

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620128

研究課題名(和文)小分子リガンドによる蛋白質凝集誘導システムの開発

研究課題名(英文)Development of small molecule-inducible protein aggregation system

研究代表者

築地 真也(Tsukiji, Shinya)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40359659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生細胞内の任意の対象蛋白質を小分子化合物によって選択的に凝集させることのできる「小分子誘導型蛋白質凝集システム」を開発することを目的とする。小分子ラパマイシンがFKBPとFRBのヘテロ二量体を誘導することに着目し、FKBPとFRBからなる凝集タグの創製を試みた。さまざまな候補分子のスクリーニングの結果、ラパマイシンに応答して細胞内で凝集体を形成するコンストラクトを見出すことに成功した。この凝集タグを更に改良することで、小分子化合物による高汎用的な蛋白質機能阻害技術を創製できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work is to develop a new system that induces aggregation of specific proteins in living cells using a small molecule. To this end, we focused on small-molecule rapamycin-mediated dimerization of FKBP and FRB, and attempted to create a rapamycin-responsive aggregation tag consisting of FKBP and FRB. Through a screening of various (over 50) FKBP/FRB hybrid sequences, we found an aggregation tag construct that produces protein aggregates in living cells in the presence of rapamycin. The aggregation tag identified in this work may serve as a platform to develop a new small molecule-based protein inactivation technique.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛋白質凝集 小分子リガンド 阻害剤 シグナル蛋白質

1. 研究開始当初の背景

細胞内の蛋白質は常に活性状態にあるわけではなく、細胞が特定の機能を発現する一定の時間帯に活性化する場合が多い。例えば、細胞分裂を制御する蛋白質は、M期に入った細胞が分裂する際の数十分の間に機能し、細胞分裂を進行させる。胚の発生では、段階的に進行する発生のプロセスの中で、それを制御する蛋白質が特定のタイミングで活性化し、発生を進める。このような時間的に制御された蛋白質の機能を解明するためには、対象蛋白質の機能（活性や相互作用）を望みのタイミングで素早く阻害することのできる手法が必要である。現在、そのためのツールとして、小分子阻害剤が用いられている。しかし、標的特定の阻害剤の開発は極めて難しく、生物研究の対象となる膨大な種類の蛋白質のそれぞれに対して特定の阻害剤を開発するのは現時点ではまだ不可能に近い。さまざまな任意の対象蛋白質のコンディショナルな機能阻害を実現できる汎用的な手法を開発することができれば、生命科学や医生物学に大きなブレイクスルーをもたらすものと期待される。

2. 研究の目的

蛋白質は凝集すると（ほぼ例外なく）その機能が損なわれる。そこで本研究では、細胞内に発現させた対象蛋白質を特定の小分子化合物によって選択的に凝集させることのできる「小分子誘導型蛋白質凝集システム」を開発することを目的とする。これにより、一種類の小分子化合物を用いて、細胞内の任意の対象蛋白質を選択的かつ素早く（凝集によって）不活性化することのできる高汎用的なケミカルバイオロジー新ツールを創製することを目的とする。

3. 研究の方法

蛋白質はその種類によって、構造、機能、機能発現メカニズムがそれぞれ異なる。そのため、汎用的な蛋白質阻害技術を確立するためには、蛋白質の多様性に依存しない普遍的な阻害原理が必要となる。本研究では、そのための独自の戦略として、「小分子化合物による蛋白質凝集誘導」というアプローチを提案する。“蛋白質は凝集すると使えない（不活性化する）”というのはあらゆるバイオ研究者が常識的に知っている。凝集による蛋白質の不活性化は、凝集することで蛋白質の天然構造が摂動を受けることや、相互作用分子とのアクセシビリティが立体的因子によ

て障害を受けることに起因する。今回これを逆に利用する。すなわち、小分子化合物を用いて対象蛋白質を人為的に凝集化することができれば、その機能を高効率かつコンディショナルに阻害できるものと考えられる。また、凝集を利用したアプローチは、標的蛋白質の種類を選ばず、どのような蛋白質にでも適用できる高汎用的な蛋白質機能阻害技術になるものと期待される。

本研究では、このアイデアの概念実証を目指し、小分子化合物の添加によって任意の蛋白質の凝集を誘導可能な「小分子誘導型蛋白質凝集システム」の開発を目指した。具体的には、小分子ラパマイシンによる FKBP と FRB のヘテロ二量化に着目し、FKBP と FRB から構成される「ラパマイシン応答性凝集タグ」の創製を試みた。本研究で開発する凝集タグならびに蛋白質阻害システムの概念図を図1に示す。

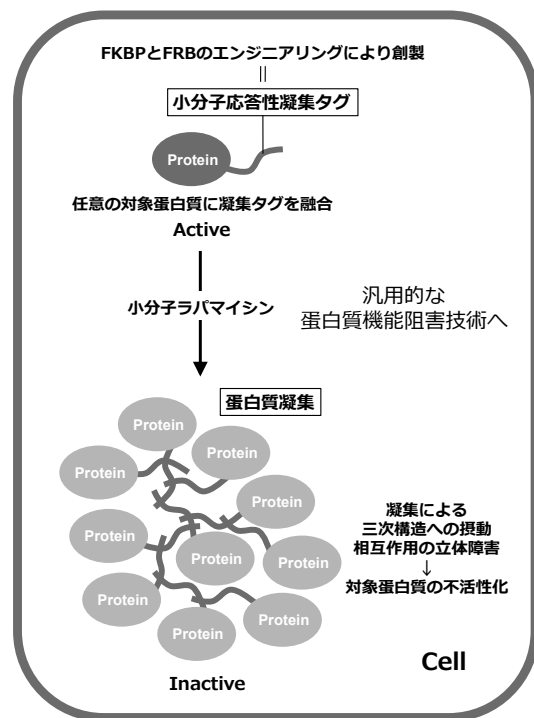


図1 本研究で開発する凝集タグシステム：本システムでは、FKBP と FRB を利用して設計したコンストラクトを「凝集タグ」として標的蛋白質に融合する。凝集タグを融合した標的蛋白質は、それ単独では細胞内で正常に機能する。そこへ、任意のタイミングで小分子ラパマイシンを添加する。ラパマイシンは細胞膜透過性があり、細胞内で FKBP と FRB のヘテロ二量化を誘導する。このヘテロ二量化によって、FKBP と FRB から成る凝集タグは会合し、凝集体を形成する。このとき、標的蛋白質も共に凝集化し、凝集による

三次構造への摂動や相互作用の立体障害などを受けることで不活性化する。

4. 研究成果

本研究ではまず、FKBP と FRB から成る凝集タグ候補配列を計 50 種類ほど設計した。それらが実際にラパマイシンに反応して細胞内で凝集するかどうかをイメージングにより評価するため、それらの末端に蛍光蛋白質を融合したコンストラクトの発現プラスミドを作成した。それらのコンストラクトを培養細胞 (HeLa) に発現させ、ラパマイシンの添加による凝集の有無や、凝集効率を共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより評価した。その結果、ほとんどのコンストラクトで凝集体形成は確認されなかったが、最初は細胞質中に均一に拡散しており、ラパマイシンの添加によって (イメージングで観察できるほどの大きさの) 凝集体を形成するコンストラクトを見出すことに成功した。

そこで次のステップとして、上で見出した凝集タグコンストラクトが実際にシグナル蛋白質の機能阻害に利用できるかどうかを検討した。本研究では、モデル標的蛋白質として Ras を選択した (より詳細には、Ras ファミリーの中の HRas を選択した)。Ras は増殖シグナルや細胞運動を制御する重要な低分子量 G 蛋白質である。一方、Ras 特異的阻害剤の開発は遅れており、Ras のコンディショナルな機能阻害技術はこの蛋白質の細胞内での役割をより深く解析するための強力な新ツールになるものと期待される。本研究では、恒常活性型の Ras 変異体 (V12) の N 末端に GFP (蛍光観察用) と上で見出した凝集タグを融合し (GFP-agTag-RasV12)、そのコンストラクトを HeLa 細胞に発現させた。その際、Ras の活性を検出するためのプローブとして、蛍光蛋白質 mCherry を融合した ERK (mCh-ERK) を共発現させた。Ras が活性状態のときは ERK 経路が活性化しており、mCh-ERK は核内に局在する。一方、Ras が不活性化すると ERK 経路も不活性化し、mCh-ERK は細胞質へ移行する。まず、GFP-agTag-RasV12 と mCh-ERK の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、GFP-agTag-RasV12 は、通常の Ras と同様に、細胞膜 (と一部ゴルジ体) に局在することが確認された。また、mCh-ERK は (増殖因子などの刺激を加えなくても) 最初から核内に局在しており、GFP と凝集タグを融合した恒常活性型 RasV12 は

正常に ERK 経路を活性化していることも確認された。そこで次に、この細胞培養液へラパマイシンを添加した。すると、一部の細胞で mCh-ERK が核内から細胞質へ移行する様子が確認された。このことは、まだ予備的段階ではあるものの、ラパマイシンの添加によって GFP-agTag-RasV12 の活性が部分的に阻害されたことを示唆している。一方、本実験により、最初に見出した凝集タグでは RasV12 の活性を抑制する能力が十分ではないことが明らかとなった。

上記の結果を踏まえ、本研究では、残りの期間を用いて、より高効率な凝集タグの開発に取り組んだ。幾つかの新しい設計を検討したところ、図 2 に示すように、ラパマイシンに反応して効率良く凝集体を形成するコンストラクトを見出すことに成功した。今後より詳細な解析を行いつつ、よりサイズが小さく凝集効率の高い凝集システムへと改良することで、小分子化合物による高汎用的な蛋白質機能阻害技術を創製できるものと期待される。

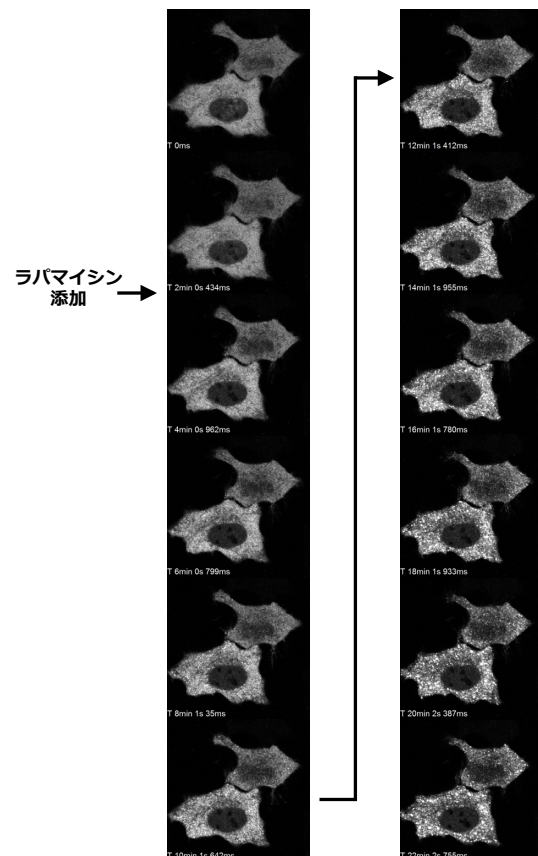


図 2 本研究で開発した凝集タグシステムのタイムラプス蛍光イメージング: 本研究で見出した凝集タグに GFP を融合したコンストラクトを細胞内に発現させ、ラパマイシン添加前後での蛍光イメージを取得した。

本研究の成果はまだ論文にできる状態ではないため、本研究で見出した凝集タグの分子設計などについては公開を控えさせて頂く。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第 55 回新潟生化学懇話会, 2014 年 6 月 28 日, 長岡技術科学大学, 新潟県: 石川 瑛介, 滝川和正, 石田学, 中村彰伸, 築地真也 “小分子化合物による蛋白質凝集誘導システムの開発” (ポスター発表)

[その他]

研究室ホームページ

<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~tsukijilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 真也 (Tsukiji, Shinya)

長岡技術科学大学・生物系・准教授

研究者番号: 40359659

(4) 研究協力者

石田 学 (Ishida, Manabu)

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター・博士研究員

中村 彰伸 (Nakamura, Akinobu)

長岡技術科学大学・生物系・大学院生

滝川 和正 (Takigawa, Kazumasa)

長岡技術科学大学・生物系・大学院生

石川 瑛介 (Ishikawa, Eisuke)

長岡技術科学大学・生物系・大学院生

片平 莉香 (Katahira, Rika)

長岡技術科学大学・生物系・学部生