

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05702

研究課題名（和文）環状リガンドの配座制御を基盤としたタンパク質局在の光制御法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for optical control of protein localization based on conformational control of cyclic ligands

研究代表者

小和田 俊行（Kowada, Toshiyuki）

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：40584397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内タンパク質局在の光制御法の確立を目指し、タンパク質タグに対する光応答性環状リガンドの合成に取り組んだ。併せて、2種類のタンパク質タグを照射依存的に会合・解離させることが可能なフォトクロミックタンパク質二量化剤を開発した。この二量化剤を用いて生細胞内のタンパク質局在の光制御を達成するとともに、ミトファジー誘導の光制御へと展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で多くのタンパク質は特定のタイミングで局在を変化させ、その機能を発現している。したがって、細胞内タンパク質の局在制御法は複雑な生命機序を理解する上で強力な基盤技術である。しかし、既存の光操作技術である光遺伝学（オプトジェネティクス）やケージド化合物を用いた化学的タンパク質二量化法では、二量体形成の光可逆性などに課題が残されていた。本研究で開発したフォトクロミックタンパク質二量化剤を用いることで、細胞内タンパク質局在の迅速かつ可逆的な光制御、ならびに細胞内シグナル伝達の活性化を達成した。本手法はタンパク質機能の解明に有用であり、今後、疾患の分子機構理解へと繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：To establish a method for photocontrol of intracellular protein localization, we attempted to synthesize photoresponsive cyclic ligands for protein tags. In addition, we developed a photochromic protein dimerizer that can induce association and dissociation of two types of protein tags in a light-irradiation-dependent manner. Using this dimerizer, we achieved optical control of protein localization in living cells and also applied this system in photoregulation of mitophagy induction.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光応答性分子 タンパク質二量化 フォトクロミック 蛍光イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内で多くのタンパク質は特定のタイミングで局在を変化させ、その機能を発現している。例えば前立腺がんに関連するアンドロゲン受容体は、リガンドが結合すると核内に移行して転写因子として機能する。一方で、細胞膜内葉に移行して Src キナーゼと相互作用すると下流のシグナル伝達経路を活性化する。つまり、同一のタンパク質であっても細胞内局在に依存して異なる機能を発現する。したがって、特定のタンパク質の細胞内局在を人為的に操作することができれば、複雑な生命機序を理解する上で強力な基盤技術となる。

細胞内タンパク質局在の操作技術として、光受容タンパク質 (CRY2 など) を用いた光遺伝学 (オプトジェネティクス) がある。このシステムでは、光照射依存的に二量体を形成する光受容タンパク質の 2 つのドメインを標的タンパク質に融合発現させることで、標的タンパク質間の相互作用を光制御可能である。現在までに本手法を用いて、様々な生体機能 (転写活性化・タンパク質分解など) の光制御が達成されている。しかし、二量体の熱的解離の進行や、それを防ぐための連続光照射、ならびに光受容タンパク質のドメインが比較的大きいことによる標的タンパク質の機能阻害、などが課題として残されている。

一方で、有機小分子を利用したタンパク質二量体化の光制御法の開発も進められている。しかし現状では、光解離性保護基 (ケージド基) を有するタンパク質二量化剤によるタンパク質間相互作用の制御のみが達成されており、光刺激に対して繰り返し応答可能なシステムの構築が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質タグに対する光応答性小分子リガンドならびに二量化剤を開発し、細胞内タンパク質局在の光可逆的制御法を確立する。さらに、タンパク質局在の変化をきっかけとする細胞内シグナル伝達の光活性化法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、フォトクロミック分子であるアゾベンゼンの構造をタンパク質タグのリガンド構造に組み込むことで、タンパク質タグ間の二量体形成・解離を可逆的に光制御可能な技術を開発する。

#### (1) 光応答性環状リガンドの開発

アゾベンゼンの光異性化を利用して異性体間の立体配座を大きく変化させることで、タンパク質タグに対する結合親和性を異性体間で大きく変化させることができる。特に、大環状構造を用いることで取りうる立体配座が制限されるため、片方の異性体のみが結合可能なリガンドを創出できると期待した。天然物マクロライドと強く結合することが知られているタンパク質を標的タンパク質として選択し、構造を単純化したアゾベンゼン含有環状リガンドを開発する。

#### (2) フォトクロミックタンパク質二量化剤の開発と細胞内タンパク質局在の光制御

タンパク質タグに対するフォトクロミックリガンドと、共有結合性タンパク質タグ (HaloTag) のリガンドとを連結したフォトクロミックタンパク質二量化剤を開発する。

HeLa 細胞の細胞質にフォトクロミックリガンドと結合するタンパク質タグを発現させ、同時に HaloTag を細胞膜内葉・小胞体外膜・ミトコンドリア外膜・核に発現させる。細胞をフォトクロミック二量化剤で処理した後に、蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察を行う。観察中に光照射することでタンパク質タグの局在が細胞質から HaloTag が発現している細胞区画へと変化する様子を観察する。

#### (3) 細胞内シグナル伝達の光制御

標的とする細胞内シグナル伝達として、PINK1/Parkin 介在性のマイトファジーを選択した。細胞質にキナーゼである PINK1 とタンパク質タグの融合タンパク質を発現させ、ミトコンドリア外膜上へと光照射依存的に移行させることでマイトファジーの光誘導法を確立する。

### 4. 研究成果

#### (1) 光応答性環状リガンドの開発

天然物マクロライドと強く結合することが知られているタンパク質タグに対して、構造を簡素化した光応答性環状リガンドを開発するために、総工程数 10 段階の合成経路を立案した。設計した合成経路に従い、残り 5 段階で目的物が得られる中間体の合成を達成した。

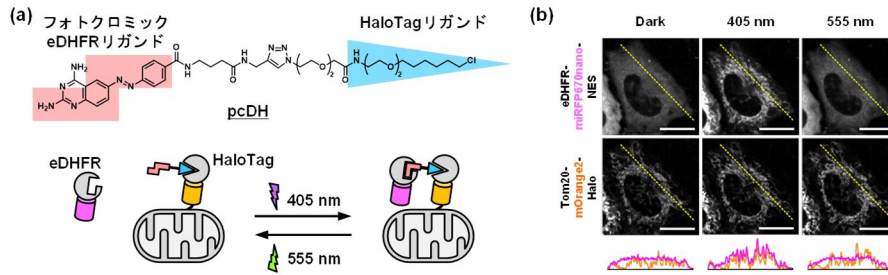


図 1 .(a) フォトクロミックタンパク質二量化剤 pcDH の構造と細胞内タンパク質局在の光制御の模式図 .(b) pcDH を用いた生細胞内タンパク質局在の光制御 .eDHFR 融合タンパク質が紫色光 (405 nm) と緑色光 (555 nm) の照射により細胞質 - ミトコンドリア間を可逆的に移行する様子の共焦点蛍光顕微鏡画像 .

( 2 ) フォトクロミックタンパク質二量化剤の開発と細胞内タンパク質局在の光制御

光応答性環状リガンドの開発と並行して、細胞内タンパク質局在の光制御法の構築に取り組んだ。具体的には、タンパク質タグとして汎用されている大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) と共有結合性タンパク質タグ (HaloTag) とのヘテロ二量化を光制御可能なフォトクロミックタンパク質二量化剤 pcDH を開発した (図 1a)。pcDH は我々が独自に開発した eDHFR に対するフォトクロミック阻害剤 azoMTX の誘導体と HaloTag リガンドとを連結した分子である。azoMTX 誘導体はアゾベンゼン構造を有しており、紫色光照射によりトランス体からシス体へ、緑色光照射によりシス体からトランス体へと異性化する。この光異性化に伴う構造変化により eDHFR に対する結合親和性を大きく変化させることが可能である。

HeLa 細胞の細胞質に eDHFR を近赤外蛍光タンパク質 (miRFP670nano) との融合タンパク質として発現させるとともに、細胞膜内葉や小胞体外膜、ミトコンドリア外膜に HaloTag を橙色蛍光タンパク質 (mOrange2) との融合タンパク質として発現させた。この細胞に対して pcDH を添加した後共焦点蛍光顕微鏡観察を行い、観察中に pcDH の異性化を誘起する光を照射した。期待通り、紫色光を照射することで eDHFR が HaloTag の局在する区画へと移行する様子が観察され、続く緑色光照射によって eDHFR は再び細胞質全体に拡散した (図 1b)。ミトコンドリア外膜上に HaloTag 融合タンパク質を発現させた系において、eDHFR と HaloTag の会合・解離の速度を算出したところ、半減期はいずれの反応においても 1 秒未満であり、既存のオプトジェネティクス技術と比較しても同等かそれ以上の早い応答を示すことが分かった。

( 3 ) 細胞内シグナル伝達の光制御

pcDH を用いた細胞内タンパク質局在制御の可逆性・迅速性は細胞内シグナル伝達の制御に有効であると考え、マイトファジーの光制御法の確立に取り組んだ。マイトファジーはミトコンドリアの品質管理を担っている選択的オートファジーの一種であり、神経変性疾患やがん、発生に関与している。PINK1/Parkin 介在性マイトファジーの初期過程では、損傷により膜電位を消失したミトコンドリア上にキナーゼ (PINK1) が集積する。その後、E3 リガーゼである Parkin がミトコンドリア上へと動員され、Parkin によるミトコンドリア上タンパク質のコピキチン化が進行することでファゴソームの形成が起こる。そこで、pcDH を用いて PINK1 を細胞質からミトコンドリア上へと移行させることでマイトファジーを誘導できるのではないかと考えた (図 2a)。

HeLa 細胞の細胞質に PINK1 と eDHFR の融合タンパク質、ミトコンドリア外膜上に HaloTag をそれぞれ発現させた。また、HeLa 細胞には内在性の Parkin が存在しない、もしくは非常に発現量が低いため、トランスフェクションにより近赤外蛍光タンパク質との融合タンパク質 (miRFP670nano-Parkin) として一過的に発現させた。pcDH を処理した細胞に対して紫色光を照射することで、PINK1 のミトコンドリア外膜上への速やかな移行、それに続く

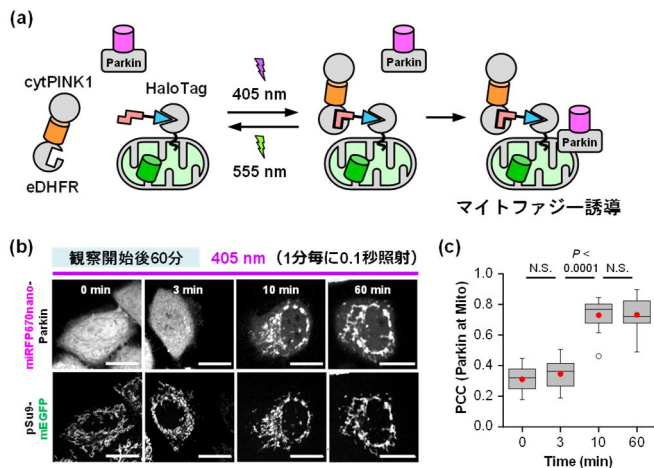


図 2 .(a) pcDH を用いたマイトファジーの光制御の模式図 .(b) PINK1 のミトコンドリア上係留時間を変えた際の Parkin の局在変化の共焦点蛍光顕微鏡画像 .(c) ミトコンドリア上への Parkin の移行の定量評価 .PCC: ピアソン相関係数 .

Parkin の動員が観察された。さらに、PINK1 をある一定時間後に細胞質に拡散させると、ミトコンドリアのファジー進行が顕著に誘導されないことが明らかとなった (図 2b,c)。おそらく、脱ユビキチン化酵素による恒常性維持システムが機能しているためであると考えられる。

本研究では、細胞内タンパク質局在を操作するためのフォトクロミックタンパク質二量化剤の開発、ならびに細胞内シグナル伝達を任意のタイミングで活性化する手法の開発を達成した。本手法はタンパク質機能の解明に有用であり、今後、疾患の分子機構理解へと繋がると期待される。引き続き光応答性環状リガンドの開発を進めることで、より汎用性の高い光操作技術の構築を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Rong, Kowada Toshiyuki, Du Yuyin, Amagai Yuta, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 7
2. 論文標題 Organelle-Level Labile Zn <sup>2+</sup> Mapping Based on Targetable Fluorescent Sensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 748 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.1c02153	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 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 11378 ~ 11383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016684	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 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Liu Rong, Mizukami Shin	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for synthesis and use of a turn-on fluorescent probe for quantifying labile Zn <sup>2+</sup> in the Golgi apparatus in live cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100395 ~ 100395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Watanabe Tomomi, Amagai Yuta, Liu Rong, Yamada Momo, Takahashi Hiroto, Matsui Toshitaka, Inaba Kenji, Mizukami Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Quantitative Imaging of Labile Zn <sup>2+</sup> in the Golgi Apparatus Using a Localizable Small-Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1531.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.09.003	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23件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Himadri Sekhar Sarkar, Takato Mashita, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of a chemical biology tool enabling reversible optical control of protein labeling
3. 学会等名 The 10th Annual Conference Of The International Chemical Biology Society (ICBS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 光可逆的タンパク質ラベル化技術を利用したタンパク質局在の光制御
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ira Novianti, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami
2. 発表標題 Controlling IEDDA Reaction with Macrocyclic Tetrazines
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下 誠、小和田 俊行、伊藤 理紗、松井 敏高、水上 進
2. 発表標題 局在型レシオ蛍光プローブを用いた細胞内局所pHの定量イメージング
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小和田俊行, 劉 熔, 杜 雨音, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞小器官内遊離Zn <sup>2+</sup> の濃度定量と動態観察を可能とする小分子蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天貝佑太, 山田 桃, 渡邊朝美, 小和田俊行, 榎本悟史, 渡部 聡, 経塚淳子, Roberto Sitia, 水上 進, 稲葉謙次
2. 発表標題 初期分泌経路における亜鉛濃度制御が小胞体 ゴルジ体シャペロンERp44の機能をコントロールする
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上 進
2. 発表標題 共有結合型蛋白質ラベル化技術を利用した細胞内蛋白質二量体の光制御
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 Development of fluorescent probes for visualizing Zn <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> dynamics in living cells
3. 学会等名 学術変革領域(A)クロススケール新生物学 第一回領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間下貴斗, 小和田俊行, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 Development of photo-reversible protein labeling system
3. 学会等名 学術変革領域 (A) クロススケール新生物学 第一回領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩下 誠, 小和田俊行, 伊藤理紗, 松井敏高, 水上 進
2. 発表標題 細胞内pH変化のリアルタイムイメージング用蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第21回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yi Ding, Kashfia Ahamed, Toshiyuki Kowada, Norihiko Sasaki, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Development of novel fluorescent probes for detection of extracellular sulfatases
3. 学会等名 第21回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rong Liu, Toshiyuki Kowada, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Quantitative imaging of labile Zn <sup>2+</sup> using organelle-localizable fluorescent probes
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 小和田俊行, 荒井啓介, 吉村彰真, 松井敏高, 菊地和也, 水上進
2. 発表標題 共有結合型蛋白質ラベル化技術を利用した細胞内蛋白質二量化的光制御
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuyin Du, Rong Liu, 小和田俊行, 松井敏高, 門倉 広, 稲葉謙次, 水上 進
2. 発表標題 Visualization and quantification of labile Zn <sup>2+</sup> in the acidic subcellular compartments using a small-molecule fluorescent probe
3. 学会等名 第32回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小和田俊行, 渡邊朝美, 天貝佑太, 劉 熔, 山田 桃, 高橋泰人, 松井敏高, 稲葉謙次, 水上 進
2. 発表標題 細胞小器官局在化蛍光プローブの開発と細胞内遊離亜鉛の定量イメージング
3. 学会等名 第29回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天貝佑太, 山田桃, 渡邊朝美, 小和田俊行, 檜本悟史, 渡部聡, 経塚淳子, Roberto Sitia, 水上進, 稲葉謙次
2. 発表標題 哺乳動物細胞分泌経路における亜鉛調節とタンパク質品質管理
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kashfia Ahamed, Toshiyuki Kowada, Norihiko Sasaki, Shin Mizukami
2. 発表標題 細胞外スルファターゼ活性を検出する蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉熔, 小和田俊行, 松井敏高, 水上進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Cellular Labile Zn <sup>2+</sup> via Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, Himadri S. SARKAR, 高橋 泰人, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 標的タンパク質への親和性を光制御可能なフォトクロミックリガンドの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 熔, 小和田 俊行, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 Quantitative Mapping of Organellar Labile Zn <sup>2+</sup> via the Development of Hybrid Fluorescent Probes
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間下 貴斗, 小和田 俊行, SARKAR S. Himadri, 高橋 泰人, 松井 敏高, 水上 進
2. 発表標題 光可逆的な蛋白質ラベル化を可能とするリガンドの開発
3. 学会等名 第31回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ira Novianti, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami
2. 発表標題 Subcellular Labeling Performances of Tetrazine-trans-Cyclooctene Cycloadditions and Their Products
3. 学会等名 第20回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Himadri Sekhar Sarkar, Takato Mashita, Toshiyuki Kowada, Ming Ming Yem, Satoshi, Watanabe, Kenji Inaba, Toshitaka Matsui, Shin Mizukami
2. 発表標題 Escherichia coli dihydrofolate reductase-selective photoswitchable inhibitors enabling reversible optical control of protein labeling
3. 学会等名 第20回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Priya Ranjan Sahoo, Toshiyuki Kowada, Shin Mizukami	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 447
3. 書名 Live Cell Imaging (Long-Term Mg <sup>2+</sup> Imaging in Live Cells with a Targetable Fluorescent Probe)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 外部刺激応答性クリック反応技術	発明者 水上進、ノヴィアン ティ イラ、小和田俊 行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/040154	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東北大学多元物質科学研究所 水上研究室  
<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/>

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