

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22241

研究課題名（和文）特定の細胞内キナーゼ活性を定量的に制御する光技術の開発

研究課題名（英文）Development of optical technology for quantitative regulation of intracellular kinases

研究代表者

水上 進（Mizukami, Shin）

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30420433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生きた細胞内の特定の酵素活性を光刺激によって特定の場所・時間において変調させ、その細胞応答を観察できれば、標的酵素の未知の生理機能の解明に繋がると期待される。本研究では、独自に開発した光可逆的蛋白質ラベル化技術を利用して、特定の細胞内酵素活性を光制御する技術の開発に取り組んだ。最初の標的分子として、上皮成長因子受容体（EGFR）を選択したが、設計した光応答性分子の合成が難航したため、標的キナーゼをPINK-1に変更した。光応答性プローブの開発により、PINK-1の細胞内局在の光制御システムの開発に成功し、PINK-1の主要な生理機能の一つであるミトファジーを自在に光制御することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の酵素活性を光制御する技術は、基礎生物学から医学・薬学に至るまで幅広い領域の研究で活用できる重要な基盤技術となり得る。本研究で得られた成果は、開発した手法が単に特定の酵素の機能を制御する手法を提供するだけでなく、他の酵素・タンパク質にも応用可能な普遍的な技術であることを示している。今後、標的蛋白質（PINK-1）の未知の機能の解明や、より詳細な細胞内シグナル伝達機構の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Optical modulation of specific enzyme activity in a living cell can lead to elucidating unknown physiological functions of the target enzyme. We tried to develop techniques for photo-regulation of specific intracellular enzyme activities using our developed photoreversible protein labeling technology. First, epidermal growth factor receptor (EGFR) was selected as the target molecule, due to the difficulty in synthesizing the designed photoresponsive molecule, the target was changed to a mitophagy-related kinase, PINK-1. We succeeded in developing a photoregulation system of the subcellular targeting of PINK-1 and in optically inducing mitophagy through the phosphorylation by PINK-1.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質ラベル化技術 リン酸化酵素 光薬理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内での酵素の働きを調べる手法として、阻害剤等の薬物を用いて活性を阻害する薬理学的手法が汎用されている。しかしながら、薬物が標的酵素に対して選択性に乏しい場合は、生体応答がどの酵素によるものなのかは分からない。別の手法としては、標的酵素を遺伝子レベルで操作し、その発現レベルや活性を変調させる遺伝学的手法がある。この手法は遺伝子発現にある程度の時間を必要とするために、その間に他の蛋白質による活性の補償作用等が誘導される可能性がある。それゆえ、特定の酵素活性を細胞内で瞬時(秒単位)に変調できれば、生体応答の高速観測によって標的酵素の未知の機能を解明できる可能性が高い。そのために有用な手段の一つが光を利用する方法であり、光を用いて化合物の生理活性を制御可能な「ケージド化合物」などは古くから用いられている。より最近では、光応答性蛋白質を用いた「オプトジェネティクス」が生きた動物個体内の神経活動を光で可逆的に制御する手法として非常に大きな注目を集めている。すなわち、光によって特定の酵素活性を制御することができれば、従来の薬理学的手法や遺伝学的手法に対して、標的分子への選択性、時間分解能、空間分解能などの優位性を併せ持つ技術になることが期待される。

研究代表者はこれまでに特定の蛋白質を生きた細胞内において機能性分子でラベルする「蛋白質ラベル化技術」を開発してきた(S. Mizukami et al., *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 247など)が、最近では光可逆的な蛋白質ラベル化技術の開発に取り組んでいる。この技術において、タグ蛋白質としては大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素(eDHFR)を選択し、リガンドにはeDHFRに結合するメトトレキサート(MTX)をフォトクロミズムを示すように改変し、光照射によって可逆的に着脱可能な低分子リガンドazoMTXを開発した(図1, T. Mashita et al., *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382)。azoMTXは熱平衡状態のE体ではeDHFRから解離し、光照射によってZ体に異性化するとeDHFRへの親和性が増大する。この光制御過程は可逆的かつ繰り返し可能である。そこで、本技術を用いた細胞内酵素活性の光制御技術の開発を立案した。

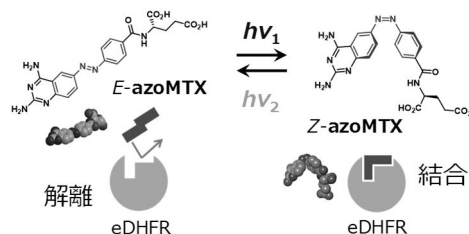


図 1. azoMTX に基づく光可逆的蛋白質ラベル化システム

2. 研究の目的

本研究では、独自の光可逆的蛋白質ラベル化技術をもとに「特定の酵素活性を光制御する技術」を開発する。具体的な標的酵素としては、細胞内キナーゼを選んだ。ヒトゲノム中には約 500 種類のキナーゼがあるとされ、特定の細胞内キナーゼの活性調節技術は細胞内の複雑な分子ネットワークを解明するための強力なツールになると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では標的キナーゼとして、(1) 上皮成長因子受容体(EGFR)、(2) マイトファジーに関わる PTEN 誘導キナーゼ 1(PINK1)を選択し、その光制御を試みた。PINK1/Parkin 経路において、PINK1 は損傷ミトコンドリアの外膜上に蓄積することで、E3 ユビキチンリガーゼ Parkin をミトコンドリア上に誘導・活性化し、マイトファジーを誘導する。そこで、PINK1 をミトコンドリア上に光で誘導することで、マイトファジーを人工的に誘導するシステムを構築した。

4. 研究成果

(1) EGFR の阻害剤であるゲフィチニブ、azoMTX をリンカーで連結させた光応答性蛋白質二量化合物を合成した。現在、細胞を用いたアッセイシステムの構築中である。

(2) HaloTag リガンドとフォトクロミック eDHFR リガンド(azoMTX 誘導体)を連結させた光可逆的蛋白質二量化合物 pcDH を設計し、その合成を行った。pcDH は逆相 HPLC によって生成し、その純度および構造は NMR および質量分析によって確認した。続いて、用いる PINK1 の構築を行った。PINK1 の細胞質ドメイン(PINK1 1-110, cytPINK1 と呼ぶ)に蛍光蛋白質 mOrange および eDHFR を連結させた融合蛋白質(cytPINK1-mOrange2-eDHFR)のプラスミドを構築した。また、HaloTag をミトコンドリア外膜上に発現させるために OMP25 と融合させた Halo-OMP25 のプラスミドを構築した。さらに Parkin を可視化目的で蛍光蛋白質と融合させた miRFP670nano-Parkin のプラスミドも構築した。cytPINK1-mOrange2-eDHFR、miRFP670nano-Parkin、Halo-OMP25 を HeLa

細胞に共発現させ、pcDHで細胞を処理した。当初、cytPINK1-mOrange2-eDHFRは細胞質に広がっていた。紫色光を照射すると、cytPINK1-mOrange2-eDHFRはミトコンドリアに速やかに移行した。一方、miRFP670nano-Parkinは少し遅れて、ミトコンドリア上に徐々に蓄積した。緑色光を照射した場合、cytPINK1-mOrange2-eDHFRのミトコンドリア移行もmiRFP670nano-Parkinの蓄積もほとんど見られなかった。共局在解析により、紫光照射によるcytPINK1への細胞内局在と、その後のParkinの集積部位が一致していることが示された。pcDH非存在下では、照明波長に関わらず、cytPINK1-mOrange2-eDHFRおよびmiRFP670nano-Parkinのミトコンドリア上への蓄積は見られなかった。

さらに、光照射によりマイトファジーが誘導されたかどうかを検証した。cytPINK1-mOrange2-eDHFR、miRFP670nano-Parkin、Halo-OMPとともに、微小管結合タンパク質軽鎖3 (LC3)と蛍光蛋白質の融合蛋白質であるmEGFP-LC3を共発現させた。細胞をpcDHで処理した後、紫色光照射を行うと、cytPINK1-mOrange2-eDHFRおよびmiRFP670nano-Parkinのミトコンドリアへの集積とともに、mEGFP-rLC3Bのいくつかの蛍光点がmiRFP670nano-Parkinの蛍光シグナルと共局在した。紫色光照射なしでは、miRFP670nano-ParkinとmEGFP-LC3Bの共局在はほとんど観察されなかった。以上により、細胞内キナーゼPINK1の光制御により、マイトファジーの人工誘導が達成できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 11378-11383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Amagai Yuta, Liu Rong, Yamada Momo, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Imaging of Labile Zn ²⁺ in the Golgi Apparatus Using a Localizable Small-Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1531.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Amagai Yuta, Liu Rong, Yamada Momo, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Imaging of Labile Zn ²⁺ in the Golgi Apparatus Using a Localizable Small-Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1531.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imoto Takuma, Muramatsu Masayasu, Miyasaka Hiroshi, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 48
2. 論文標題 Improvement in Photostability of Fluorescein by Lanthanide Ions Based on Energy Transfer-based Triplet State Quenching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 1181-1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 光可逆的タンパク質ラベル化技術を利用したタンパク質局在の光制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Himadri Sekhar Sarkar, Takato Mashita, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of a chemical biology tool enabling reversible optical control of protein labeling
3. 学会等名 The 10th Annual Conference Of The International Chemical Biology Society (ICBS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上進
2. 発表標題 共有結合型蛋白質ラベル化技術を利用した細胞内蛋白質二量体の光制御
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上進
2. 発表標題 共有結合型蛋白質ラベル化技術を利用した細胞内蛋白質二量体の光制御
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Himadri Sekhar Sarkar, Takato Mashita, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of a chemical biology tool enabling reversible optical control of protein labeling
3. 学会等名 The 10th Annual Conference Of The International Chemical Biology Society (ICBS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 光可逆的タンパク質ラベル化技術を利用したタンパク質局在の光制御
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 水上進
2. 発表標題 蛋白質ラベル化に基づく 細胞内分子の計測と制御
3. 学会等名 新学術領域「生命金属科学」領域会議第1回地方巡業(仙台)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上進
2. 発表標題 細胞機能を探索するための 光応答性プローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会一般シンポジウム「タンパク質高速分子動画に向けた光薬理学の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上進
2. 発表標題 蛋白質ラベル化技術を用いた生体分子の可視化と機能制御
3. 学会等名 32回XFEL構造生物学ミーティング（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木理志, 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上進
2. 発表標題 光活性化型タンパク質ラベル化技術を用いた生体分子の局在制御
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間下貴斗, 小和田俊行, 高橋泰人, 松井敏高, 水上進
2. 発表標題 光可逆的蛋白質ラベル化を可能とする生体直交性リガンドの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of chemical probes for investigating biomolecular dynamics in living cells
3. 学会等名 10th RSC-CSJ Joint Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takato Mashita, Toshiyuki Kowada, Hiroto Takahashi, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of photochromic ligands that enable photoreversible protein labeling
3. 学会等名 Chemical Biology and Physiology Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間下貴斗, 小和田俊行, SARKAR S Himadri, 高橋泰人, 松井敏高, 水上進
2. 発表標題 光応答性タンパク質ラベル化リガンドの開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水上研究室 東北大学多元物質科学研究所 http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------