

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19109

研究課題名（和文）個体内細胞操作を革新するin vivoケモジェネティクスツールの開発

研究課題名（英文）Development of novel chemogenetic tools for in vivo cell manipulation

研究代表者

築地 真也（Tsukiji, Shinya）

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40359659

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）：本研究では、化合物や薬剤を用いて細胞の機能・活性を個体内で操作するための汎用的なin vivoケモジェネティクスツールの開発に取り組んだ。具体的には、1) 薬剤応答性局在スイッチドメインの創製、2) in vivoで使えるタンパク質局在制御化合物の開発、という2つのアプローチを展開した。1については現在さらなる最適化を検討している。一方、2において、タンパク質の細胞膜移行をin vivoで誘導可能な新規ケモジェネティクスツールを創製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

本研究は、生きた動物の体の中で細胞機能や細胞内情報伝達を自在に操作することを可能にする汎用的な化学遺伝学技術を開発するものである。このような技術は、動物個体内で進行する生命現象、細胞内/細胞間情報伝達、疾患などの制御機構を解明するための強力なin vivo生命研究ツールとなるばかりでなく、CAR-T細胞に代表されるような次世代医療や細胞医薬に資する革新的なin vivo細胞操作テクノロジーとしての展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this work, we aimed to develop new chemogenetic methods for controlling cell function in vivo. We pursued two approaches. In the first approach, we focused on engineering a drug-responsive localization-switching domain, which is localized in the cytoplasm in the absence of a drug but translocates to the inner leaflet of the plasma membrane in the presence of a drug. This project is still ongoing for further optimization. In the second approach, we applied our original "self-localizing ligand-induced protein translocation (SLIPT)" technique in vivo. We successfully developed a novel self-localizing ligand and protein tag pair that can be used to induce the plasma membrane recruitment of tag-fused proteins in cells within living mice. This tool may provide a powerful new platform for in vivo cell manipulation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケモジェネティクス in vivo 局在スイッチ 承認薬 局在性リガンド

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウスなどの動物の体の中で細胞機能を自在に操作する技術は、*in vivo* の生命現象や疾患のメカニズム解明のための強力な基盤技術となる。近年、CAR-T 細胞に代表される「細胞医薬」が新たな創薬モダリティとして期待されており、治療用細胞の活性を *in vivo* で精密にコントロールする技術の重要性も高まっている。このような“*in vivo* 細胞操作”を実現するためには、狙った細胞内の特定のシグナル分子やシグナル経路を個体内で人為的に制御する技術が必要である。しかし、そのような技術の開発は極めて遅れている。

2. 研究の目的

本研究では、化合物や薬剤を用いて細胞の機能・活性を個体内で操作するための汎用的な *in vivo* ケモジェネティクスツールを創出することを目的とする。一種類の化合物を用いて、さまざまな細胞活性を動物個体内で自在に誘導・制御することのできる革新的な *in vivo* 細胞操作技術を確立する。

3. 研究の方法

さまざまな細胞内シグナルがタンパク質の局在移行によって制御できることに着目し、*in vivo* で特定の化合物や薬剤に反応してタンパク質の迅速な局在移行を誘導することのできる *in vivo* タンパク質操作ツールの開発に取り組んだ。具体的には、以下の2つの戦略を展開した。

(1) 薬剤応答性局在スイッチドメインの創製

本研究では、任意の対象タンパク質の細胞内局在を薬剤の投与によって制御することのできる「薬剤応答性局在スイッチドメイン」の創製に取り組んだ。*in vivo* で真に使えるツールを開発するためには、動物個体内の内因性分子には作用せず、標的とするタンパク質ドメインに対して高い特異性と親和性で結合する薬剤を用いることが重要である。本研究ではそのような薬剤として、ウイルス薬に着目した。ウイルス薬は、ヒトの内因性分子には作用せず、ヒト体内に侵入したウイルスがコードする特定のウイルスタンパク質に特異的に結合する。本研究では、「ウイルス薬」とその標的となる「ウイルスタンパク質」をペアとして用い、ウイルス薬の非存在下では細胞質局在を、ウイルス薬と結合すると細胞膜に移行する「薬剤 (ウイルス薬) 応答性局在スイッチドメイン」の創製に取り組んだ。

(2) *in vivo* で使えるタンパク質局在制御化合物の開発

我々はこれまでに、タンパク質局在制御化合物 (局在性リガンド) を用いた化学遺伝学タンパク質局在操作技術「SLIPT」を開発している (Ishida et al. JACS 2013; Nakamura et al. ACS Chem. Biol. 2020; Sawada et al. Chem Commun. 2022; Suzuki et al. Cell Chem. Biol. 2022 他)。本研究では、上記もう一つの戦略として、SLIPT 技術の *in vivo* 応用を検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤応答性局在スイッチドメインの創製

特定のウイルス薬 (承認薬) に反応してタンパク質の迅速な細胞膜移行を誘導することのできる「薬剤応答性局在スイッチドメイン」の創製に取り組んだ。基本設計としては、ウイルス薬の標的となるウイルスタンパク質を「リガンド結合ドメイン」として用い、さらにそのリガンド結合ドメインに結合する「阻害ペプチド」と、「細胞膜に結合するペプチド (細胞膜ターゲティングペプチド)」をタンデムに融合することにした。ウイルス薬の非存在下では、リガンド結合ドメインと阻害ペプチドが分子内で結合・複合化することで細胞膜ターゲティングペプチドの機能が抑制される一方、ウイルス薬がリガンド結合ドメインに結合すると阻害ペプチドが外れ、それに伴って細胞膜ターゲティングペプチドの機能が回復する (細胞膜局在を示す) ことを期待した。候補となるコンストラクトを多数作成し、培養細胞を用いた評価を行なったところ、ウイルス薬の非存在下では細胞質局在を示し、ウイルス薬の培地添加に反応して細胞膜へ移行する薬剤応答性局在スイッチドメインのプロトタイプを得ることができた。一方、得られたプロトタイプのコストラクトは発現量依存性が高く、初期状態で細胞膜局在を示す細胞や、ウイルス薬を添加しても局在が変化しない (局在移行を誘導するためには高濃度のウイルス薬を要する) 細胞が多いことも判明した。そのため、発現量に関係なく、初期状態では細胞質局在を示し、より低濃度のウイルス薬に反応して細胞膜移行を示すコンストラクトへのさらなる改良を進めている。

(2) *in vivo* で使えるタンパク質局在制御化合物の開発

我々はこれまでに、小分子トリメトプリム (TMP) を誘導化することで、細胞膜インナーリー

フレットに対する局在を示す局在性リガンド m^DcTMP を開発している (Nakamura et al. ACS Chem. Biol. 2020)。これを用いると、 $^{iK6}DHFR$ タグ (eDHFR のループ領域に Lys 残基の 6 回繰り返し配列を挿入したもの) を細胞質から細胞膜インナーリーフレットへ迅速に移行させることができる (SLIPT-PM : Suzuki et al. Cell Chem. Biol. 2022)。まず、本 SLIPT-PM システムをそのまま用いて、マウス個体内でのタンパク質局在操作を検討したところ、 m^DcTMP はマウス個体内では全く機能しないことが判明した。そこで本研究では、局在性リガンドの設計を再度一から見直し、さらに $^{iK6}DHFR$ タグにもさらなる改良を加えることで、*in vivo* でのタンパク質局在操作が可能な新規ケモジェネティックツールを創製することに成功した。この *in vivo* 適用型 SLIPT-PM ツールを用いることで、任意のタグ融合シグナル分子の細胞膜移行を生きたマウスの体内で誘導することができ、ERK や PI3K といったシグナル分子の活性を *in vivo* でコントロールできることを実証した。これら一連の成果は、現在、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田原海、吉川優、高倉加奈子、寺井健太、松田道行、築地真也
2. 発表標題 SLIPTによるマウス内シグナル操作
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
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
連携研究者	寺井 健太 (Terai Kenta) (20616073)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授 (16101)	

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
---------	---------