

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21250

研究課題名（和文）高汎用的な細胞内タンパク質阻害技術の開発

研究課題名（英文）Development of a versatile chemogenetic protein inactivation method

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内のさまざまなタンパク質を一種類の小分子化合物によって特異的かつ素早く阻害することのできる高汎用的なタンパク質機能阻害技術の開発に取り組んだ。本研究では、自己集合するように設計したタンパク質と化学誘導二量化法を融合することで、小分子に反応して標的タンパク質を急速に取り込むことのできる人工相分離タンパク質コンデンセートシステムを構築した。このシステムは標的タンパク質の取り込みによりそのタンパク質の不活性化を、また放出により活性化を誘導できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細胞内の任意のタンパク質の機能・活性を化合物で自在に制御・阻害する高汎用的な化学遺伝学技術を開発するものである。このような技術は、細胞や疾患のメカニズムの解明のためのツールとして有用であるばかりでなく、再生医療や細胞治療など、細胞機能の人工制御が基盤となるさまざまなバイオメディカル分野への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this work we aimed to develop a new general chemogenetic method for controlling protein activity in living cells. By a modular combination of a tandem fusion of two oligomeric proteins with a chemically induced dimerization tool, we constructed synthetic protein condensates capable of recruiting and/or releasing proteins of interest in living mammalian cells in response to a small molecule. The condensate systems were applicable to control protein activity and cellular processes such as membrane ruffling and ERK signaling in a time scale of minutes.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質阻害 相分離 タンパク質コンデンセート ケモジェネティクス オプトジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化合物を用いて細胞内の望みのタンパク質の機能を特異的かつ素早く制御・阻害する技術は、生命現象の解明や創薬研究における重要な基盤技術となる。標的タンパク質に対する小分子阻害剤を用いるのが理想的であるが、阻害剤の開発は今なお難しく、阻害剤のないタンパク質の方が圧倒的に多い。そのため、生命研究の対象となる膨大な種類のタンパク質のそれぞれに対して阻害剤を獲得することは(現時点では)不可能に近い。さまざまな任意のタンパク質の機能阻害を実現できる汎用的な化学的手法を開発することができれば、生命科学や創薬研究にブレイクスルーをもたらすものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内のさまざまなタンパク質を一種類の小分子化合物によって特異的かつ素早く阻害することのできる高汎用的なタンパク質機能阻害技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

タンパク質はその種類によって、構造、機能、機能発現機構がそれぞれ異なる。そのため、さまざまなタンパク質を阻害できる汎用的な技術を開発するためには、タンパク質の種類に依存しない普遍的な阻害原理が必要となる。そこで本研究では、独自の戦略として、“細胞内の標的タンパク質を人工オルガネラ内に封じ込める”というアプローチを提案する。

近年、細胞はタンパク質やRNAなどの生体分子を自己集合・相分離させることで液滴やゲル状のドロップレットをつくり、そのドロップレットを“場”(非膜オルガネラ)として、さまざまな生命現象を制御していることが明らかとなってきた。特に興味深い点として、ドロップレットはその内部に特定のタンパク質を取り込むことで、その活性を抑制することが知られている。したがって、もし細胞内に完全人工のオルガネラを構築し、その内部に任意の標的タンパク質を特異的に取り込むことができれば、そのタンパク質は周囲から隔離されることで不活性状態になるものと期待される。また逆に、タンパク質を人工オルガネラから細胞質へ放出すれば、本来の機能を発現するようになる(活性状態になる)ものと期待される。このような隔離と放出に基づいた原理であれば、タンパク質の種類や構造を問わず、さまざまなタンパク質の活性を簡便かつ高汎用的に制御できるかも知れない。本研究ではこのアイデアの概念実証を目指して研究を進めた。

4. 研究成果

本研究ではまず、小分子に応答して特定の標的タンパク質を取り込むことのできる人工オルガネラシステムの開発に取り組んだ。小分子応答能を有する人工オルガネラを構築する設計戦略として、ホモオリゴマーを形成するPB1ドメインと四量体を形成する緑色蛍光タンパク質AzamiGreen (AG)、そしてタンパク質FRBをタンデムに連結した融合タンパク質(PB1-AG-FRB)を設計した。これをヒト由来の細胞に発現させると、PB1ドメインとAGを介した多点相互作用により相分離し、FRBを内包したゲル状の人工オルガネラを細胞内に構築することができた。一方、活性を制御したい標的タンパク質にはタンパク質FKBPをタグとして融合し、これを同じ細胞に共発現させた。FKBPとFRBは、小分子ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体を形成する。したがって、初期状態では、標的タンパク質は細胞質を一様に拡散していたが、そこへラパマイシンを添加すると、FKBPとFRBの二量化によって標的タンパク質を人工オルガネラ内に急速に(1分以内に)取り込むことが可能であった。このシステムをさまざまなタンパク質に適用したところ、およそ120kDaの分子量をもつ巨大タンパク質でも90%以上の効率で人工オルガネラ内に取り込むことが可能であった。このことは本システムの高い汎用性を示している。

さらに本研究では、上記のシステムを拡張することで、任意のタンパク質をあらかじめ人工オルガネラ内に隔離しておき、それを小分子の添加によって素早く細胞質へ放出して活性化することのできるシステムを創製した。本システムでは、標的タンパク質を人工オルガネラの構成因

子である PB1-AG-FRB の C 末端に TEV プロテアーゼの切断配列 (ENLYFQ/L) を介して融合する。これを PB 1-AG および、FKBP を融合した TEV プロテアーゼ (FKBP-TEVp) と共に細胞に発現させる。すると、標的タンパク質は人工オルガネラ内に封入された状態で発現し、FKBP-TEVp は細胞質を拡散した状態となる。そこへラパマイシンを添加すると、FKBP-TEVp が人工オルガネラ内に取り込まれる。すると、FKBP-TEVp が近接効果によって TEV プロテアーゼ切断配列を効率よく切断し、標的タンパク質が人工オルガネラから細胞質へ放出される仕組みとなっている。このシステムを用いると、小分子ラパマイシン添加後 10~20 分のうちに標的タンパク質の細胞質濃度を 3~10 倍増加させることが可能であった。

これらの化学遺伝学システムでは、標的タンパク質の人工オルガネラへの取り込み (隔離) によって不活性化を、放出によって活性化を誘導することができ、実際に、細胞運動や情報伝達に関与するシグナルタンパク質の活性を小分子の添加や光照射によって分オーダーで制御できることが実証された。一連の成果は JACS 誌に掲載された。

タンパク質を人工オルガネラに隔離することで不活性化するという戦略は、さまざまな細胞内タンパク質の活性制御に適用できる汎用的な原理になるものと考えられる。本成果は、これまで有効な制御法がなかったタンパク質の活性制御へ向けた新しい方法論を提供するものであり、生命研究や合成生物学に大きく貢献することが期待される。また本成果は、人工設計タンパク質の自己集合・相分離を利用することで、生きた細胞内に機能性人工タンパク質コンデンセートを構築できることを示す先駆的な例であり、今後、さまざまな生命現象や細胞機能を操作する新しい人工オルガネラシステムやソフトマテリアルの開発につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 吉川優, 吉井達之, 築地真也	4. 巻 98(5)
2. 論文標題 生命現象の操作と可視化のための細胞内人工相分離ツール	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 246-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 築地真也	4. 巻
2. 論文標題 生細胞内に人工ドロブレットをつくる：合成相分離生物学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 現代化学増刊「相分離生物学の全貌」	6. 最初と最後の頁 220-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Masaru Yoshikawa, Tatsuyuki Yoshii, Masahiro Ikuta†, Shinya Tsukiji	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 -
1. 著者名 築地真也, 吉川優	4. 巻 39(10)
2. 論文標題 細胞内相分離を理解・操作・活用する人工相分離ツール	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学増刊「相分離 メカニズムと疾患」	6. 最初と最後の頁 204-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Masaru Yoshikawa, Shinya Tsukiji	4. 巻 60
2. 論文標題 Modularly built synthetic membraneless organelles enabling targeted protein sequestration and release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3273-3276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00675	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

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 細胞内のタンパク質を隔離・放出する人工相分離コンパートメント
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020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 人工タンパク質クラスターによるシグナル分子の化学遺伝学操作
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020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

1. 発表者名 築地真也
2. 発表標題 人工タンパク質コンデンセートを用いた細胞内タンパク質活性操作
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Tsukiji, Masaru Yoshikawa, Yoko Fukaya, Sachio Suzuki
2. 発表標題 Conditional sequestration and release of protein activity in living cells using synthetic protein condensates
3. 学会等名 Second International Symposium on Chemistry for Multimolecular Crowding Biosystems (CMCB 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深谷陽子、吉川優、鈴木祥央、波多野結香、築地真也
2. 発表標題 標的タンパク質を取り込む小分子誘導型相分離システムの開発
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 築地真也
2. 発表標題 細胞機能を操作する人工相分離ツール
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------