12　細胞内在性シグナル分子の局在制御技術の開発	築地　真也

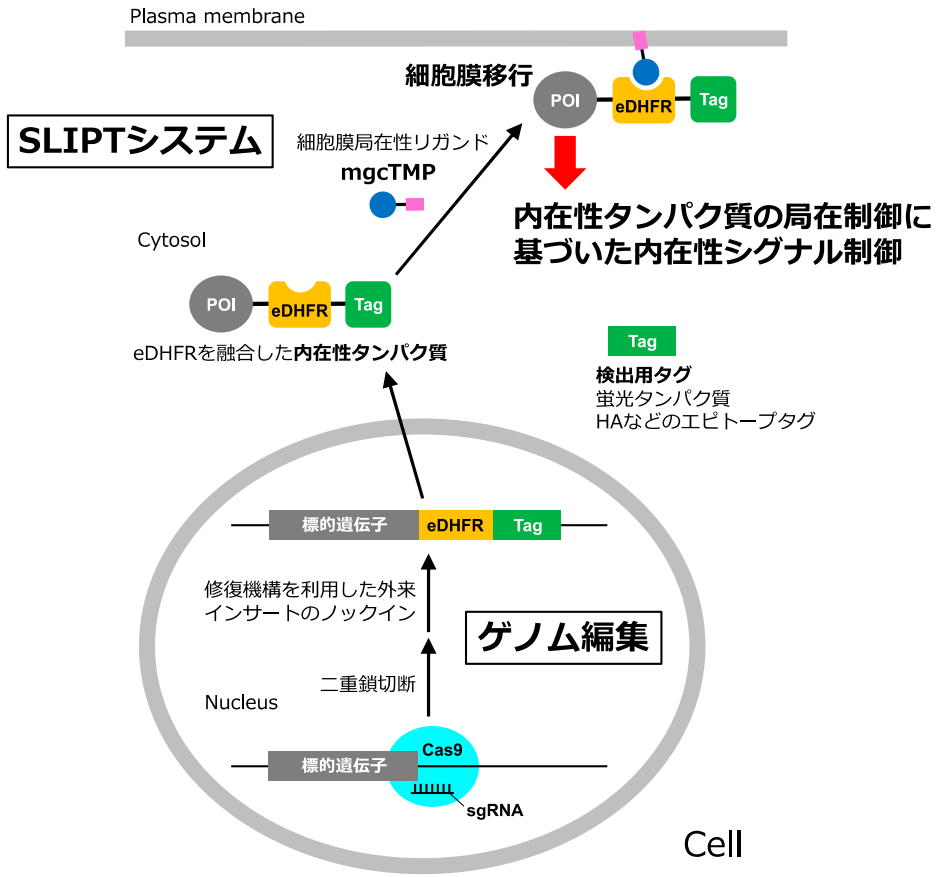
【目的】タンパク質の細胞内局在を人為的に制御する技術は、細胞機能の作用機序解明や人工操作のための強力なツールとなる。これまでに、タンパク質の局在を化合物で制御する幾つかのケミカルツールが開発されてきた。しかし、既存の手法はいずれも、標的タンパク質を改変したものを細胞内に過剰発現させ、その外来発現タンパク質の局在を化合物で動かすものであった。そこで本研究では、細胞内の任意の内在性タンパク質の局在を化合物で制御可能な新しい基盤技術の開発に取り組んだ。

【方法】内在性タンパク質の局在を制御するための基本戦略として、我々が独自に開発した「局在性リガンドによるタンパク質局在移行（SLIPT）システム」と「ゲノム編集」を融合するというアプローチを考えた（下図）。すなわち、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を利用することで、標的とする内在性タンパク質に eDHFR タグをノックインする。そして、eDHFR に対する局在性リガンドを用いることで、eDHFR でタグ付けされた内在性タンパク質の細胞膜移行を誘導する。このような技術は、さまざまな内在性シグナル分子の局在を制御する汎用的な基盤技術になるものと期待される。

【結果】内在性シグナル分子の局在制御技術の開発を目指し、本研究では、以下の要素技術を確立することに成功した。1. 細胞膜インナーリーフレットへの安定な局在移行を実現する新しい局在性リガンドの開発。2. 標的タンパク質のさまざまな部位に融合でき、汎用的な細胞膜移行を実現する改変型 eDHFR タグの創製。3. 標的内在性タンパク質の C 末端に eDHFR タグをノックインするゲノム編集法の確立。

今後は、本研究で得られた要素技術を統合することで、内在性シグナル分子の局在を制御する基盤技術を確立し、内在性のシグナル分子やシグナル経路の人為的操作に立脚した新しい生命研究アプローチを切り拓くことを目指す。

SLIPT とゲノム編集の融合による内在性シグナル分子の局在制御



12. 細胞内在性シグナル分子の局在制御技術の開発

築地　真也

名古屋工業大学 大学院工学研究科 生命・応用化学専攻

Key words：タンパク質局在，内在性タンパク質，局在性リガンド，ゲノム編集，細胞内情報伝達

緒　言

小分子化合物を用いてシグナル分子を制御し、情報伝達や細胞機能を自在に操ることは、薬学やケミカルバイオロジーの重要なゴールの一つである。このような、化合物に基づいた細胞操作技術は、細胞生物学や生命科学の強力な研究ツールとなるばかりでなく、創薬、細胞工学、再生医療など、細胞・個体機能の人工制御を目指したメディカル分野への応用にも直結する。

シグナル分子を小分子化合物で制御するという概念は、薬理学として古くから認識されてきた。生理活性化合物の探索・開発は現在も盛んに進められており、特定のシグナル分子（タンパク質）の機能を制御する化合物がこれまでに多数見出されてきた。しかし、従来の化合物開発では、阻害剤が中心となっている。細胞機能の自在な制御を考えた場合、シグナル分子の機能を抑える化合物だけでなく、細胞内で進行するさまざまな情報伝達プロセスを選択的に誘導・活性化する化合物技術も重要である。例えば、タンパク質のリン酸化、活性化、セカンドメッセンジャーの産生など、情報伝達の引き金となる分子イベントを化合物で引き起こす技術を確立しなくてはならない。しかし、細胞内のシグナル分子やシグナル経路を化合物で人為的に活性化する手法というのはまだ極めて限られている。

シグナル分子を活性化するための戦略として、タンパク質の細胞内局在を化合物で制御する（局在移行を誘導する）というアプローチは極めて有効である。情報伝達の過程では、多くのタンパク質が局在場所を変え、その移行先で下流分子を活性化する。遺伝子発現、細胞運動、メンブレントラッフィキングをはじめ、あらゆる生命現象にタンパク質の局在移行が関与しており、タンパク質の局在を変える技術は、非常に多くのシグナル分子やシグナル経路の活性化を実現できる。このような背景のもと、これまでに、タンパク質の局在を化合物で制御する幾つかのケミカルツールが開発されてきた［1］。しかし、既存の手法はいずれも、標的タンパク質を改変したものを細胞内に過剰発現させ、その外来発現タンパク質の局在を化合物で動かすものであった。これらの手法はたしかに有用であるが、内在性のシグナル分子の局在制御には利用できない。内在性タンパク質の局在を制御することが可能になれば、生命現象に関与する真の分子そのものを操り、その機能を解明・制御する新しい強力な生命研究ツールになるものと期待される。そこで本研究では、細胞内の任意の内在性タンパク質の局在を化合物で制御可能な新しい基盤技術を開発することを目指した。

方法および結果

1.　基本戦略

我々はこれまでに、「局在性リガンド（SLL）」という独自の化合物を用いたタンパク質の局在制御技術を考案・開発した［2］。その概念図を図 1a に示す。本手法は、標的タンパク質の局在を化合物（局在性リガンド）一つで変えることのできる技術であり、「SLIPT（SLL-induced protein translocation）」と呼んでいる。特に我々は、細胞内情報伝達の主要な場である細胞膜インナーリーフレット（以降、単に細胞膜と省略する場合がある）に焦点を当て、標的タンパク質を細胞膜に特異的に移行可能な SLIPT システムを構築することに成功した（論文投稿中）。本システム（図 1b）では、N 末端にリジン残基の 6 回繰り返し配列を融合した大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（K6-eDHFR）を標的タンパク質に融合し、それを細胞質に発現させる。そして、局在性リガンド mgcTMP を任意のタイミングで培養液に添加することで、K6-eDHFR 融合タンパク質を細胞質から細胞膜へ分オーダーで移行させることができる。これまでに、

過剰発現系において、本システムがさまざまな細胞内シグナル分子やシグナル経路の活性化に利用できることを確認した。そこで本研究では、内在性シグナルタンパク質の局在制御を目指し、この SLIPT システムとゲノム編集技術を融合することを考えた。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、標的とする内在性シグナルタンパク質に eDHFR をノックインし、そのタグ付き内在性タンパク質の細胞膜移行を自在に誘導可能な新しい SLIPT 基盤技術を確立することを目指した。

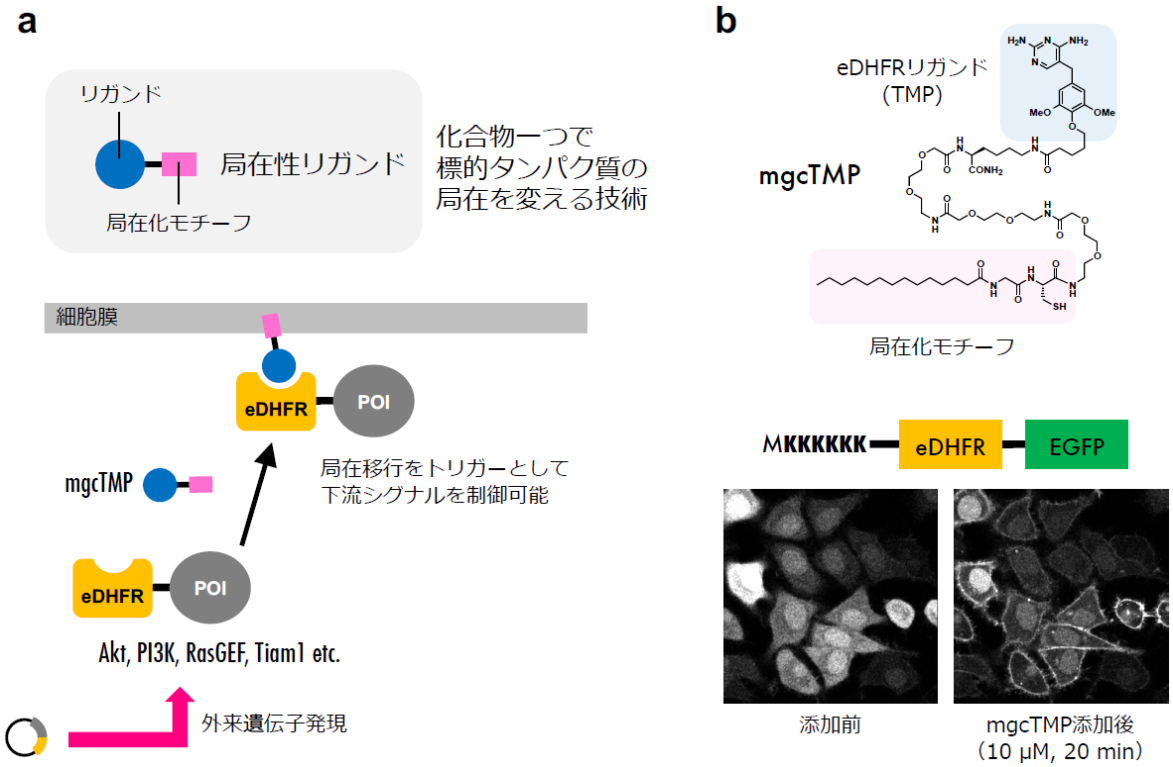


図 1. 局在性リガンドと SLIPT システム

a) 局在性リガンドの基本設計と SLIPT の原理図。局在性リガンドは、標的タンパク質に結合する小分子リガンドに細胞内自己局在化能（局在化モチーフ）を付与した合成化合物である。これを用いることで、細胞内の標的タンパク質を局在性リガンドの指定する場所へ移行させることができる。図では、eDHFR を融合したタンパク質を mgcTMP によって細胞膜インナーリーフレットへ移行するシステムの概念図を示す。標的タンパク質として Akt や PI3K などを融合すると、細胞膜への局在移行をトリガーとしてそれらのシグナルタンパク質が制御する下流シグナルを人為的に活性化することができる。

b) 最近開発した細胞膜特異的 SLIPT システム。(上) 局在性リガンド mgcTMP の分子構造。(下) mgcTMP による K6-eDHFR-EGFP の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。本システムでは、N 末端に K6 配列を付加した eDHFR を標的タンパク質に融合することで、mgcTMP の添加によってそのタンパク質を細胞膜に特異的に移行させることができる。

2. 細胞膜インナーリーフレットへの安定で可逆的な局在移行が可能な SLIPT システムの構築

我々は最近になり、mgcTMP と K6-eDHFR のペアからなる SLIPT システム（図 1b）では、細胞膜移行が持続しないということを見出した。つまり、上述のシステムでは、標的タンパク質を 20 分程度は細胞膜へ移行させられるものの、その後、そのタンパク質が 1 時間程度で自発的に（細胞の洗浄操作などは行っていないにも関わらず）完全に細胞質に戻ってしまう（図 2a）。この局在解消のメカニズムを解析した結果、細胞内のプロテアーゼによって mgcTMP が分解を受けることが明らかとなった。そこで、局在性リガンドの分子設計を改良し、細胞内プロテアーゼによる分解を受けない m^{D}cTMP を開発した（図 2b）。この m^{D}cTMP は、K6-eDHFR 融合タンパク質を（先の mgcTMP と同様に）細胞膜特異的に移行させることができる。さらに、その局在は長時間持続することが確認された（図 2c）。また、フリーの TMP を添加することで、その局在を望みのタイミングで細胞質に戻せることも実証した。

今回開発したプロテアーゼ耐性型の m^{D}cTMP は、eDHFR 融合タンパク質の細胞膜移行を持続的あるいは可逆的に誘導できるため、内在性シグナル分子の局在制御を実現するための重要な基盤分子になるものと期待される。m^{D}cTMP の開発と応用に関する一連の成果は、すでに特許出願し、現在、論文投稿準備中の段階である。

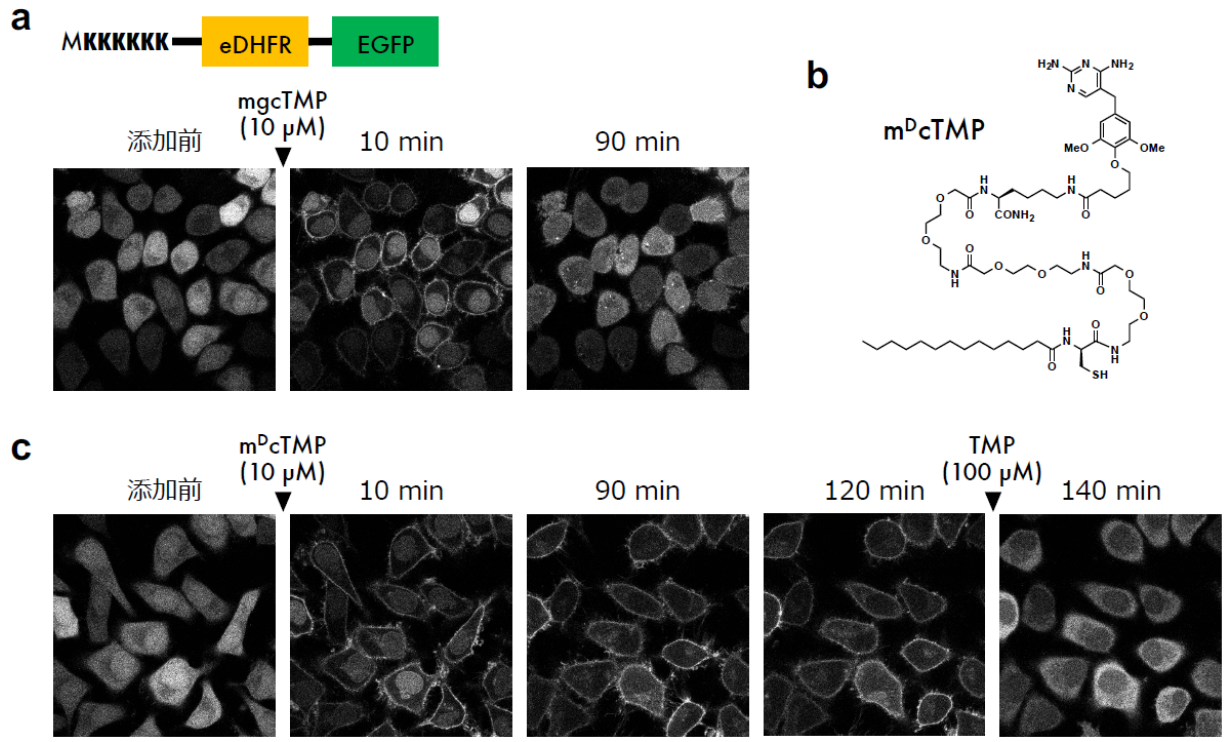


図 2. プロテアーゼ耐性型局在性リガンド m^{D}cTMP

a）オリジナルの局在性リガンド mgcTMP による K6-eDHFR-EGFP の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。mgcTMP による細胞膜移行は持続しない。

b）m^{D}cTMP の分子構造。

c）m^{D}cTMP による K6-eDHFR-EGFP の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。m^{D}cTMP による細胞膜移行は数時間持続し、フリーTMP の添加によってその局在を元に戻すことができる。

3. 標的タンパク質のさまざまな部位に融合可能な汎用的ループ改変 eDHFR の開発

4 で述べるゲノム編集を行うにあたり、K6-eDHFR タグは標的タンパク質の N 末端には導入できるものの、C 末端に導入するとその細胞膜特異性が失われることが明らかとなった（図 3a）。さまざまな内在性シグナル分子の局在制御を実現するためには、標的タンパク質の N 末端だけでなく、C 末端、さらにはドメイン–ドメイン間などにも融合できる汎用的なタグタンパク質が必要である。そこで我々は、汎用的な SLIPT のための新しいタグタンパク質の開発に取り組んだ。

細胞膜インナーリーフレットにはアニオン性脂質が他のオルガネラ膜に比べて多く存在する。K6 配列は、そのようなアニオン性の高い細胞膜インナーリーフレットと静電的に相互作用することで、mᴰcTMP による eDHFR の細胞膜局在を安定化し、細胞膜特異性を高める。そこで、eDHFR の結晶構造を踏まえ、eDHFR のリガンド結合ポケットの近くに存在するループ領域に K6 配列を挿入した eDHFR^{69K6} タグを新たに開発した（図 3b）。EGFP をモデル標的タンパク質として検証したところ、eDHFR^{69K6} は標的タンパク質の N 末端（図 3c）、C 末端（図 3d）のいずれに融合しても細胞膜特異的な局在移行を誘導できることが確認された。また、EGFP と cRaf の間に eDHFR^{69K6} を融合しても細胞膜特異的な局在移行を示し（データ非掲載）、eDHFR^{69K6} はドメイン–ドメイン間にも導入できるという高い汎用性が示された。

今回開発したループ改変型 eDHFR は、タンパク質のさまざまな部位に導入できるため、ゲノム編集と SLIPT を融合した内在性シグナル分子制御のための高汎用的タグタンパク質として極めて有用である。ループ改変型 eDHFR の開発に関する一連の成果については、現在、論文投稿準備中の段階である。

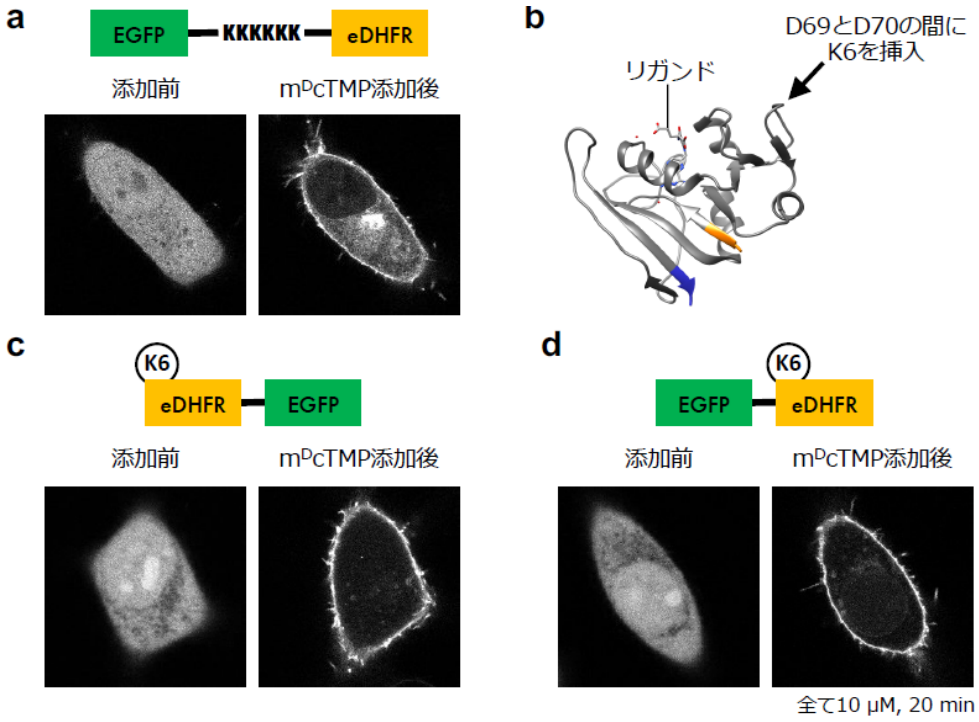


図 3. 汎用的 SLIPT のためのループ改変型 eDHFR タグタンパク質

a）K6-eDHFR を EGFP の C 末端に融合した場合の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。オリジナルの K6-eDHFR は標的タンパク質の C 末端に融合すると細胞膜特異性を失う。

b）eDHFR の結晶構造と K6 配列を挿入したループ領域。

c）eDHFR^{69K6} を EGFP の N 末端に融合した場合の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。

d）eDHFR^{69K6} を EGFP の C 末端に融合した場合の局在移行誘導（共焦点蛍光イメージ）。eDHFR^{69K6} は標的タンパク質の N 末端に融合しても、C 末端に融合しても、細胞膜特異的局在移行を誘導できる。

4. ゲノム編集を用いた標的内在性タンパク質への eDHFR ノックイン技術の確立

Cas9 によるゲノム DNA の部位特異的切断と修復機構を利用することで、標的内在性タンパク質の C 末端に eDHFR タグをノックインする手法を確立した。これまでに、内在性 cRaf の C 末端に eDHFR^{69K6} を融合した細胞株を得ることに成功しており（図 4）、今後このタグ付き内在性 cRaf の局在移行とシグナル制御に取り組む。

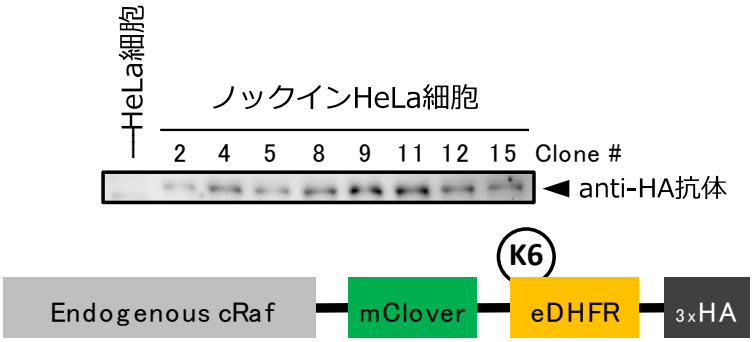


図 4. ゲノム編集による内在性 cRaf への eDHFR(69K6)のノックイン
CRISPR-Cas9 によるゲノム編集（ノックイン）を行った HeLa 細胞クローンのウエスタンブロッティングの結果。mClover-eDHFR^{69K6}-3xHA を C 末端に持つ内在性 cRaf に相当するバンド（125 kDa）が目的とする分子量の位置に検出された。内在性 cRaf へのノックインは genomic PCR からも確認できた（データ非掲載）。

考　察

本研究では、SLIPT とゲノム編集技術を融合することで、細胞内在性シグナル分子の局在を制御する新基盤技術の開発に取り組んだ。本研究ではまず、細胞内で安定な局在移行を誘導可能な新しい局在性リガンド m^{D}cTMP の開発に成功した。これにより、内在性シグナル分子の局在を持続的あるいは可逆的に制御するための基盤システムを構築することができた。また、標的タンパク質の N 末端、C 末端、さらにはドメイン–ドメイン間に融合でき、細胞膜インナーリーフレット特異的な局在移行を実現できる汎用的なループ改変タグタンパク質（eDHFR^{69K6}）を創製することにも成功した。標的タンパク質によっては、N 末端や C 末端への融合によって機能を失うものも多いため、さまざまな部位に融合可能な汎用的タグタンパク質の創製は、内在性シグナル分子の制御技術を確立する上で大変重要な鍵となる。さらに本研究では、Cas9 を用いたゲノム編集技術を利用することで、標的内在性タンパク質にループ改変タグタンパク質をノックインする手法を確立することに成功した。今後は、本研究で得られた要素技術を統合することで、内在性シグナル分子の局在を制御する基盤技術を確立し、内在性のシグナル分子やシグナル経路の人為的操作に立脚した新しい生命研究アプローチを切り拓くことを目指す。

文　献

1) Voβ S, Klewer L, Wu Y.W. Chemically induced dimerization: reversible and spatiotemporal control of protein function in cells. Curr. Opin. Chem. Biol. 2015 Oct; 28: 194-201. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26431673 DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.09.003

2) Ishida M, Watanabe H, Takigawa K, Kurishita Y, Oki C, Nakamura A, Hamachi I, Tsukiji S. Synthetic self-localizing ligands that control the spatial location of proteins in living cells. J. Am. Chem. Soc. 2013 Aug 28; 135(34):12684-12689. Epub 2013 Aug 14. PMID: 23941503 DOI: 10.1021/ja4046907