

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19397

研究課題名（和文）タンパク質間スプライシングとウイルス様粒子を用いた酵素活性制御法の開発

研究課題名（英文）The development of methods to control enzyme activity using protein-protein splicing and virus-like particles

研究代表者

小野寺 康仁（Yasuhito, Onodera）

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90435561

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）：本研究の遂行を通じて、酵素活性の完全なON/OFF制御を可能とする技術のプラットフォームを構築することができた。具体的には、任意のタンパク質をエクソソームや細胞外小胞へ導入し、目的細胞に高効率で導入するための技術の基盤と、細胞外から導入されたタンパク質断片を細胞質に発現させた対応するタンパク質断片と再会合させ、活性を持つ全長タンパク質を形成するための技術の基盤を確立することができた。これらの技術は、細胞生物学研究に広く適用することが可能である。例えば、遺伝子の導入や改変を行った細胞の選択や、細胞外小胞やウイルスの動態の解析、臨床における毒性タンパク質の活性制御等に応用することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在広く用いられているタンパク質の活性制御法は、二種類に大別できる。一つは発現レベルでの制御であり、ドキシサイクリン等の薬剤で制御可能なプロモーターを用いてmRNA発現を制御する方法や、オーキシンドグロン法のようにタンパク質分解を制御する方法が挙げられる。もう一つは、タンパク質活性を抑制するドメインを用いる方法であり、ERT2の付加などが挙げられる。いずれも完全な「ゼロ活性」は達成できず、強力な活性を持つタンパク質の制御には問題が生じる。本研究の方法では、活性を全く持たない「タンパク質断片」をベースとして、それを完全長にするための断片を外部から導入することで、活性の完全制御を達成した。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we established a platform for the technology that enables complete on/off control of enzyme activity. Specifically, we established a technical basis to introduce protein of interest into exosomes and/or extracellular vesicles, and load them into target cells with high efficiency, and a platform for reassemble protein fragments introduced from outside the cell with corresponding protein fragments expressed in the cytosol, to form active full-length proteins. These technologies can be widely applied to cell biology research. For example, they can be applied to the selection of the cells after transfection or genome editing, analysis of the dynamics of extracellular vesicles or viruses, and regulation of toxic protein activity in clinic.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酵素活性制御 タンパク質導入 細胞外小胞 エクソソーム ウイルス タンパク質スプライシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な「活性」を持つタンパク質の制御は、細胞生物学研究において必要不可欠な技術である。また、そのような技術は、遺伝子やタンパク質の細胞内導入を介した疾患の治療法においても非常に重要である。現在広く用いられているタンパク質の活性制御法は、二種類に大別できる。一つは「発現レベルの制御」である。例えば、ドキシサイクリン等の薬剤で制御可能なプロモーターを用いて、目的タンパク質の mRNA 発現を制御する方法が挙げられる。この場合は、薬剤等に応答する転写制御タンパク質を別途導入しておく必要があること、原理上、プロモーターの活性を完全にゼロにすることはできないことが課題である。また、オーキシンドeglron法のようにタンパク質分解を制御する方法も、「発現レベルの制御」に大別することができる。この場合は、目的タンパク質に分解を促すためのdeglronを付加しておくこと、薬剤等に応答してdeglronの付加されたタンパク質を分解するシステムを別途導入しておくことが必要である。完全なタンパク質分解は不可能であること、分解されるまでは完全な活性を持つタンパク質が存在してしまうことが課題である。もう一つの方法は、タンパク質の活性を抑制するドメインを用いるものであり、より直接的な活性制御法であると言える。タモキシフェンに応答して抑制が解除される ERT2 の付加は最も代表的であり、その使用例は枚挙に暇がない。上記の発現制御法と比べて、制御ドメインの付加のみで済む点は大きな利点であると言えるが、活性をゼロにすることは、やはり不可能である。

上記いずれの場合も、目的タンパク質の完全な「ゼロ活性」は達成できず、強力な活性を持つタンパク質の制御においては、無視できない活性の「漏れ」が生じてしまう。タンパク質活性の完全な ON/OFF 制御を可能とする汎用的な方法が確立できれば、研究や臨床の場において非常に有用である。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、「タンパク質活性の完全な ON/OFF 制御法」として、活性を全く持たないタンパク質断片を細胞質中で再会合する方法を考案した。具体的には、細胞質中に一方のタンパク質断片を予め存在させておき、もう一方の断片を細胞外から導入して、両者を再会合させるものである。このための技術基盤となる「タンパク質間スプライシングにより活性を持つ完全長タンパク質を再形成する手法」、「任意のタンパク質を細胞外小胞やウイルス様粒子に取込ませる手法」の開発に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

タンパク質間スプライシングにより活性を持つ完全長タンパク質を再形成する手法の開発  
様々な split-inten を介して、2つのタンパク質を共有結合によって連結することが可能である(引用文献1など)。この性質を利用し、活性を全く持たない酵素のN末側断片およびC末側断片から、活性を持つ全長酵素を生成することで、酵素活性の完全な OFF ON の切り替えが出来ると考えた。本研究における解析対象として、培養細胞等に遺伝子構築を導入する際の「薬剤耐性マーカー」として用いられるピューロマイシン耐性遺伝子(Puromycin N-acetyltransferase, PAC)を選んだ。また、split-inteinとしては、高いスプライシング活性が報告されている gp41-1、IMPDH1、Cfaを選んだ。

上記のように split-inten を介して連結される C 末側の断片には、最初のアミノ酸がシステイン(Cfa)やセリンまたはスレオニン(gp41-1、IMPDH1)でなければならないという制約がある。それぞれの split-intein について、PAC の分割点として元々これらのアミノ酸が存在する場所を選んだ。また、PAC の類縁酵素のアミノ酸配列を網羅的に検索してシステインおよびセリンが存在する部位を特定し、当該部位をシステインまたはセリンに置き換えた PAC の変異体 C 末側断片を作成し、それぞれの split-intein による結合および活性化を検討した。タンパク質結合については western blotting にて確認し、活性の獲得についてはピューロマイシン存在下における細胞増殖の測定によって評価した。

#### 任意のタンパク質を細胞外小胞やウイルス様粒子に取込ませる手法の開発

細胞外小胞(extracellular vesicles, EVs)やエクソソームに任意のタンパク質を導入する技術は様々なものが報告されているが、多くの研究においては、EV やエクソソームに集積するテトラスパニンタンパク質(CD9 など)を用いるものが利用されている。これらのタンパク質には細胞外ドメインが存在し、細胞表面での相互作用を介してEV/エクソソームの動態に影響することが示唆されている。EV/エクソソームの内膜はコレステロール濃度が比較的高いことが知られている。そこで本研究では、新たなEV/エクソソーム集積タンパク質として、コレステロール結合ドメインとして知られるD4(引用文献2など)の利用を考案した。D4に蛍光タンパク質やルシフェラーゼ断片を結合して細胞内に発現させ、培養上清からEV/エクソソームを回収した。受け手の細胞におけるEV/エクソソームの集積について、western blotting や蛍光顕微鏡観察、ルシフェラーゼによる発光で評価した。ポジティブコントロールとしてCD9についても同様の解析を行い、EV/エクソソームへのタンパク質導入効率や、回収したEV/エクソソームの細胞内取込み効率などを比較した。

#### 4. 研究成果

タンパク質間スプライシングにより活性を持つ完全長タンパク質を再形成する手法の開発  
上述の方法により分割、再会合させた PAC 断片は、多くのものが全長タンパク質を形成し、ピューロマイシン耐性を示した。しかしながら、殆ど共有結合が形成されない場合や、ピューロマイシン耐性が低いあるいはほとんど無い場合も見られ、各々の分割点に関して個別に評価する必要があることが示唆された。また、上記3つの split-intein を使用した2分割、3分割、4分割型のピューロマイシン耐性遺伝子を作成し、2~4つの異なる遺伝子構築に組み込み、これらを同時導入して一度のピューロマイシン選択を行ったところ、全ての遺伝子構築を持つ細胞のみを高確率で得ることができた。導入した遺伝子構築を全て持つ細胞の割合は100%に近く、同時遺伝子導入の方法として、本手法は非常に有効であることを示すことができた。また、これらの分割型 PAC を含むウイルス様粒子を作成することで、一時的なピューロマイシン耐性を細胞に与えることにも成功した。すなわち、これを利用することで、2~4つの遺伝子の導入を、ピューロマイシン選択のみで、段階的に行うことも可能となった。

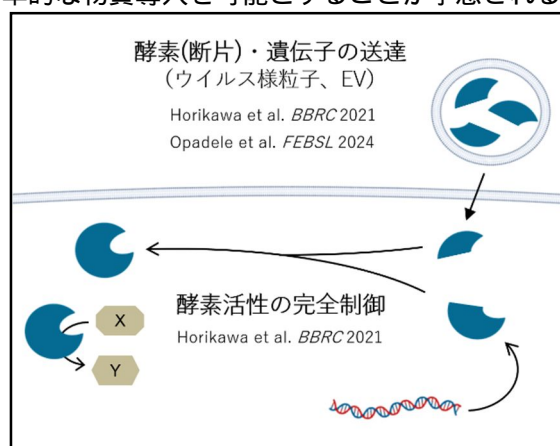
従来は、同様の実験を行う場合、ピューロマイシン耐性遺伝子に加えて、別の薬剤耐性遺伝子や、蛍光タンパク質などを用いる必要があったが、薬剤の種類に限りがあること、異なる薬剤の組み合わせは予想しない毒性を示す場合があること、蛍光タンパク質を用いた場合は後の解析に使用可能な蛍光チャンネルが減ってしまうことなどが、それぞれ問題であった。本研究の過程で得られた「分割型薬剤耐性遺伝子」の知見は、これを解決するものであり、原理上は、split-intein の種類を増やすことで、遺伝子構築の導入数をさらに増やすことが可能である。細胞生物学全般において非常に有用な技術の基盤を確立することができたと考えている。

任意のタンパク質を細胞外小胞やウイルス様粒子に取込ませる手法の開発

D4 ドメインは、CD9 と同様に、任意のタンパク質を EV/エクソソームの画分に集積させること、また、回収した EV/エクソソームは CD9 と同等かそれ以上の効率で標的細胞に取り込まれることが明らかとなった。両者の興味深い差異として、CD9 発現 EV/エクソソームは、細胞表面に結合・残存し易い傾向がある一方で、D4 発現 EV/エクソソームではこのような様子は見られなかったことが挙げられる。前述のような、テトラスパニンタンパク質の細胞外ドメインによる相互作用が原因であると考えられ、そのような非特異的な相互作用を持たないことは、D4 を使用する際の利点の一つであると言える。

なお、ルシフェラーゼを用いた解析の結果、D4 発現 EV/エクソソームの膜融合および内包物放出には、VSV-G などの膜融合促進タンパク質が必要であることを確認している。これは CD9 を含むその他多くの人工改変 EV/エクソソームに共通して知られていることであり、D4 の効率が他と比べて特段劣っている訳ではない。すなわち、一般に、EV/エクソソームを物質導入の手段として用いる場合は、それらの表面の改変による標的特異性および膜融合効率の向上が必要不可欠であることを意味している。細胞表面に露出部を持たない D4 は、それらの表面タンパク質への干渉も少ないと考えられ、より特異的かつ効率的な物質導入を可能とすることが予想される。

以上の成果 および を組み合わせることで、本研究課題で当初想定していた「酵素活性の完全な制御」が可能となった(図)。すなわち、D4 を用いて酵素断片を EV/エクソソームに導入し、対応する酵素断片を予め発現している細胞にこれを作用させることで、酵素活性の OFF ON 制御が高効率で可能である。今後の課題として、上述のような膜融合効率の問題や、活性化した酵素が意図せず細胞外に出てしまった場合の自動不活化などが挙げられる。これらを達成することで、例えば現在盛んに研究されているゲノム編集酵素を用いた疾患治療などを、より安全に行うことができると考えている。



#### <引用文献>

1. Anastassov S, Filo M, Khammash M. Inteins: A Swiss army knife for synthetic biology. *Biotechnol Adv.* 2024, 73, 108349.
2. Ramachandran R, Heuck AP, Tweten RK and Johnson AE. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat Struct Biol.* 2002, 9, 823-827.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horikawa Mei, Sabe Hisataka, Onodera Yasuhito	4. 巻 582
2. 論文標題 Strategies for all-at-once and stepwise selection of cells with multiple genetic manipulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Opadele Abayomi Emmanuel, Nishioka Soichiro, Wu Ping Hsiu, Le Quynh Thu, Shirato Hiroki, Nam Jin Min, Onodera Yasuhito	4. 巻 598
2. 論文標題 The lipid binding D4 domain of perfringolysin O facilitates the active loading of exogenous cargo into extracellular vesicles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 446 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Abayomi Emmanuel Opadele, Soichiro Nishioka, Ping-Hsiu Wu, Hiroki Shirato, Jin-Min Nam, Yasuhito Onodera
2. 発表標題 D4 facilitates active cargo recruitment into EV.
3. 学会等名 第10回日本細胞外小胞学会学術総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	南 ジンミン  (Nam JinMin)  (60414132)	京都大学・生命科学研究科・准教授    (14301)	

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			
米国	スタンフォード大学			
英国	オックスフォード大学			