立と応用、第 46 回日本分子生物学会年会、12 月 7 日、2023 年。

原田淳司、Understanding of Lck functions during thymocyte differentiation by novel techniques. 第 52 回日本免疫学会学術集会、1 月 19 日、2024 年。

[3-3] 成果資料等

該当なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、

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