

令和元年6月3日現在

機関番号：13903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06759

研究課題名(和文)自己組織化による人工オルガネラの創出と蛋白質機能制御

研究課題名(英文)Control of protein function by self-assembled artificial organelle

研究代表者

吉井 達之(Yoshii, Tatsuyuki)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30778048

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、細胞内に人工的な空間(人口オルガネラ)を作製した。この人工オルガネラを用いて細胞内の特定のタンパク質を取り込むことにより、その機能を高速に不活性化する技術の開発に成功した。また逆にあらかじめ人口オルガネラ内に閉じ込めておいたタンパク質を放出することで、その機能を高速に活性化することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、さまざまな細胞内のタンパク質の機能を自由に制御することが可能になった。本技術は、基礎的な細胞生物学における研究ツールだけではなく、幹細胞の分化制御や細胞治療などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文): We have developed protein-based synthetic organelles in living mammalian cells. Chemogenetic protein-releasing/trapping system into the synthetic organelle was developed. Protein activity was inactivated by trapping into the synthetic organelles due to the isolation from the substrates. Releasing of the proteins from the synthetic organelles resulted in the activation of the downstream signaling.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞 オルガネラ 自己組織化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は細胞内で起こる現象の中心を担う重要な分子である。これまで、試験管内での生化学的な解析から、どのタンパク質がどのような反応をするか、相互作用をするかという情報が数多く得られている。一方で、生きた細胞内においてタンパク質がどのように働いているかを知るためには、機能を調べたいタンパク質を任意のタイミングで活性化あるいは不活性化し、リアルタイムイメージングで細胞の動態や分子活性を追跡する必要がある。有機小分子を用いてタンパク質を操作する化学遺伝学は、タンパク質の活性をコンディショナルに操作する手法として近年注目されている。化合物で操作するための原理としては、スプリットタンパク質や、アロステリック操作、立体障害の導入などがある(図 1)が、いずれの場合も分子設計の際にタンパク質の立体構造情報が必要である。また、仮に構造情報が得られた際にも、活性をうまく制御できるような融合タンパク質を得るためにはさまざまな構造のものを用意し、最適化する必要がある。したがって、構造に依存せず、機能を調べたいタンパク質に応じて簡便に作製できる化学遺伝学ツールを作ることができれば、生命科学において大きなブレークスルーとなる。

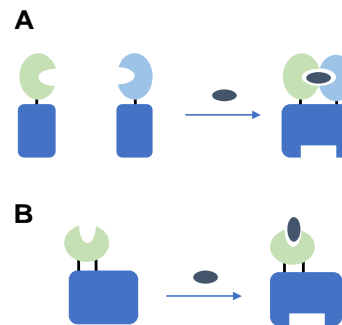


図 1. 既存の化学遺伝学 (A) スプリットタンパク質の再構成 (B) アロステリックドメインの挿入

2. 研究の目的

本研究では、構造に依存せず、機能を調べたいタンパク質に応じて簡便に作製できる化学遺伝学ツールの作製を目指した。これを実現するために、細胞内にメンブレンレスオルガネラを作り出し、小分子化合物の添加によってタンパク質を取り込んだり放出したりするシステムを考案した(図 2)。細胞内に作製した人工的な空間内にタンパク質を取り込めば、そのタンパク質が本来の反応基質や相互作用する相手と切り離すことが可能であるため、機能を阻害することが可能になる。また逆に、人工的な空間の中からタンパク質を任意のタイミングで放出することができれば機能を活性化できると考えられる。本戦略は非常にシンプルでありながら、構造によらずさまざまなタンパク質に応用できると期待される。

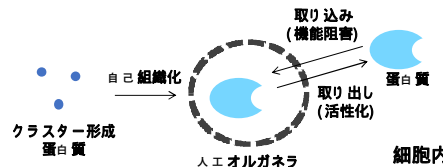


図 2. 人口オルガネラを利用したタンパク質機能制御

3. 研究の方法

細胞内でメンブレンレスオルガネラを構築するために、オリゴマータンパクを連結することとした(図 3A)。この融合タンパク質を人口オルガネラ形成ドメインとし、これをコードするプラスミド DNA を作製し、リポフェクションによって細胞に導入し、発現させた。また、狙ったタンパク質を取り込むために、化合物誘導二量体化法(CID)を用いることとした。人口オルガネラ形成ドメインに FRB を融合した。取り込ませるタンパク質には FKBP を融合した(図 3B)。タンパク質を放出するためのシステムとしては TEV プロテアーゼを使用した。具体的には、人口オルガネラ形成ドメイン、FRB にさらに切断配列を介してタンパク質を導入した。また、FKBP に TEV プロテアーゼを融合した。これらをコードするプラスミドを細胞に導入し発現後、ラパマイシンを添加することで、TEV プロテアーゼと基質配列が近接し、切断が起こることを期待した(図 3C)。

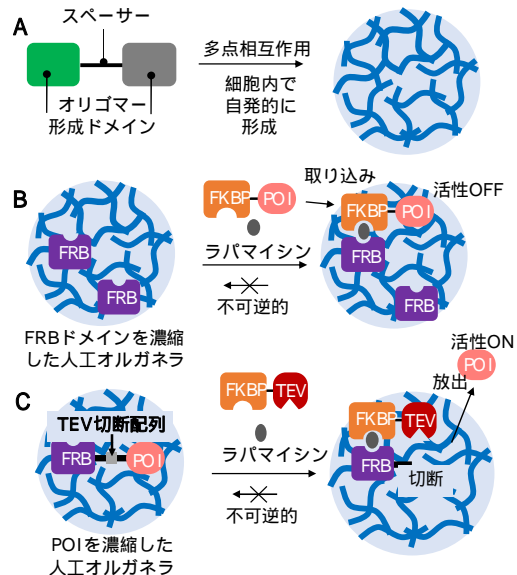


図 3. 研究の方法 (A)人口オルガネラの設計 (B) タンパク質の取り込み (C)タンパク質の放出

4. 研究成果

まず、赤色蛍光タンパク質(RFP)をモデルとし、これを取り込むシステムを検討した。人口オルガネラドメインに FRB を融合したタンパク質と、FKBP-RFP を細胞内に発現させた。これを共焦点レーザー走査顕微鏡で観察すると、細胞内に人口オルガネラが輝点として見られた。FKBP-RFP はサイトゾルに拡散している様子が見られたが、ラパマイシンを添加すると、人口オルガネ

ラに取り込まれることがわかった。FKBP-RFP に Vav2 や Sos1 といったグアニンヌクレオチド交換因子を結合させると、ラパマイシン添加によって取り込むことでこれらの下流シグナルを不活性化することができた。

BFP をモデルタンパク質として、放出システムを開発した。融合タンパク質を発現させ、共焦点レーザー走査顕微鏡をイメージングによって解析した結果、BFP の蛍光は起点として観察され、人口オルガネラ内に存在することがわかった。この細胞にラパマイシンを添加すると起点上に見られた蛍光は減少し、BFP 蛍光が拡散する様子が見られた。また、ウェスタンブロッティングによって解析を行うと、BFP のバンドの分子量が変化した。これらのことから、ラパマイシン添加によって TEV 切断が起こり、その結果人口オルガネラ内からタンパク質の放出が起こったと考えられる。BFP の箇所には Vav2 や Sos1 といったグアニンヌクレオチド交換因子を結合させると、ラパマイシン添加によって放出が起こり、これらの下流シグナルを活性化することができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

吉井 達之、吉川 優、生田 雅裕、築地 真也、“人工オルガネラによる細胞内分子操作 (1) : タンパク質トラップによるシグナル不活性化” 日本化学会第 99 春季年会 2019 年 3 月 21 日(日本大学理工学部船橋キャンパス)

吉川 優、生田 雅裕、吉井 達之、築地 真也“人工オルガネラによる細胞内分子操作 (2) : タンパク質リリースによるシグナル活性化” 日本化学会第 99 春季年会 2019 年 3 月 21 日 (日本大学理工学部船橋キャンパス)

吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也“人工オルガネラを用いた細胞内シグナル不活性化技術の開発” 第 6 回将来を見据えた生体分子の構造・機能解析から分子設計に関する研究会 2019 年 1 月 7 日 (名古屋工業大学)

生田雅裕、吉川優、吉井達之、築地真也“人工オルガネラを用いた細胞内シグナル活性化技術の開発” 第 6 回将来を見据えた生体分子の構造・機能解析から分子設計に関する研究会 2019 年 1 月 7 日 (名古屋工業大学)

吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也“人工オルガネラの構築と生体分子制御への展開” 第 1 回生命分子分子研究会、KKR ホテルびわこ 2018 年 9 月 17 日 (滋賀県大津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

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

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。