

CRISPR/Cas9 システムによるノックインマウスを使ったアダプター 蛋白質 3BP2 の機能解析

研究代表者： 千原 一泰 (医学系部門・准教授)

共同研究者： 定 清直 (医学系部門・教授)、竹内 健司 (医学系部門・学内講師)

概 要
アダプター蛋白質 3BP2 は、顎骨の破壊と顔面腫脹を特徴とする常染色体優性遺伝病チェルビズムの原因遺伝子と考えられている。これまで我々は、チロシンキナーゼ Syk が 3BP2 をリン酸化することに注目し、免疫細胞におけるその機能を明らかにしてきた。本研究では、Syk によりリン酸化されない非リン酸化型 3BP2 を発現するノックインマウスを CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて新たに作製し、生体内で 3BP2 がチロシンリン酸化を受ける生理的意義の解明を目指す。これまでに、ノックインだけではなく、ノックアウトマウスを生む可能性をもつ個体が得られている。また、脾臓の B 細胞において 3BP2 がチロシンリン酸化を受ける事を示唆するデータが得られた。現在繁殖させているマウスを使い、解析を進めていきたい。
関連キーワード
Syk、アダプター蛋白質 3BP2、免疫応答、シグナル伝達、ゲノム編集

研究の背景および目的

アダプター蛋白質 3BP2 は、顎骨の破壊と顔面の腫れを特徴とする常染色体優性遺伝病チェルビズムの原因遺伝子として同定されている。チェルビズム病モデルマウスにおいては、破骨細胞による骨吸収とマクロファージによる炎症性サイトカインの産生亢進が認められている。

一方、我々の研究室では抗原受容体を介して 3BP2 がチロシンリン酸化される点に注目し、その分子メカニズムと生理的意義について研究を進めている。これまでに B 細胞やマスト細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞において、3BP2 が抗原受容体の刺激に応じてチロシンキナーゼ Syk によりリン酸化され、様々な細胞応答の調節に関わる事を明らかにしてきた。それゆえ、Syk が 3BP2 をチロシンリン酸化することは免疫応答に重要な役割を持つと考えられるが、個体レベルにおける生理的意義は明らかとなっていない。

近年、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を利用した遺伝子改変が注目を集めており、当研究室でも実績を挙げている。最近では、ゲノム DNA に相補的な一本鎖オリゴ DNA (ssODN) をドナー DNA として使い、目的遺伝子に任意の変異を高い効率で導入することが可能になっている。

そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて Syk によるリン酸化を受けない非リン酸化型 3BP2 ノックインマウスの作製を試みる。得られたノックインマウスと野生型マウスを比較することにより、Syk が 3BP2 をチロシンリン酸化する生理的意義について個体レベルで解明を目指す。具体的には B 細胞の分化や増殖、抗体産生に及ぼす影響、貪食細胞による病原微生物に対する反応や、近年注目を集めている自然リンパ球を介した 2 型免疫応答における役割を解析する。

研究の内容および成果

<3BP2 遺伝子のゲノム編集>

我々の研究グループは、Syk が 3BP2 のチロシン残基 (Tyr) 174、183、446 をリン酸化することを明らかにしている。特に Tyr183 のリン酸化は、シグナル伝達分子との複合体形成に必要であり、抗原受容体による転写因子 NFAT の活性化に重要な役割を果たすと考えられる (Shukla *et al.* J. Biol. Chem. 2009)。そこで本研究では、Syk による 3BP2 のリン酸化が持つ意義を個体レベルで明らかにすることを目的として、Tyr183 をフェニルアラニン

に置換した非リン酸化型 3BP2 (Y183F) を発現するノックインマウスの作製を試みた。3BP2 の Tyr183 は 3BP2 遺伝子のエクソン 7 にコードされている。この領域に対する CRISPR RNA とトランス活性化型 RNA および Cas9 蛋白質の複合体を作製し、ノックインに必要な ssODN と共にマウス受精卵にマイクロインジェクションした。ssODN は目的とする変異だけではなく、ゲノム PCR 産物を制限酵素処理してノックイン個体を選別できるような変異を持つように合成した。

<ゲノム編集マウスの遺伝子型解析>

ゲノム編集を試みた受精卵から、18匹の成体マウスが得られた。今回の実験では18匹中7匹に目的とするノックイン変異を確認できた。現在、ノックインマウスの系統を樹立するために、戻し交配を進めている(図1)。一方、少なくとも9匹のマウスでindel変異が認められ、その中にエクソンとイントロンの境界を横断するように、70、111、あるいは251塩基対が欠損した個体が見つかった。このようなアレルから転写されるRNAは正常にスプライシングされず、RNAの品質管理機構により異常なmRNAとして破壊される可能性がある。こうしたアレルをホモで持つマウスは3BP2ノックアウトマウスとして利用できる可能性があり、現在確認のための交配を進めている。

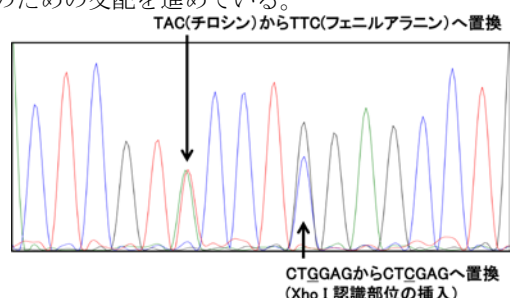


図1: ノックインマウスのゲノム配列 (Y183F/WT)

<脾細胞における3BP2のチロシンリン酸化>

マウスにおける3BP2の発現は、マスト細胞、マクロファージや破骨細胞、NK細胞、B細胞、T細胞で確認されている。しかし、どのような細胞で3BP2がよくチロシンリン酸化されるのかは分かっていない。我々がこれまでに行った解析では、B細胞に由来する細胞株で3BP2の強いチロシンリン酸化が認められており、マウスにおいてもB細胞で3BP2がSykによりチロシンリン酸化される可能性が高いと考えた。そこで、抗IgM抗体を用いて脾細胞

のB細胞受容体(BCR)を刺激し、3BP2のチロシンリン酸化をプルダウンアッセイにより解析した。その結果、BCRの架橋により3BP2が強くチロシンリン酸化されることが分かった(図2)。今後、3BP2のリン酸化がB細胞の分化や増殖、抗体産生に及ぼす影響について、3BP2遺伝子改変マウスを使って明らかにしていく予定である。

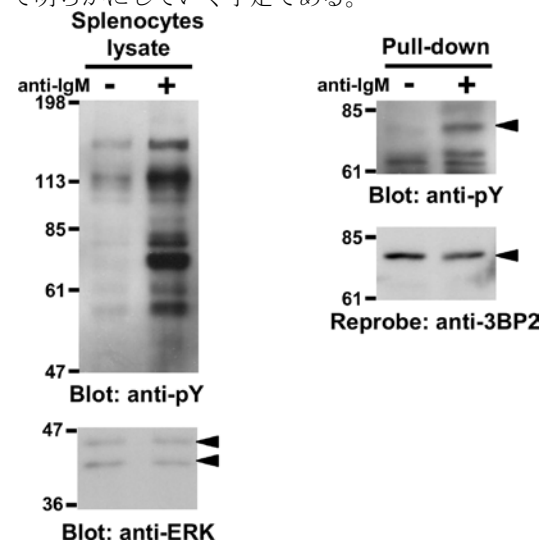


図2: 脾細胞における3BP2のチロシンリン酸化 (ウェスタンブロッティングによる解析)

<謝辞>

本研究では、マウス受精卵のゲノム編集に必要な試薬を脳形態機能学(解剖学2)研究室に分与して頂きました。また、プロトコールは同研究室の黒田一樹先生に提供して頂きました。受精卵の操作とマウスへの移植は、ライフサイエンス支援センター生物資源部門に行って頂きました。ここに感謝の意を表します。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Syk-dependent tyrosine phosphorylation of 3BP2 is required for optimal FcRγ-mediated phagocytosis and chemokine expression in U937 cells.

Chihara, K., Kato, Y., Yoshiki, H., Takeuchi, K., Fujieda, S. and Sada, K.

Sci Rep., 7(1):11480, 2017.

2. Association of C-type lectin Mincle with FcεRIβ subunits leads to functional activation of RBL-2H3 cells through Syk.

Honjoh, C., Chihara, K., Yoshiki, H., Yamauchi, S., Takeuchi, K., Kato, Y., Hida, Y., Ishizuka, T. and Sada K.

Sci Rep., 7:46064, 2017.

3. 「C型レクチンによるマスト細胞の活性化メカ

ニズム」

千原 一泰、本定 千知、木村 幸弘、竹内 健司、藤枝 重治、石塚 全、定 清直.

臨床免疫・アレルギー科, 69(3):271-276, 2018.

4. 「アダプター蛋白質 3BP2 による貪食細胞の機能調節メカニズム」千原 一泰、加藤 雄士、竹内 健司、藤枝 重治、定 清直.

第35回日本生化学会北陸支部会

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 日本学術振興会 H30年度(2018年度)基盤研究C

「チロシンキナーゼ Syk が自然リンパ球の機能を調節する新しいメカニズムの解明」・代表・申請中