

研究終了報告書

「光機能性小分子を基盤とした細胞内在性シグナル分子の自在な光操作」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：吉井 達之

1. 研究のねらい

細胞が外部からの情報を受けたとき、細胞内のタンパク質ネットワークが情報を伝達し、細胞の運命が決まる。このシグナル伝達経路を詳細に理解することは、細胞の機能解明や医学・創薬において重要な課題である。これまで、さまざまな生化学的な手法によってシグナル伝達に登場するタンパク質が明らかになっているが、それらがいつ・どこで働くかといった時空間的な情報は不十分である。これらを解明するためには、内在性のシグナル分子を高い時間分解能で操作し、それに対する細胞の応答を観察するといった研究が必要である。

シグナル伝達の際、多くのタンパク質が存在する場所(局在)を変化させる。この局在の変化が起点となり、細胞内シグナルが活性化される。したがって、細胞内のタンパク質の局在を光によって自由に変化させることができれば、シグナル伝達を外部から高い時空間分解能で、思いのままに制御できると考えられる。近年では、光受容タンパク質を用いたオプトジェネティクスにより細胞内のタンパク質の局在を光によって制御することが可能であるが、遺伝子操作によって、比較的大きな光受容タンパク質を2つ導入することが必要である。そのため、蛍光プローブの併用や、複数のシグナル分子を操作することが困難であるといった課題が残されている。本研究では、従来の光受容タンパク質ではなく、有機小分子を光スイッチとして利用した化学的アプローチにより、革新的な細胞内在性シグナル分子光操作技術を創出する。これにより、従来のオプトジェネティクスのアプローチでは困難な「細胞内在性シグナル分子の自在な光操作」を実現する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、細胞内シグナル伝達を光によって操作するための技術開発において、タンパク質の細胞内局在に着目し、有機化合物を用いたタンパク質局在の光制御システムの構築を目指した。そのために、標的タンパク質に対して融合するためのタグタンパク質の開発を行った(研究テーマ A)。また、細胞内の特定のオルガネラに局在し、光によって構造変化を起こす分子“光機能性小分子 localizer”の開発を行った(研究テーマ B)。これを CRISPR-Cas9 システムと組み合わせて利用することで、細胞内在性のシグナル伝達の時空間的な操作が可能となった(研究テーマ C)。

(2) 詳細

研究テーマ A 「タグタンパク質の開発」

“光機能性小分子 localizer”開発の前段階として、標的タンパク質に特異的に結合する小分子リガンドと、特定の細胞内部位に結合・局在する分子(局在化モチーフ)を、リンカーを介して連結した化合物(局在性リガンド)を利用した局在制御システム(図1)の最適化を行った。

細胞膜はさまざまな情報伝達の起点となる場所であり、標的のタンパク質を細胞膜

に局在化させることができれば、さまざまなシグナル伝達経路を活性化するための技術となる。これまでの報告で、タンパク質タグとリガンドのペアとして、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)とmgcTMP(図1B)を用いた場合、細胞質から細胞膜へと局在化させることができる。一方で、ゴルジ体など目的としないオルガネラへと局在するという問題点があった。そのため、まずタグタンパク質の改変による局在移行性の向上を行った。細胞膜特異性を向上させるために、N末端にリジンの連続配列を導入した(K6-DHFR)。これにより、細胞膜に特異的な局在化が可能となった(論文1)。一方で、このタグは標的タンパク質のN末端にしか導入することができず、汎用性に問題があった。そのため、DHFRのループ領域にリジン6連続配列を導入した新しいタグタンパク質DHFR(69K6)を作製した。DHFR(69K6)は野生型のDHFRと同等の結合能を持ちながら、局在性リガンドの添加によって細胞膜に特異的に局在化することが明らかとなった。このタグは、タンパク質のN末端、およびC末端のどちらに導入してもうまく働くことが明らかとなった。同様の原理をSNAP-tagタンパク質に対しても拡張した場合も、局在移行効率の向上に成功した(論文2)。

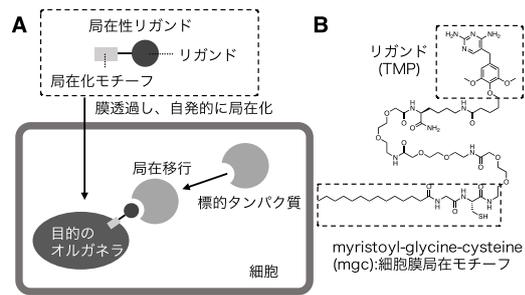


図1. (A) 化合物を利用した局在制御 (B) mgcTMPの構造

研究テーマB 「光機能性小分子 localizer の合成」

局在性リガンドに光応答部位を導入することによって、光機能性小分子 localizer の開発を行った。既存の局在性リガンド(mgcTMP)は細胞内で分解するという問題があったため、まずは安定な局在性リガンドの開発を行った。私は、細胞内での分解がプロテアーゼによるのではないかと推測し、mgcTMPにあるグリシン、システインという2つの天然アミノ酸をなくし、システインをD体にしたmyristic acid-D-cysteine(m^Dc)モチーフを考案した。実際に、これとTMPをつないだ化合物m^DcTMPは細胞膜への局在を示し、長時間のインキュベートをして分解は見られなかった(論文3)。

上記のm^DcTMPのタンパク質結合部位に光分解性の保護基を導入したm^DcTMP^{NVOC}を合成した(図2)。これを細胞にかけると、細胞膜にTMP^{NVOC}が提示される。この状態ではDHFRは結合できないが、照射によりNVOC基

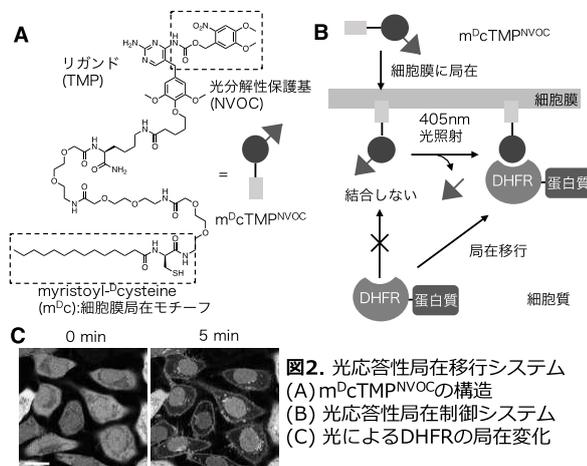


図2. 光応答性局在移行システム (A) m^DcTMP^{NVOC}の構造 (B) 光応答性局在制御システム (C) 光によるDHFRの局在変化

が脱離し、細胞膜へと局在化すること期待した(図 2B)。実際に、合成した $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{NVOC}}$ を K6-DHFR 発現細胞に作用させ、405 nm の光を照射すると、K6-DHFR が細胞膜へと移動することが明らかとなった(図 2B)。さらに、NVOC よりも長波長の光で切断される DEAC 基を用いることで、より長波長の光で切断される $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{DEAC}}$ の開発にも成功した。

一方で、 $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{NVOC}}$ や $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{DEAC}}$ では、光照射後、脱離基が戻ることはなく、一段階の光活性化しかできなかった。つまり、可逆的な光操作は困難であった。そこで、新たに可逆的な光操作のための localizer 分子の作製を行った。

具体的には、アゾベンゼン骨格を局在化モチーフとして有する azo-TMP を作製した(図 3A, B)。この azoTMP を DHFR(69K6)発現細胞に作用させると、DHFR(69K6)が細胞膜へと局在化する様子が観察された(図 3C)。ここに、360 nm の光を照射すると DHFR(69K6)がサイトゾルへと移行した。再度、488 nm の光を照射すると、細胞膜へと局在した。このことから、azoTMP は細胞内タンパク質の局在を可逆的に操作可能な分子であることが明らかとなった。さらに、アゾベンゼン部位を改変することで、より長波長の光(514 nm と 405 nm) で操作可能な分子も見出された。

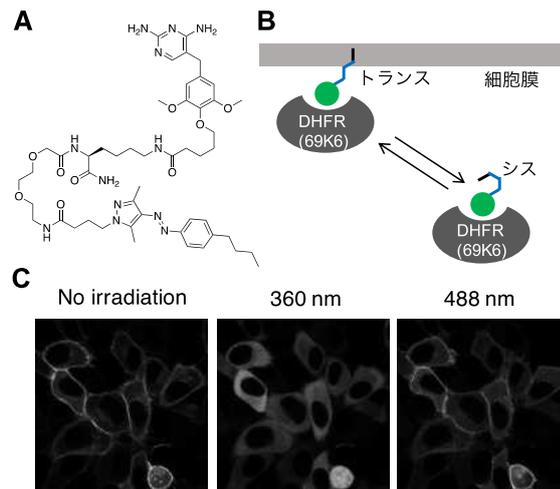


図3. 可逆的な光応答性局在移行システム (A) azoTMPの構造 (B) システムの概念図 (C) 光によるDHFR(69K6)の局在変化

研究テーマ C 「細胞内在性のシグナル伝達の時空間的な操作」

研究テーマ A, B によって作製した技術によって細胞内タンパク質の局在とシグナル伝達の操作を試みた。細胞運動に関わるタンパク質 Tiam1 に K6-DHFR を融合したキメラタンパク質を NIH3T3 細胞内に発現させ、 $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{NVOC}}$ を作用させ、光照射を行うと、細胞運動が活性化された。融合させるタンパク質を変更することによって、Ras-ERK 経路、PI3K-Akt 経路などの経路を活性化することが可能であった。

上記の検討は、いずれも細胞内にタンパク質を過剰発現させて行ったものである。実際の細胞内在性タンパク質はこれよりも少量しか発現していない。実際の細胞内でのシグナル伝達を解析するためには、ゲノムにコードされたタンパク質の局在を操作する必要がある。そのため、CRISPR-Cas9 を用いて DHFR(69K6) をノックインし、内在性タンパク質の操作を試みた。標的として cRaf を選択し、DHFR(69K6) をノックインした。Genomic PCR およびウェスタンブロットティングから Homozygous なノックインが確認された。この細胞に $m^{Dc} \text{TMP}^{\text{NVOC}}$ を作用させ、光照射を行うと内在性 Raf の局在移行と下流の ERK の活性化が見られた。このことから、本技術は内在性タンパク質の操作にも応用可能であることが示唆された。

3. 今後の展開

本研究では、細胞膜に局在移行させるための光操作ツールを開発した。一方で、細胞内には

さまざまなオルガネラが存在し、それぞれ細胞の機能に重要である。そのため、さまざまなオルガネラを標的としたツール開発を進めたい。また、開発した分子を用いて未知の生命現象の解明を行いたい。特に、本技術は細胞内に発現させるタンパク質の数が少なく済む。そのため、これを利用し、さまざまなバイオセンサーとの併用や複数のシグナル分子を操作する事が可能になると期待される。また、本操作技術を用い、iPS 細胞などで応用することで、新しい分化誘導技術の開発に取り組みたい。また、培養細胞だけでなく、*in vivo* で用いることのできるシステムの開発を進め、より実用に耐える光操作システムの開発を進めたい。

4. 自己評価

研究期間内に、細胞内タンパク質を細胞膜へと局在化させるための光応答性分子ツールを複数種類開発することに成功した。培養細胞内で機能する分子としては、研究計画通りに目的を達成することができたと考えられる。一方で、動物個体での応用に関しては、いくつか挑戦したもののうまく行かなかったのが現状である。研究の進め方としては、限られた研究体制の中では効率よく進めることができたと思っている。一方で、早くから研究補助者を雇用するなど改善すべき点も見つかった。本技術は、まだ実験室レベルでの研究であり、社会・経済への波及効果を現段階で議論するのは難しいかもしれないが、今後さまざまな研究者との共同研究を通じて動物個体での応用や、人工臓器、再生医療分野での応用などにつながると考えている。領域会議・領域内での共同研究において、サンプル提供や研究者訪問などを行い、ネットワーク構築を進めることができた。これは私自身のキャリア形成において非常に有益であった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. Akinobu Nakamura, Choji Oki, Kenya Kato, Satoko Fujinuma, Gembu Maryu, Keiko Kuwata, Tatsuyuki Yoshii, Michiyuki Matsuda, Kazuhiro Aoki, Shinya Tsukiji “Engineering orthogonal, plasma membrane-specific SLIPT systems for multiplexed chemical control of signaling pathways in living single cells” *ACS Chemical Biology*, 15, 1004–1015 (2020)

化合物を利用した局在移行システムの細胞膜特異性を向上させるために、タンパク質タグの改変を行った。タンパク質の N 末端に塩基性アミノ酸を導入することによって、細胞膜特異性を向上することに成功した。これにより、複数のシグナル分子を小分子化合物の添加によって操作することが可能になった。

2. Tatsuyuki Yoshii, Kai Tahara, Sachio Suzuki, Yuka Hatano, Keiko Kuwata, Shinya Tsukiji “An improved intracellular synthetic lipidation-induced plasma membrane anchoring system for SNAP-tag fusion proteins” *Biochemistry*, 59, 3044–3050 (2020)

化合物を利用した局在移行システムの局在移行能を向上させるために、タンパク質タグと化合物の改変を行った。タンパク質の C 末端を削ることにより局在移行の効率が上昇した。これにより、Tiam1 や cRaf など、さまざまなシグナル分子の局在を制御することに成功した。

3. Akinobu Nakamura, Choji Oki, Shunsuke Sawada, Tatsuyuki Yoshii, Keiko Kuwata, Andrew K. Rudd, Neal K. Devaraj, Kentaro Noma, Shinya Tsukiji “Designer palmitoylation motif-based

self-localizing ligand for sustained control of protein localization in living cells and *Caenorhabditis elegans*” *ACS Chemical Biology*, 15, 837-843 (2020)

化合物を利用した局在移行システムにおいて、化合物が細胞内で分解することが問題となっていた。これを解決するために非天然アミノ酸を導入した。これにより、細胞内タンパク質の局在を持続的に制御することが可能となった。また、線虫内でのタンパク質局在を操作することが可能となった。

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件(すべて特許公開前)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. “光応答性局在分子システムによる細胞操作”

○吉井 達之、築地 真也

生物工学 Web シンポジウム 2020 (2020./9/2、オンライン)

2. “光で細胞内タンパク質を操作するためのケミカルツールの開発”

○吉井 達之

新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」第2回関西地区シンポジウム (2019/12/17、京都大学桂キャンパス)

3. “細胞内タンパク質を操る分子ツール”

○吉井 達之

名市大若手イブニングミキサー (2019/5/25、名古屋市立大学名古屋市立大学医学部キャンパス)

解説記事

光応答性局在分子システムによる細胞操作

吉井 達之、築地 真也

生物工学, 98(12), 659-663 (2020)