

スズキ サチオ

氏 名 **鈴木 祥央**

学位の種類 博士 (ナノメディシン科学)

学位記番号 博第1225号

学位授与の日付 2022年3月24日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当 課程博士

学位論文題目 タンパク質局在制御化合物を基盤とした創薬・生命研究ツールの開発
(Development of new chemical biology approaches based on chemogenetic control of protein localization)

論文審査委員 主査 教授 山下 啓司
教授 築地 真也
教授 林 秀敏
(名古屋市立大学)

論文内容の要旨

細胞内タンパク質を操作する技術は、標的タンパク質の機能解明や細胞機能の人工制御、さらには創薬への展開が期待できる。そのようなアプローチの一つとして、標的タンパク質と結合するリガンド (薬剤) により活性を制御することが考えられる。一方、生きた細胞内で期待どおり機能する薬剤の開発は未だ難しい。また、化合物によるインプットと遺伝子工学的手法を融合する手法 (ケモジェネティクス) により標的タンパク質の局在および機能を操る手法がいくつか開発されてきた。しかし、既存の手法には化学量論比の調節や可逆性などの課題が残されている。

本博士論文では、生きた動物細胞内でのタンパク質-薬剤相互作用を簡便に検出するシステムを開発した (第2章)。また、シグナル伝達の起点となる細胞膜へ標的タンパク質を局在移行させてその機能を操作する高汎用的なケモジェネティックアプローチを開発し (第3章)、この手法を内在性タンパク質制御へと展開した (第4章)。

第1章では、小分子化合物を用いた既存の細胞内シグナル制御アプローチを紹介し、小分子やシグナル分子を領域特異的に集積させる技術を開発する意義を述べた。

第2章では、タンパク質-リガンド相互作用を生きた動物細胞内で検出する手法を開発した。対象とするリガンドにゴルジ体膜局在化モチーフを連結した化合物を設計・合成する

ことで、細胞内の標的タンパク質との結合をその局在移行に基づいて局所の蛍光シグナルとして検出することに成功した。本手法は様々なタンパク質-リガンド相互作用の検出に適用できる汎用性・信頼性を有し、タンパク質アイソフォーム間の結合親和性の違いの比較定量や、局在の解消を指標とした各薬剤との結合の強さの比較定量に適用できた。本アッセイは今後、創薬研究の新しい評価系としての利用が期待される。

第3章では、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) とその特異的リガンドであるトリメトプリム (TMP) のペアに基づき、細胞膜を起点とした様々なシグナル伝達プロセスを操作する高汎用的タンパク質局在移行誘導システムを開発した。まず、eDHFR のループ領域を改変した iK6 DHFR を開発した。この iK6 DHFR タグは、細胞膜特異性を損なうことなく、タンパク質の N 末端や C 末端、さらには 2 つのタンパク質やタンパク質ドメイン間に融合させることができた。 iK6 DHFR をタグ付けしたタンパク質は、細胞膜局在性の TMP 誘導体である m^{Dc} TMP の添加により数分で細胞膜に迅速に輸送された。 m^{Dc} TMP/ iK6 DHFR システムは、分子量・サイズや生理機能が異なる様々なシグナル伝達タンパク質の制御に利用することができ、本システムの汎用性を証明した。さらに、競合するリガンド (free TMP) と流路系を組み合わせることで、 m^{Dc} TMP/ iK6 DHFR システムを用いて、シグナル分子の局在と活性を周期的に制御できることを実証した。本成果は、細胞膜が起点となるシグナル伝達の研究において、タンパク質の局在やシグナル伝達プロセスを様々な時間パターンで制御する新基盤技術となることが期待される。

第4章では、ゲノム編集と m^{Dc} TMP/ iK6 DHFR システムを組み合わせることで、細胞内在性タンパク質を操作する新技術を開発した。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を利用することで、内在性の標的タンパク質に対し、第3章で開発した iK6 DHFR タグをノックインする手法を確立することに成功した。これにより、内在性 cRaf の C 末端に iK6 DHFR を融合した細胞株を得た。この細胞に対して m^{Dc} TMP を添加することで、内在性タンパク質の局在および機能を制御することに成功した。本成果は、ゲノム編集と化合物の組み合わせにより、内在性タンパク質の局在と活性を選択的に制御できることを実証した先駆的成果である。

以上の成果は、様々な細胞内タンパク質を操作して解析することのできる高汎用的ツールとしての展開や、細胞のネイティブな生理機能をコントロールする創薬、治療分野への応用が期待される。

論文審査結果の要旨

本論文は、様々な細胞内タンパク質の局在を操作する技術を開発し、標的タンパク質と薬剤の相互作用評価系や細胞内シグナル伝達の時空間的制御ツールとして応用した。本論文は、以下の 5 章より構成されている。

第 1 章では、本研究の背景および本論文の目的、意義、内容に関して述べている。

第 2 章では、動物細胞内タンパク質-リガンド相互作用評価系の開発について述べている。まず、対象とするリガンドにゴルジ体膜局在化モチーフである myristoyl-D-Cysteine を連結した化合物を設計・合成することで、細胞内の標的タンパク質との結合をその局在移行に基づいて局所の蛍光シグナルとして検出することに成功した。次に、本手法の汎用性・信頼性を実証し、タンパク質アイソフォーム間の結合親和性の違いや、各薬剤との結合の強さを比較定量することに適用可能であることを示した。

第 3 章では、細胞膜を標的とした高汎用的タンパク質局在移行誘導システムの開発について述べている。細胞膜特異的な局在移行を誘導するために、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) のループ領域を改変したタンパク質タグである $iK6$ DHFR を開発した。この $iK6$ DHFR タグは、細胞膜特異性を損なうことなく、タンパク質の N 末端や C 末端、さらには 2 つのタンパク質やタンパク質ドメイン間に融合させることが可能であった。 $iK6$ DHFR をタグ付けしたタンパク質は、細胞膜局在性の TMP 誘導体である m^{Dc} TMP の添加により数分で細胞膜に迅速に輸送された。この m^{Dc} TMP/ $iK6$ DHFR システムは、大きさや生理機能が異なる様々なシグナル伝達タンパク質を制御することができ、本システムの汎用性を証明した。さらに、競合するリガンド (free TMP) と流路系を組み合わせることで、 m^{Dc} TMP/ $iK6$ DHFR システムを用いて、シグナル分子の局在と活性を可逆的に繰り返し制御できることを実証した。

第 4 章では、細胞内在性タンパク質を化合物で特異的に操作する基盤技術の開発について述べている。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を利用することで、内在性標的タンパク質の C 末端に対し、第 3 章で開発した $iK6$ DHFR タグをノックインする手法を確立した。これにより得た $iK6$ DHFR ノックイン細胞株に対して m^{Dc} TMP を添加することで、内在性タンパク質の局在および機能を制御することに成功した。また、 m^{Dc} TMP に光応答性を付与することで内在性タンパク質の光制御も可能になることを示した。

第 5 章 (結言) は、総括であり、本研究で明らかとなった成果と展望をまとめている。

以上のように、本論文では、様々な細胞内タンパク質を操作して解析する高汎用的ツールを開発し、リガンド評価系や様々な細胞膜シグナル伝達の時空間的制御へと展開した。本論文の成果は、学術誌 2 編の論文 (すべて審査有) に掲載されており、学術的な価値を有すると判断される。したがって、本論文は博士 (ナノメディシン科学) の学位論文としてふさわしいものと認められる。