

研究終了報告書

「超音波による細胞間シグナル伝達の熱遺伝学的制御」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：遠藤 瑞己

1. 研究のねらい

生体内には、体外環境の変化に応じて体内環境の恒常性を維持する仕組みが備わっており、細胞間シグナル伝達を担うホルモン、サイトカインをはじめとしたリガンドの分泌、および受容体タンパク質活性の調節を介して互いにバランスを保ちながら、体内の様々な細胞・臓器において環境変化に応じた適切な応答を誘導している。これまでの研究により、リガンドの分泌から受容体タンパク質の活性化、それに伴う遺伝子発現などの細胞応答に至る機構が詳細に判明しつつあり、恒常性維持機構における細胞間シグナル伝達ダイナミクスの重要性が注目を集めている。しかしながらこうしたダイナミクスは、光の到達が困難な組織深部では人為的な操作を可能にする分析手法が不足しているため、解析が困難である。したがって、生きた個体において生体深部での細胞間シグナル伝達ダイナミクスを直接操作し、解析するツールが求められている。

光と比較して、超音波は組織透過性が非常に高く、人体においても超音波画像診断や組織深部の治療など医療現場で幅広く活用されている。特に治療に使われる焦点式の高出力超音波は、およそ5 cmまでの深さでmmメートル単位の範囲を40℃から60℃まで数秒—1分以内に加熱可能である。したがって、超音波を用いた加熱は生体深部での細胞間シグナル伝達を制御するのに理想的な刺激手段である。一方で、これまでに加熱により細胞間シグナル伝達、およびその基本反応であるタンパク質間相互作用を直接制御するシステムは開発されていない。そこで、本研究ではタンパク質間相互作用を加熱により制御する熱遺伝学的モジュールを開発し、リガンド-受容体タンパク質間の反応を介した細胞間・臓器間シグナル伝達を生体透過性の高い超音波による局所加熱で制御する熱遺伝学システムを構築することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、生体透過性の高い焦点式超音波による局所加熱現象を利用し、組織深部で生体内現象を人為的に制御するシステムを構築することを目的としていた。そのため、まず生体内反応の素過程であるタンパク質間相互作用を加熱により制御する熱遺伝学的モジュールの開発を行った。具体的には、熱により単量体化する α ヘリックスペプチドのペアを活用し、変異導入等により37℃から40℃への加熱により加熱によってホモ二量体またはヘテロ二量体が単量体化する熱遺伝学的解離モジュールを開発した。これらの解離モジュールは、37℃から39℃にかけて単量体化が進行すること、また、単量体化は可逆的な反応であることが確認された。ヘテロ二量体型解離モジュールについては、培養細胞内でモジュールの片方を細胞膜に繫留し、もう片方の局在を蛍光顕微鏡により確認したところ、加熱によって細胞膜からサイトゾルへの移行が確認され、熱遺伝学的解離モジュールを用いることで細胞内局在を制御できることが明らかとなった。次に、タンパク質間相互作用を熱により誘導する熱遺伝学的結合モジュールを開発した。本モジュールは、タンパク質間相互作用を熱により誘導することので

きる世界初のモジュールである。

次に熱遺伝学モジュールを用いることで、細胞間シグナル伝達の制御に応用可能なシステムを構築した。具体的には、まずホモ二量体型の熱遺伝学的解離モジュールを用いることで、タンパク質分泌を熱により制御するシステムを開発した。本システムは、40℃10 分間の加熱でタンパク質分泌を誘導可能である。また、受容体タンパク質の発現を制御可能な、ゲノム操作を熱により誘導するシステムも構築した。本システムは ACT-X 2 期生の森川久未先生（産総研）との共同研究であり、現在特許出願準備を進めている。さらに、開発した熱遺伝学的モジュール・システムについて、焦点式超音波の照射による局所加熱現象を用いてこれらのモジュール・システムが駆動可能であることを検証した。また、加熱条件について、実際のシグナル経路への温度変化の影響を系統的に解析し、40℃10 分の加熱ではインスリンシグナル経路への影響が無いことが確認された。現在、マウスを用いた実験を試行中である。

(2) 詳細

1. タンパク質間相互作用を熱で制御する熱遺伝学的解離・結合モジュールの開発

タンパク質間相互作用を熱によって制御するモジュールの開発には、加熱により coiled-coil 構造を解消することが知られている熱ショック転写因子由来の α ヘリックスペプチドのペア TlpA を利用した。架橋剤を用いてモジュール候補分子の熱応答性を確認したところ、37℃から 40℃への加熱時に、既報の分子よりも効率よく解離するホモ二量体型、ヘテロ二量体型の熱遺伝学的解離モジュールを得ることができた。開発した熱遺伝学的解離モジュールの熱応答性を評価したところ、37℃から 39℃の温度範囲で単量体化が進行するほか、加熱終了後は 1 分以内に二量体化し、加熱による単量体化が可逆反応であることが確認された。また、ヘテロ二量体型分子を活用することでタンパク質の細胞内局在を制御可能であることが示された。さらに、ヘテロ二量体の形成を加熱によって誘導する熱遺伝学的結合モジュールの開発に成功した。本分子は、加熱によりタンパク質間相互作用を誘導する初の人工モジュールである。

2. 超音波による加熱現象を活用した、生体内での細胞間・臓器間シグナル伝達の熱遺伝学的制御手法の確立

細胞から分泌されるタンパク質は細胞間シグナル伝達を媒介することから、細胞間・臓器間シグナル伝達を人為的に制御するには、タンパク質分泌を熱により制御することが有効であると考えられる。そこで本研究ではまず、分泌されるタンパク質が ER 内で合成されてから細胞外へ輸送されることに着目し、開発したホモ二量体型熱遺伝学的解離モジュールを用いてタンパク質分泌を加熱により制御する分子を設計した。設計原理にはタンパク質が凝集体を形成すると ER 内に留まることを利用した。共焦点顕微鏡で確認したところ、加熱前は ER 内に局在することが明らかとなった。次に、制御対象のタンパク質として発光タンパク質 Nluc を選択し、40℃での加熱後の培養培地中への分泌を発光測定により評価した。結果、ホモ二量体型熱遺伝学的モジュールを用いたシステムにおいて、40℃で 10 分間加熱した場合にタンパク質の分泌が誘導できることが明らかとなった。現在、超音波照射によるマウス体内での分泌制御を試行中である。

また、リガンド-受容体タンパク質を介した細胞の応答能を制御するには、標的細胞の受容体タンパク質の発現プロファイルを人為的に制御する戦略が有効である。そこで、ACT-X2期生

の森川久未先生（産業技術総合研究所）との共同研究として、加熱によりゲノム操作を人為的に誘導するシステムを構築した。本システムは、超音波などの加熱によりゲノム操作を誘導する初の人工モジュールであり、現在東京大学と産業技術総合研究所の共同特許出願の手続きを進めている。

開発したモジュールが超音波照射による局所加熱現象で作動することを確認するため、ゲル上に固定したチューブ内にホモ二量体型・ヘテロ二量体型熱遺伝学的解離モジュールの溶液を添加し、超音波を照射した。BS3 を用いて架橋し Western blotting で評価したところ、超音波照射に伴う加熱により、ホモ二量体型・ヘテロ二量体型熱遺伝学的解離モジュールの単量体化を誘導可能であることが明らかとなった。また、超音波照射によるゲノム操作システムの駆動も実証した。

生体内での加熱刺激においては、正常細胞のシグナル系になるべく影響を与えないことが望ましい。そこで、各種培養細胞におけるインスリンシグナル経路について、タンパク質のリン酸化レベルを指標に加熱による影響を評価した。結果、長時間 40℃を超える温度で加熱する場合にはシグナルへの影響が顕著であった一方、短時間で 40℃以下の加熱であればリン酸化レベルは変動しないことが明らかとなった。冷却によってもリン酸化レベルが変動したこと、およびリン酸化レベルの上昇が確認された Akt については、本来のシグナル経路においてリン酸化に必要な細胞膜移行が確認されなかったことから、温度変化によりリン酸化レベルの変動は、脱リン酸化を担うホスファターゼの活性が変化したことによることが示唆された。以上の結果から、短時間で 40℃以下の加熱刺激であれば、細胞内シグナルへの影響は最小限に抑えられる可能性が示された。

3. 今後の展開

本研究ではまず、タンパク質間相互作用を熱により解消、誘導する熱遺伝学的解離・結合モジュールを開発した。さらに、開発したモジュールを用いて、タンパク質分泌の誘導システム、およびゲノム操作誘導システムを構築した。今後はこれらのシステムのマウスでの駆動を検証する予定である。本研究で開発した結合モジュールは加熱によってタンパク質間相互作用を人為的に誘導することが可能な世界初の人工モジュールであり、汎用性が高い。後者については、今後 1 年半以内に特許取得を目指す予定である。

本研究で開発した熱によりゲノム操作を誘導するシステムは、光の到達が困難な組織深部でも超音波照射により任意のタイミングで標的組織中の細胞群のゲノム操作を誘導し、目的タンパク質の発現を正確に制御することが可能になる。本研究は産業技術総合研究所の森川先生とも共同研究の方向性について打ち合わせを重ねており、同研究所の HIFU 技術研究グループと共同して超音波照射技術の改良と熱遺伝学システムの拡充を両輪として進めることで新たな操作手法の創出も視野に研究を展開する予定である。また、本技術を応用することで、疾患領域を超音波などの非侵襲的可視化・刺激手段により観ながら治療するといった全く新しい医療技術の実現につながる。このように超音波による遺伝子操作技術は、基礎研究のみならず、医療応用においても活用できると考えられる。産総研グループは疾患治療への応用を視野に入れた技術開発を得意としており、密接な連携により基礎技術の確立・特許取得を重ね、実社会への還元を着実に目指す予定である。

4. 自己評価

本研究申請時の研究計画では、「1. タンパク質間相互作用を熱で制御する熱遺伝学的解離・結合モジュールの開発」を行い、「2. 超音波による加熱現象を活用した、生体内での細胞間・臓器間シグナル伝達の熱遺伝学的制御手法の確立」を目指す予定であった。1については、実際に 37℃から 40℃への加熱によってタンパク質間相互作用を解消・誘導するモジュールを開発できたので、達成されたと考えられる。2 については、当初、リガンドと受容体タンパク質それぞれの熱遺伝学的制御システムの開発を目標としていた。この点については、リガンド分泌を人為的に加熱により制御するシステム、および受容体タンパク質の発現を制御可能なゲノム操作を加熱により制御するシステムを構築でき、達成されたと考えられる。特にゲノム操作については研究計画時点でのアプローチとは異なるが、ACT-X の領域会議を通じて ACT-X 2 期生の森川久未先生との共同研究体制を確立した結果、当初の想定になかったゲノム操作を加熱により誘導するシステムを実現した。さらにマウスへの応用についても森川先生や、超音波照射技術の専門家である産総研の高山先生との共同研究体制の中で実施できる環境を構築することができた。超音波照射による駆動検証については培養細胞レベルでしか実現していないが、今後はこうした共同研究体制の中で、マウスでの超音波による熱遺伝学的システムの駆動を実現したいと考えている。

このように、当初の研究計画はマウス応用以外については概ね実施でき、マウス応用についても今後産総研との共同研究体制の中で実施可能な環境を構築することができた。さらに、当初の予定になかった加熱によるゲノム操作誘導システムを領域内の研究者とのネットワークを通じて実現し、共同特許出願準備を開始した。以上から、想定外の新たな研究展開を加味し、当初の研究計画とは異なるものの、十分な進捗が得られたと考えている。

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: 1件

1. Qi Dong, Mizuki Endo, Genki Kawamura, Takeaki Ozawa, “Systematic Interrogation of the Temperature Perturbation in the Insulin Signaling Pathway for Optogenetic Stimulation” Cells 11(19) 3136–3136 (2022).

加熱時の細胞への影響について、インスリンシグナルを代表的なモデルとして、各種細胞における各タンパク質のリン酸化レベルを指標に評価した。結果、長時間 40℃を超える温度で加熱する場合にはシグナルへの影響が顕著であった一方、短時間で 40℃以下の加熱であればリン酸化レベルは変動しないことが明らかとなった。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(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)