

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03835

研究課題名(和文) タンパク質局在制御化合物による細胞機能制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of new techniques for cell regulation using synthetic self-localizing ligands

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、局在性リガンドの方法論を発展させ、生細胞内のタンパク質の局在やシグナルを化合物(局在性リガンド)で自在に操るための新しいケミカルバイオロジーツールを開発することを目的とした。さまざまな検討の結果、1)局在性リガンドを用いて標的タンパク質を細胞質から細胞膜内膜へ特異的に移行誘導可能なシステム、2)一細胞内の二種類のタンパク質の局在とシグナル活性を独立に制御可能なシステム、3)細胞内のシグナル活性持続時間を制御可能なシステム、4)標的タンパク質を細胞質から小胞体/ゴルジ体膜(エンドメンブレン)上へ移行誘導可能なシステム、を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work was to develop new chemical biology techniques for controlling protein localization and cell signaling using synthetic self-localizing ligands (SLLs). We successfully developed new SLL-based methods that allow: (1) inducible protein translocation from the cytoplasm to the inner-leaflet of the plasma membrane, (2) orthogonal control of two distinct signaling molecules and pathways in single cells, (3) temporal control of signal duration, and (4) inducible protein translocation to the ER/Golgi membranes (endomembranes).

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：局在性リガンド タンパク質局在 オルガネラ シグナル伝達 細胞機能制御

1. 研究開始当初の背景

小分子化合物を用いてタンパク質を制御し、細胞の機能を自在に操ることは、生命科学やケミカルバイオロジーの大きな目標の一つである。そのため、タンパク質を制御する化合物(リガンド)の探索・開発研究が世界レベルで勢いを増しており、タンパク質特異的リガンドのレパートリーは今後着実に増えていくものと予想される。その一方、従来のリガンド開発では、タンパク質の「酵素活性」もしくは「他の分子との相互作用」を制御する化合物がその中心となっている。また、そのほとんどは阻害剤である。酵素活性や相互作用の阻害剤の重要性について疑う余地はないもの、化合物の可能性は他にもないだろうか? タンパク質の「細胞内局在」はそのタンパク質の細胞内での機能を定める重要な因子である。情報伝達の過程では、多くのタンパク質がその局在場所を変えることで下流の分子プロセスを制御している。したがって、化合物を用いてタンパク質の細胞内局在を制御することができれば、従来の酵素活性や相互作用を標的とした化合物とは全く異なる新しい化合物技術が切り開かれるものと期待される。しかし、タンパク質に結合してその局在を動かすことのできる化合物というのはその設計戦略自体がなく、化学やケミカルバイオロジーの長年の未開拓領域であった。

そのような中、我々は、「タンパク質の細胞内局在を制御する化合物」という新しい化合物コンセプトの開拓に挑戦している。先行研究において、小分子リガンドに細胞内自己局在化能を付与した化合物(局在性リガンド)を用いることで、細胞内の標的タンパク質の局在をその化合物一つで制御できることを実証した。

2. 研究の目的

本研究では、「局在性リガンド」の方法論を発展させ、生細胞内のタンパク質の局在とシグナルを化合物(局在性リガンド)で自在に操るための新しいケミカルバイオロジーツールを創出することを目的とした。具体的には、(1)局在性リガンドの標的タンパク質の拡張、(2)局在移行先となる細胞内オルガネラの拡張、(3)それらの新ツールを用いた新しい細胞内シグナル制御システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、我々がこれまで用いてき

た大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(eDHFR)に加え、これと直交性を持つ SNAP-tag を標的とした局在性リガンドの創製に取り組んだ。また、局在性リガンドの局在化部位を検討することで、新しいオルガネラ局在性を示す局在性リガンドの探索を行った。さらに、本研究で見出した新規局在性リガンドや局在移行誘導ツールを活用した新しい細胞内シグナル制御システムの構築を進めた。

4. 研究成果

(1) ゴルジ体と細胞膜に対する SNAP-tag 局在移行誘導システムの開発

以前に開発した eDHFR に対する局在性リガンド(mgcTMP)の分子設計を参考に、SNAP-tag の細胞内局在を制御する新規局在性リガンド(mgcBCP)を設計・合成した。これを用いることで、細胞内に発現させた SNAP-tag 融合タンパク質を細胞質からゴルジ体膜上へ移行させられることを明らかにした。次に、細胞膜内膜に対する局在移行誘導を目指し、SNAP-tag のN末端にカチオン性アミノ酸である Lys 残基の繰り返し配列(K-tag)を付加したコンストラクト(K-SNAP)を創製した。これを用いると、同じ mgcBCP によって、K-SNAP 融合タンパク質を細胞質から細胞膜内膜に特異的に移行させられることを実証した。これにより、K-SNAP を基盤とした細胞膜特異的タンパク質局在移行誘導システムを構築することに成功した。

(2) K-tag の汎用性の実証

我々が以前に開発した eDHFR の局在移行誘導システムでは、mgcTMP によって、eDHFR 融合タンパク質は細胞質からゴルジ体と細胞膜内膜の両方に移行する。そこで、細胞膜特異性を向上させる目的で、上述の K-tag を eDHFR にも適用した。その結果、K-tag を融合した eDHFR (K-eDHFR) は、mgcTMP によって、細胞質から細胞膜内膜に特異的に移行することが明らかとなった。すなわち、K-tag を用いたアプローチは、局在性リガンドによって標的タンパク質を細胞膜特異的に移行させるための汎用的な分子設計戦略になることが示された。

(3) 一細胞内の二分子を制御する技術の開発とシグナル制御への応用

上記(1)と(2)により、K-eDHFR と K-SNAP を基盤とした2つの細胞膜特異的タンパク質局在移行誘導システムを構築することができた。そこで、これらのシステムを一つの

細胞内に導入し、一細胞内の二種類の分子をそれぞれ独立に制御可能な一細胞内二分子制御システムの構築を試みた。まず、K-eDHFR を EGFP で、K-SNAP を mCherry で標識したコンストラクトを細胞内に発現させ、それぞれに対応する局在性リガンドを順次添加することで、K-eDHFR 融合タンパク質と K-SNAP 融合タンパク質の細胞膜移行をそれぞれ独立に誘導できることを実証した。さらに、この一細胞内二分子制御システムを応用することで、細胞内の Ras/Erk 経路と PI3K/Akt 経路の二種類のシグナル経路を独立に活性化できることを実証した。この系を定量的に解析する過程で、Ras/Erk 経路と PI3K/Akt 経路間のクロストークに関する新しい知見を見出しつつあり、現在継続して解析を進めている。また、上記 (1) ~ (3) の成果をまとめた論文を現在投稿準備中である。

(4) 細胞内シグナルの持続時間を制御する技術の開発

以前に開発した eDHFR の局在移行誘導システムを精査する過程で、mgcTMP による eDHFR の局在移行は可逆的であることを見出した。すなわち、細胞質を拡散している eDHFR 融合タンパク質を mgcTMP によって細胞膜へ移行させると、その後 (細胞の洗浄操作等は行わないにも関わらず)、その局在が自発的に (1 時間程度で) 細胞質に戻る事が明らかとなった。詳細な解析の結果、この局在解消は、mgcTMP が細胞内で分解されることに起因することを明らかにし、その切断酵素 (プロテアーゼ) の同定にも成功した。さらにその知見をもとに、細胞内で分解を受けない新しい局在性リガンドを開発した。これを用いることで、eDHFR 融合タンパク質を長時間安定に細胞膜へ移行させることが可能となった。eDHFR 融合タンパク質を非分解型局在性リガンドによって細胞膜へ移行させた後、フリーの TMP を添加することで、任意のタイミングで局在を元に戻すことができる。この可逆的局在移行誘導の原理を応用し、細胞内のシグナル分子や経路の活性化時間 (持続時間) を人為的にコントロールする技術を確認することに成功した。これらの成果は現在、論文投稿準備中である。

(5) エンドメンブレン局在性リガンドの創製と応用

局在性リガンド mgcTMP による eDHFR の細胞膜移行メカニズムを解析する過程で、脂質を連結した TMP リガンドが細胞内の小胞体膜

とゴルジ体膜、すなわちエンドメンブレン領域に局在化することを見出した。そこで、脂質連結 TMP リガンドをエンドメンブレン局在性リガンドとして利用し、エンドメンブレンを標的とした eDHFR 局在移行誘導システムを構築した。さらに、それを応用することで、エンドメンブレン上の Ras を人為的に活性化するシステムを構築することに成功した。現在、このシステムを用いてエンドメンブレン Ras の機能解明を行うと同時に、エンドメンブレンへの局在移行を利用した新しい細胞内シグナル制御技術の開発を進めている。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

①築地真也、タンパク質の細胞内局在を操る化合物-局在性リガンド、生体の科学、66、95-101 (2015)

②築地真也、タンパク質の細胞内局在を操る小分子リガンド、薬学雑誌、136、9-16 (2016)

③築地真也、独自の分子デザインによる次世代生命制御を目指して、Peptide Newsletter Japan、102、2-5 (2016)

④築地真也、化合物で細胞内分子の局在を操る~SLIPT テクノロジーの可能性~、生命化学研究レター、56、7-12 (2018)

[学会発表] (計 54 件)

①Shinya Tsukiji、Synthetic molecules that control the location of proteins in living cells、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

②藤沼学子、沖超二、中村彰伸、石川瑛介、石田学、築地真也、局在性リガンドによる細胞内 SNAP-tag 局在移行誘導システム (1) : 基本分子設計と特性、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

③篠田英里、藤沼学子、沖超二、中村彰伸、石川瑛介、築地真也、局在性リガンドによる

細胞内 SNAP-tag 局在移行誘導システム (2) : 生細胞内シグナルの人工制御、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

④中村彰伸、沖超二、小松直貴、松田道行、築地真也、局在性化合物による生細胞内 MAPK シグナルの Temporal コントロール、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

⑤中村彰伸、石田学、沖超二、松田道行、築地真也、局在性リガンドツールの新展開 1 : Ras/Erk シグナルのオンオフ制御、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日~27 日、同志社大学京田辺キャンパス (京都)

⑥藤沼学子、沖超二、中村彰伸、石川瑛介、石田学、築地真也、局在性リガンドツールの新展開 2 : 細胞膜選択的 SNAP-tag 局在移行誘導システム、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日~27 日、同志社大学京田辺キャンパス (京都)

⑦片平莉香、篠田英里、藤沼学子、石田学、築地真也、局在性リガンドツールの新展開 3 : ER/Golgi 膜へのタンパク質局在移行誘導リガンド、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日~27 日、同志社大学京田辺キャンパス (京都)

⑧片平莉香、篠田英里、藤沼学子、石田学、築地真也、脂質連結リガンドによる小胞体/ゴルジ体膜へのタンパク質局在移行誘導、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会 (第 68 回日本細胞生物学会大会合同大会)、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都)

⑨藤沼学子、沖超二、中村彰伸、石川瑛介、石田学、築地真也、カチオンタグ連結 SNAP-tag と局在性リガンドに基づいた細胞膜選択的タンパク質局在移行誘導システム、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会 (第 68 回日本細胞生物学会大会合同大会)、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都)

⑩中村彰伸、石田学、沖超二、小松直貴、松田道行、築地真也、局在性リガンドを用いた生細胞内 Ras/MAPK シグナルの可逆制御、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会 (第

68 回日本細胞生物学会大会合同大会)、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都)

⑪藤沼学子、沖超二、中村彰伸、築地真也、局在性リガンドによる 1 細胞内 2 分子制御、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7 日~9 日、石川県立音楽堂ほか (石川)

⑫片平莉香、篠田英里、藤沼学子、石田学、築地真也、脂質連結小分子リガンドによる細胞内タンパク質のオルガネラ膜移行誘導とシグナル制御、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日~27 日、仙台国際センターほか (宮城)

⑬澤田隼佑、中村彰伸、藤沼学子、沖超二、築地真也、細胞膜選択的タンパク質局在移行誘導システムの分子デザイン、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日~19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川)

⑭中村彰伸、藤沼学子、沖超二、真流玄武、青木一洋、松田道行、築地真也、1 細胞 2 分子制御システムの創製、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日~19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川)

⑮加藤拳也、中村彰伸、沖超二、藤沼学子、吉井達之、築地真也、1 細胞内の複数の分子活性を制御する技術の開発、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月 7 日~9 日、東京大学弥生キャンパス (東京)

⑯澤田隼佑、片平莉香、中村彰伸、吉井達之、築地真也、脂質連結リガンドによる小胞体膜への蛋白質アンカリングと可逆的シグナル制御、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月 7 日~9 日、東京大学弥生キャンパス (東京)

⑰澤田隼佑、片平莉香、中村彰伸、吉井達之、築地真也、エンドメンブレンを標的としたタンパク質局在移行誘導化合物の創製と Ras シグナル制御、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6 日~9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

⑱中村彰伸、澤田隼佑、沖超二、吉井達之、市橋裕樹、小松徹、浦野泰照、築地真也、局在分子ツールの新展開 1 : 分解型/非分解型局在性リガンドによる細胞内シグナル持続

時間制御、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 20 日～23 日、日本大学理工学部船橋キャンパス（千葉）

⑱加藤拳也、中村彰伸、吉井達之、築地真也、局在分子ツールの新展開 3：細胞内シグナル多重制御のための直交型 SLIPT システム、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 20 日～23 日、日本大学理工学部船橋キャンパス（千葉）

⑳澤田隼佑、中村彰伸、吉井達之、築地真也、局在分子ツールの新展開 4：細胞膜インナーリーフレット特異的局在性リガンドの創製、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 20 日～23 日、日本大学理工学部船橋キャンパス（千葉）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://tsukijilab.web.nitech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 真也 (TSUKIJI Shinya)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40359659

(2) 研究分担者

滝本 浩一 (TAKIMOTO Koichi)

長岡技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30500996