

研究題目 SunTag-BioID 法を用いた新規マウス生体内ビオチン標識法の開発

研究組織

研究代表者：小川 ちひろ（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：原田 淳司（理化学研究所免疫転写制御研究チーム）

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

(1) マウス生体内 SunTag-BioID 法を利用した T 細胞初期分化機構の解明

GCN4 抗原に結合する scFv 抗体を利用した SunTag 法を AirID による近接依存性ビオチン標識法に応用し、多コピー GCN4 を付与した標的蛋白質と scFv-AirID 融合蛋白質を共発現させ、マウス生体内で標的蛋白質に近接する蛋白質を網羅的に同定する手法を開発する(図 1)。生体分子の機能などを理解するためには相互作用する分子を同定することが重要である。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 を利用した BioID 法はその一つであり、BirA の約 10 nm 径内に存在するタンパク質が網羅的にビオチン化される。愛媛大の澤崎らは BirA を改変し標識特異性が向上した AirID を開発した[eLife e54983,2020]。培養細胞を用いた BioID 法の報告は多いが、マウス生体内で内在性タンパク質に対して BioID 法を行った例はほとんど報告がない。申請者の研究室では T 細胞の初期分化制御機構の解明を専門的に研究し、Runx/Cbfb 転写因子[Cell 2002、Science 2008、Nat. Immunol. 2008]、SATB1 転写因子[Cell. Reports 2017]、Bcl11b 転写因子[Nat. Commun. 2017]が胸腺内での T 細胞分化過程において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。T 細胞初期分化において、TCR シグナル伝達は Lck などの

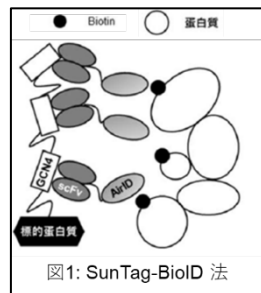


図1: SunTag-BioID 法

キナーゼによって制御されており、キラーT (CD8⁺) 及びヘルパーT (CD4⁺) 細胞分化には転写調節因子 Runx による遺伝子発現抑制が重要である。しかし、I型およびII型の異なる MHC に起因する TCR シグナルがどのように Runx による特定の標的遺伝子発現抑制とリンクするのかは未だに不明である。本研究課題では、BioID 法を用いマウス生体内で CD4、CD8、Lck、Runx 近傍に集積する分子を同定することで T 細胞初期分化制御機構の解明を目指す。

(2) CRISPR On-Site BioID 法の開発

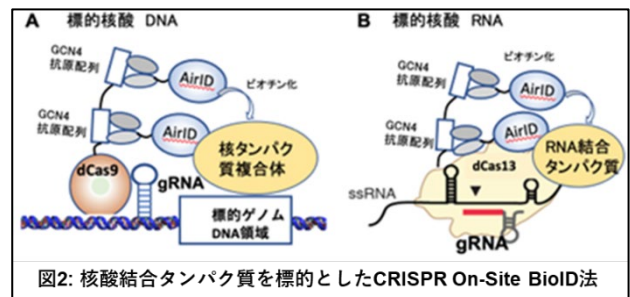


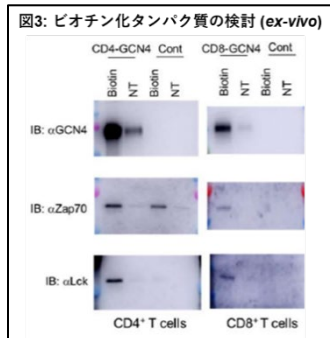
図2: 核酸結合タンパク質を標的としたCRISPR On-Site BioID法

SunTag 系の原理を single guide RNA (sgRNA) を介した Cas9 の DNA 配列への標的原理と併用すれば、gRNA/dCas9-GCN4/scFv-AirID 複合体を特定のゲノム DNA 配列へ標的し、標的ゲノム領域上の核タンパク質複合体の同定が可能と考えられる(CRISPR on-site BioID 法)(図 2A)。また、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-集積により RNA 結合タンパク質を同定する On-Site BioID 法の開発も行(図 2B)。既存の RNA 結合タンパク質同定法では強固な固定/架橋操作を必要とするが、そのために非特異的なタンパク質の検出が問題となっている。CRISPR RNA BioID 法は固定/架橋を必要としないためこの問題が回避される画期的な手法で

あると考えられる。

[1-2]研究の方法・経過

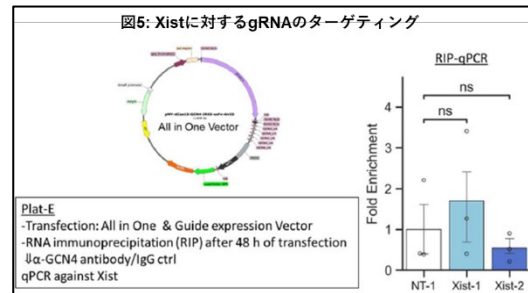
先ず樹立した $CD4^{GCN4x3}/scFv-AirID$ ダブル Tg ($CD4-GCN4$) 及び $CD8^{GCN4x3}/scFv-AirID$ ($CD8-GCN4$) ダブル Tg マウスで BioID 法が機能しているかを確認した。マウスから末梢 $CD4^+$ T 細胞及び $CD8^+$ T 細胞を調整し TCR 刺激下で培養後ビオチン化した蛋白質を Streptavidin ビーズで精製しウェスタンブロット法で目的蛋白質を確認した(図 3)。その結果、標的蛋白質である $CD4$ および $CD8$ でビオチン化が強く観察され、また TCR シグナル伝達に關与する Lck や $Zap70$ などの蛋白質のビオチン化が $CD4-GCN4$ で観察された。これらの結果は、樹立したマウスで BioID 法が機能していることを示唆していると考えられた。



次に *in vivo* のマウスの BioID 法を検討した。5日間ビオチン給水した $CD4-GCN4$ 及び $CD8-GCN4$ マウスから全胸腺細胞を調整し Tamavidin2-REV 法により取得したビオチン化蛋白質を質量分析に供した(図 4)。これらの結果から、本研究課題で作成した SunTag-BioID 法を導入したマウスの生体内で期待したようにシステムが機能していることが明らかになった。今後は胸腺での T 細胞の分化段階により分画した細胞を試料とし T 細胞初期分化制御機構の解明を目指した研究に取り組む予定である。

CRISPR On-Site BioID 法については、培養細胞(Plat-E)に dCas13, GCN4, scFv-AirID を発現させる All in One Vector と Xist に対する gRNA (Xist-1, Xist-2)を発現させる vectorを導入した。その後、Cas13-GCN4 および scFv-AirID のタンパク質発現および AirID のビオチン標識能を確認後、抗 GCN4 抗体を用いた RNA immunoprecipitation (RIP)-qPCR で gRNA のタ

ーゲティングを検討した。その結果、Xist-1、Xist-2 において non-targeting (NT-1)と比較して Xist RNA が有意に濃縮されていないことから、特異的にターゲティングが行われていないことが明らかになった(図 5)。



[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

該当なし

[3-2]学会発表

シンポジスト

奥山一生, マウス個体での BioID 解析, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024 年 11 月 29 日. ポスター発表

奥山一生, Interactome analysis of transcription factors controlling T cell development, 第 53 回日本免疫学会学術集会, 長崎, 2024 年 12 月.

原田淳司, The difference of Lck interactomes in $CD4^+CD8^-$ and $CD4^+CD8^+$ thymocytes, 第 53 回日本免疫学会学術集会, 長崎, 2024 年 12 月.

[3-3]成果資料等

奥山一生, 谷内一郎, [原理編②: 細胞、マウス個体へのビオチンリガーゼ導入法], 実験医学別冊 近接依存性標識プロトコール, 2024;ISBN 978-4-7581-2274-0:19-25.

永本紗也佳, 高野哲也, 奥山一生, [応用編①: Split-BioID 法とその派生技術の可能性], 実験医学別冊 近接依存性標識プロトコール, 2024;ISBN 978-4-7581-2274-0:128-133

[4] 今後の課題等

CRISPR on-site BioID 法の開発。