

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23651214

研究課題名（和文）

蛋白質リガンドの精密局在化に基づいたシグナル伝達活性化剤の合理的設計

研究課題名（英文）

Rational design of synthetic signaling activators by subcellular targeting of protein ligands

研究代表者

築地 真也 (Tsukiji Shinya)

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・特任准教授

研究者番号：40359659

研究成果の概要（和文）：本研究では、生細胞内の特定のオルガネラや膜領域に自発的に局在化する合成リガンド（「局在性リガンド」）を創製した。それらと蛋白質工学を融合することで、細胞内蛋白質の局在移行やシグナル伝達をコンディションに誘導・活性化することのできる新しい細胞機能制御法を開発した。

研究成果の概要（英文）：In this work, we have designed and created synthetic self-localizing ligands that spontaneously localize to specific organelles or membrane regions in living cells. Using the ligands and protein engineering, we have developed a new cell control method that allows conditional induction of protein translocation and cell signaling in mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生物活性分子の設計・合成

## 1. 研究開始当初の背景

合成小分子化合物を用いて細胞内の特定の蛋白質やシグナル伝達経路を自在に（コンディショナルに）活性化することができれば、生命現象の解明や創薬のための強力なアプローチとなりうる。しかし、細胞機能制御を指向した化合物開発においては、阻害剤の開発がその中心的対象となっており、細胞内蛋白質・シグナル伝達を活性化するための方法論はまだ極めて少ないのが現状である。

## 2. 研究の目的

細胞内では、多くの蛋白質がその居場所を変えることで、それ自身や下流経路の活性化を引き起こす。そこで本研究では、蛋白質の居場所を部位特異的に変えることのできる

合成化合物を開発し、それと蛋白質工学的手法を組み合わせることで、細胞内蛋白質の局在移行やシグナル伝達をコンディショナルに誘導制御可能な革新的なケミカルバイオロジーツールを創製することを目指す。

## 3. 研究の方法

蛋白質の細胞内での居場所を変える化合物というのは、その設計戦略自体がまだ未開拓の状態にある。本研究では、研究代表者が独自に考案した「局在性リガンド」という分子コンセプトをもとに、この課題に取り組む。局在性リガンドというのは、生きた細胞内の特定のオルガネラや膜領域に自発的かつ選択的に局在化するように設計した合成リガンドである。局在性リガンドは、それ自身が

局在化するばかりでなく、細胞内のその結合蛋白質を細胞質からその局在化部位へ移行連行することができる。本研究では、このような蛋白質の局在移行を誘導可能な局在性リガンドをできるだけ多く創製し、それらを用いた細胞内シグナル伝達誘導システムを構築する。

#### 4. 研究成果

##### 4-1：局在性リガンドの開発

本研究ではまず、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) の高親和性・高選択性リガンドであるトリメトプリム (TMP) を対象リガンドとして採用し、これを細胞膜インナーリーフレット (iPM) やその他のオルガネラに精密に局在化させるための基本分子設計を確立することを目指した。さまざまな検討の結果、ミリスチン酸-グリシン-システインからなる脂質化ペプチド骨格を用いることで、iPM 上に自発的に局在化する TMP リガンド「iPM-TMP」(図 1A) を創製することに成功した。eDHFR と緑色蛍光蛋白質 (GFP) の融合蛋白質 (eDHFR-GFP) を HeLa 細胞に発現させ、その培養液に iPM-TMP を添加したところ、最初は細胞全体に発現していた eDHFR-GFP がリガンドによって iPM へ移行することが確認できた (図 1B)。これにより、局在性リガンドによって細胞内蛋白質の居場所をコントロールできることを実証した。

また、他の脂質骨格を組み込んだ小胞体/ゴルジ体局在性 TMP リガンド、DNA 結合性化合物を利用した核局在性 TMP リガンド、タキソールを用いた微小管局在性 TMP リガンドなど、さまざまなオルガネラを標的とした局在性 TMP リガンドを開発した。これらは全て eDHFR-GFP の細胞内局在移行を誘導できることを確認した。

##### 4-2：細胞内シグナル伝達活性化誘導システムの構築

次に、上記の iPM-TMP を利用した細胞内シグナル伝達誘導システムの構築に取り組んだ。蛋白質キナーゼである Akt を最初の標的として選び、Akt のキナーゼドメインに YFP と eDHFR をタンデムに融合した合成 Akt (YFP-eDHFR-Akt<sub>KD</sub>) を設計した (図 2A)。これを NIH3T3 細胞に発現させ、まず、YFP-eDHFR-Akt<sub>KD</sub> が iPM-TMP の添加によって細胞質から iPM 上へ移行することを確認した。更に、この局在移行によってキナーゼドメインの 308 番目のスレオニンと 473 番目のセリンの二カ所がリン酸化されること、すなわち YFP-eDHFR-Akt<sub>KD</sub> が活性化することを確認した (図 2B)。iPM-TMP によって活性化した YFP-eDHFR-Akt<sub>KD</sub> は下流基質である内在性 GSK のリン酸化を引き起こ

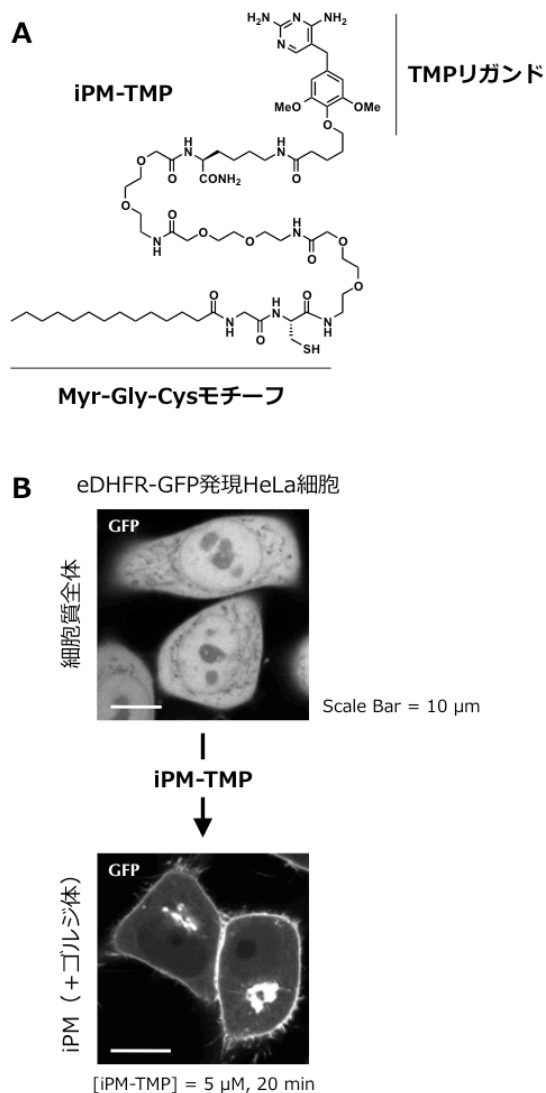


図 1：局在性リガンドによる蛋白質局在移行誘導

(A) iPM-TMP の分子構造

(B) iPM-TMP による eDHFR-GFP の局在移行の共焦点蛍光イメージ像

すことも確認できた。この合成 Akt は通常血清刺激には応答せず、iPM-TMP によってのみ活性化された。また、iPM-TMP は細胞内在性の Akt には作用しなかった。以上の結果は、YFP-eDHFR-Akt<sub>KD</sub> を発現させることで、iPM-TMP によってのみ活性化されるシンセティックな Akt 経路を生細胞内に構築できたことを示している。

eDHFR を他のシグナル蛋白質に融合することで、Akt 以外のさまざまなシグナル伝達経路を活性化できるはずである。例えば、低分子量 G 蛋白質である Rac に対する GEF の Tiam1 (YFP-eDHFR-Tiam1) を用いた場合、iPM-TMP の添加によって内在性の Rac が活性化し、細胞運動 (ラメリポディア形成) を引き起こすことが示された。また、ホスホイノシタイド (脂質) キナーゼである PI3K を

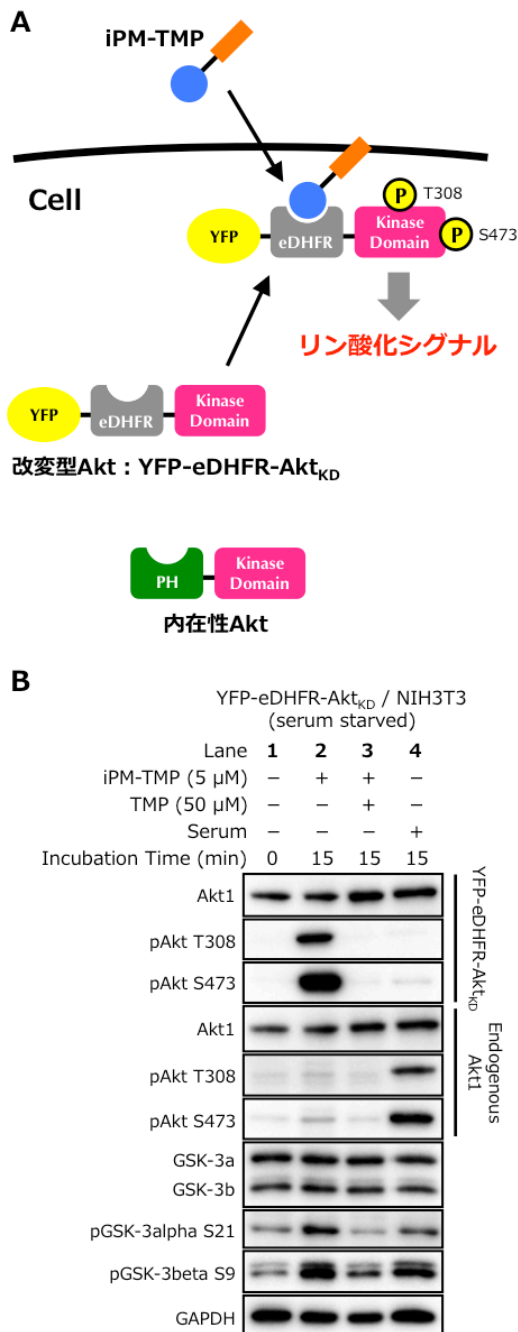


図 2：局在性リガンドによる細胞内シグナル伝達制御

(A) 合成 Akt 経路のスキーム図  
 (B) iPM-TMP による合成 Akt 経路の選択的活性化 (ウエスタンブロット解析)

改変した mCherry-eDHFR-PI3K を用いることで、iPM-TMP の添加によって脂質セカンドメッセンジャーの一つである PIP3 をコンディショナルに産生することができた。

以上のように、局在性リガンドによる蛋白質局在移行という戦略によって、さまざまな細胞内シグナル伝達経路のコンディショナルな活性化誘導システムを構築できることを実証した。これらの一連の成果をまとめた

論文を現在投稿中である。

### 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)

[学会発表] (計 11 件)

(1) 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22~25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 滋賀県: 築地真也 “リガンド分子細工による新しいケミカルバイオロジー方法論の開拓” (若い世代の特別講演会)

(2) 同上: 石田学, 渡部秀章, 滝川和正, 浜地格, 築地真也 “細胞膜局在性リガンドによる細胞機能制御 1: 合成シグナル伝達経路の生細胞内構築” (口頭発表)

(3) 同上: 沖超二, 石田学, 渡部秀章, 浜地格, 築地真也 “細胞膜局在性リガンドによる細胞機能制御 2: 内在性脂質シグナリングの活性化” (口頭発表)

(4) The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012 年 11 月 28~30 日, 東工大蔵前会館, 東京都: Manabu Ishida, Hideaki Watanabe, Kazumasa Takigawa, Yasutaka Kurishita, Itaru Hamachi, Shinya Tsukiji “Self-localizing ligands: new tools for conditional control of protein translocation and cell signaling” (ポスター発表)

(5) 第 6 回 バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 6~8 日, 北海道大学高等教育推進機構, 北海道: 築地真也, 石田学, 渡部秀章, 滝川和正, 沖超二, 栗下泰孝, 浜地格 “局在性リガンド: 細胞機能制御のための新しい分子コンセプト” (口頭発表)

(6) 同上: 石田学, 渡部秀章, 沖超二, 浜地格, 築地真也 “局在性リガンドを Input とする細胞内人工情報伝達経路” (ポスター発表)

(7) The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2012), 2012 年 7 月 4~6 日, Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA, 沖縄県: Shinya Tsukiji, Manabu Ishida, Hideaki Watanabe, Kazumasa Takigawa, Yasutaka Kurishita, Itaru Hamachi “Controlling cell signaling with self-localizing ligands” (口頭&ポスター発表)

(8) 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25~28 日, 慶応義塾大学日吉・矢上キャンパス, 神奈川県: 築地真也, 渡部秀章, 栗下泰孝, 浜地格 “細胞内局在性化合物 1: 局在性リガンドの創製と蛋白質局在移行誘導” (口頭発表)

(9) 同上: 渡部秀章, 石田学, 浜地格, 築地真也 “細胞内局在性化合物 2: 細胞膜内葉局在性リガンドの設計と細胞内挙動” (口頭発表)

(10) 同上: 石田学, 渡部秀章, 浜地格, 築地

真也 “細胞内局在性化合物 3：局在性リガンドによるシグナル伝達活性化”（口頭発表）  
(11) 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム，2011 年 9 月 12～14 日，つくば国際会議場「エポカルつくば」，茨城県：築地真也，渡部秀章，栗下泰孝，浜地格 “細胞内局在性蛋白質リガンド-細胞機能制御のための新分子ツール”（口頭発表）

〔図書〕（計 1 件）

(1) 築地真也，浜地格，“局在性リガンドによる細胞内情報伝達誘導システム”，未来材料，査読無，Vol. 3, No. 2, 2013, p. 11-16.

## 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・産学融合トップランナー養成センター・特任准教授

研究者番号：40359659