

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15697

研究課題名（和文）人工オルガネラを用いた可逆的かつ汎用的な化学遺伝学ツールの創製

研究課題名（英文）Reversible and versatile chemogenetic tool using artificial organelles

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内に人工的な場（人工オルガネラ）を作製し、狙ったタンパク質を取り込んだり放出したりすることによって、その機能を光や小分子によって操作する技術を開発した。本研究で開発したタンパク質操作システムは、標的のタンパク質の構造情報を必要とせず、用意に設計が可能である。また、原理上さまざまな可溶性タンパク質に応用することが可能であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で、タンパク質の機能を自在に操作することができれば、iPS細胞の効率的分化やCAR-T細胞などの細胞治療分野に貢献する技術になる。細胞内はさまざまな分子が存在し、非常に複雑な環境である。その中で、狙ったタンパク質の機能を操作することは非常に困難であるが、本研究では、それを簡単にさまざまなタンパク質へと応用できる方法を生み出した。本研究がさらに発展することで、細胞治療分野の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We constructed synthetic protein condensate systems that can recruit and release protein of interest in cell by adding small molecules or irradiation of visible light. The system is applicable to proteins that are important for cell signaling without any structural information.

研究分野：生体関連化学

キーワード：細胞 オルガネラ 光遺伝学 化学遺伝学 細胞内顆粒 合成生物学

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、細胞内におけるほぼ全ての生命現象に関わっている極めて重要な分子である。これまでの *in vitro* での生化学的・分子生物学的な解析により、個々の蛋白質がどのような反応・相互作用をするかということはかなり精密に分かってきた。一方で、細胞内で蛋白質の機能を調べるためには、その活性を外部から速やかに阻害・活性化し、そのときの細胞や細胞内の分子がどうなるかを観察・解析する事が必要となる。イメージングプローブや顕微鏡技術などの急速な発展により、生理条件下において、細胞内で分子の挙動をリアルタイムに捉えることが可能になってきた。一方で、蛋白質活性を外部から阻害、あるいは活性化し、すなわち『人為的に操作する』技術は、イメージング技術に比べて遅れていた。細胞内蛋白質の操作技術は合成小分子によって操作する化学遺伝学ツールと、光照射によって操作する光遺伝学ツールが主なものとして挙げられる。現状の蛋白質活性制御技術では、狙った蛋白質に遺伝子工学的に蛋白質ドメインを融合し、これらが合成小分子や光によって構造変化することにより機能する。これを設計するためには蛋白質の立体構造情報が必要である。また、蛋白質は種類ごとに構造・機能が大きく異なることから、仮に構造情報があっても、機能を調べたい蛋白質ごとに1から分子を設計し、作り上げることが必要となり、これが大きな時間的・経済的バリアとなっている。したがって、構造的・機能的に異なるさまざまな蛋白質に対して適用可能で、なおかつ可逆性を持った操作ツールを開発することができれば、生命科学に大きな技術革新を起こす事ができると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内に人工的な場を作り出し、その内部への蛋白質の取り込み、および放出を合成小分子の添加・洗浄や光照射によって可逆的に制御するシステムを構築する。外部から隔絶された人工オルガネラに蛋白質を取り込めば、相互作用や酵素反応の相手から強制的に引き離す事ができる。また内部に取り込んでいた蛋白質を放出すれば活性化することができると考えられる。これにより、構造等にかかわらず、任意の可溶性蛋白質に適用可能な“高汎用性”かつ“可逆的な”活性制御ツールの開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究を実現するためには、人工オルガネラ形成ドメインの探索および、タンパク質取り込み・放出システムの開発が必要となる。まず人工オルガネラ形成ドメインとして、オリゴマー形成ドメインや天然変性ドメインをタンデムに連結したものを用意し、細胞内で顆粒状の構造を形成するかを蛍光顕微鏡によって観察し、スクリーニングした。タンパク質取り込み・放出システムとしては化学誘導型二量体形成や光誘導型二量体形成および、化学誘導型二量体解消システム、光誘導型二量体解消システムをそれぞれ導入し、検討を行った。

4. 研究成果

(1) 化学誘導型細胞内タンパク質放出システムの開発

人工オルガネラ形成ドメインとして、Azami-Green、p62 タンパク質の PB1 ドメインをリンカーを介して結合させたタンパク質を作製した。このキメラタンパク質は HeLa 細胞内で顆粒状の構造を形成することが共焦点レーザー顕微鏡での観察によって明らかとなった。さらにこの人工オルガネラ形成ドメインに C 型肝炎ウイルス由来のプロテアーゼ HCV-NS3 を結合させた。このキメラタンパク質は同様に細胞内で顆粒状の構造(NS3 顆粒)を形成した。NS3 の阻害ペプチドを結合したタンパク質(ipep-protein)を細胞内に発現させると、NS3 顆粒と共局在し、取り込まれることが明らかとなった。さらに、NS3 の阻害剤である Asnaprevir や Danoprevir を添加すると ipep-protein は速やかにサイトゾルへと放出されることが明らかとなった。Asnaprevir は経口投与が可能な薬剤であり、今後このタンパク質放出システムの動物個体内での応用を検討していく予定である。

(2) 光誘導型細胞内タンパク質放出システムの開発

人工オルガネラ形成ドメインとして、Monti-red、PB1 ドメインをリンカーを介して結合させたタンパク質を作製した。このキメラタンパク質は HeLa 細胞内で顆粒状の構造を形成すること共焦点レーザー顕微鏡観察によって明らかとなった。さらにこの人工オルガネラ形成ドメインに AsLOV2 を結合させた。このキメラタンパク質は同様に細胞内で顆粒状の構造(LOV2 顆粒)を形成した。また、Zdk1 ドメインを結合したタンパク質(Zdk-iRFP)を細胞内にコトランスフェクションすることによって共発現させると、LOV2 顆粒と共局在し、取り込まれることが明らかとなった。この状態に光照射をすると、Zdk1 を融合したタンパク質が放出されることが蛍光タンパク質を用いたモデル実験によって観察された。さらに Zdk1 に Vav2 を結合させたタンパク質を

用いた場合には、光照射によって細胞の運動が惹起されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Masaru, Yoshii Tatsuyuki, Ikuta Masahiro, Tsukiji Shinya	4. 巻 143
2. 論文標題 Synthetic Protein Condensates That Inducibly Recruit and Release Protein Activity in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 6434 ~ 6446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c12375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaru Yoshikawa, Masahiro Ikuta, Tatsuyuki Yoshii, Shinya Tsukiji
2. 発表標題 Chemogenetic control of protein activity in living cells using synthetic protein-assembled clusters
3. 学会等名 Resonance Bio International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 細胞内分子操作のための人工相分離タンパク質クラスターの創製
3. 学会等名 第4回LLPS研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 人工オルガネラと化合物を用いて細胞内分子を操る（1）：シグナル不活性化システム
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 生田雅裕、吉川優、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 人工オルガネラと化合物を用いて細胞内分子を操る(2): シグナル活性化システム
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 化合物によるタンパク質の隔離と放出が可能なシンセティックオルガネラの生細胞内構築
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 吉井達之、吉川優、生田雅裕、築地真也
2. 発表標題 人工メンブレンレスオルガネラによる細胞内タンパク質機能制御
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 シンセティックオルガネラを用いたシグナル分子の化合物操作
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 細胞内シグナル分子操作のための人工オルガネラシステム
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 化合物によるタンパク質の隔離と放出が可能なシンセティックオルガネラの生細胞内構築
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 吉川優、生田雅裕、波多野結香、吉井達之、築地真也
2. 発表標題 合成タンパク質コンデンセートによる細胞内分子操作
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

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