

ヨシカワ マサル

氏 名	吉川 優
学 位 の 種 類	博士（ナノメディシン科学）
学 位 記 番 号	博第1226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	細胞制御のための機能性オルガネラの創製 (Construction of synthetic and engineered organelles for cell regulation)

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

タンパク質は細胞内で起こる無数の生化学反応を制御しており、分化や増殖といった多彩な細胞機能はさまざまなタンパク質機能の緻密な連携により実現されている。そのため生細胞内に存在する標的タンパク質の活性を外部から特異的に操作する技術は、タンパク質の機能解明や細胞の人工操作、さらには新たな治療標的の探索において非常に有用な研究ツールになるものと期待される。一方、タンパク質活性操作技術には標的タンパク質に特異的に作用すること、活性の変化が迅速であること、さまざまな種類のタンパク質を標的可能であること、といった特徴が求められる。しかし、既存技術の中にはこれらの要素を全て兼ね備えた手法はほとんどなく、いまだに有効な制御方法のないタンパク質が数多く存在している。そこで本論文では、細胞内に完全人工あるいは半人工的な機能性オルガネラを構築し、これをタンパク質活性制御の「場」として利用することで、高い汎用性を備えた次世代型ケミカルバイオロジーツールを開発することを目指した。

第二章では、細胞内に完全に人工的なメンブレンレスオルガネラを構築し、これが標的タンパク質不活性化のための人工の「場」として利用できることを示した。ホモオリゴマーを形成する PB1、ホモ 4 量体を形成する緑色蛍光タンパク質 AzamiGreen (AG) および FRB を連結することで人工自己集合タンパク質 PB1-AG-FRB を設計し、これを培養細胞

に発現させることで細胞内に FRB を内包した人工オルガネラ (FRBPAC) を構築した。次に、標的タンパク質 (POI) を FKBP と融合して共発現させ、そこに FKBP と FRB の二量化を誘導する化合物ラパマイシンを添加することで、細胞質中の POI を急速に FRBPAC に取り込み可能なことを示した。さらに、Vav2 や SOS といった機能や構造が異なるシグナルタンパク質を POI とした結果、同じ分子設計のままラパマイシン応答的な取り込みが起こり、それぞれ細胞運動と Ras/ERK シグナルの不活性化が誘導されることを実証した。以上より、本研究で開発したタンパク質取り込みシステム (SPREC-In) が POI の種類を選ばず、その機能を迅速かつ特異的に不活性化できる手法となり得ることを示した。

第三章では、第二章の SPREC-In システムの分子設計を拡張することで、人工オルガネラ内の POI を細胞質中に放出することで活性を回復させるシステム (SPREC-Out) を開発した。PB1-AG-FRB と POI を TEV プロテアーゼ (TEVp) により切断可能なアミノ酸配列 (ENLYFQL) で連結して発現させることで、細胞内に POI を内包した人工オルガネラ (POIPAC) を構築した。続いて、FKBP を融合した TEVp を細胞に共発現させ、そこにラパマイシンを添加することで、TEVcs の切断を誘導して POI の細胞質に放出可能であることを示した。また、SPREC-Out を用いて Vav2 および SOS を細胞質中に放出することで、それぞれ細胞運動および Ras/ERK シグナルの活性化を誘導できることを実証した。さらに、光照射に応答して可逆的に解離するタンパク質ペアを放出システムに分子設計にモジュール的に置換することで、光応答性のタンパク質可逆放出システム (optoSPREC) を設計し、これを用いて Vav2 の可逆放出を行うことで、細胞運動活性の ON/OFF を繰り返し誘導することに成功した。これらの結果から、人工オルガネラからのタンパク質放出がさまざまな標的タンパク質機能の活性化に有用な戦略となり得ることを実証した。

第四章では、オルガネラ膜同士の近接現象であるメンブレンコンタクト (以下コンタクト) を可逆的に人工制御する手法を開発した。まず、小胞体 (ER) と細胞膜 (PM) のコンタクトが ER 局在性タンパク質 ORP5 の PM 結合により誘導されることに着目し、これを所属研究室で以前開発された、合成リガンド (paITMP) による標的タンパク質 (IK6DHFR) の PM 特異的局在移行システムを用いて人工誘導することを考えた。次に、ORP5 の PM 結合ドメインを IK6DHFR に置換したタンパク質を設計し、これを発現させた細胞の培地中に paITMP を添加することで、ER-PM コンタクトの形成を人工誘導可能であることを示した。また、ER-PM コンタクトの生理的機能の誘導や、未修飾のリガンド (TMP) の添加による ER-PM コンタクトの解消にも成功した。さらに、タンパク質と化合物の組み合わせを変更することで小胞体とゴルジ体のコンタクト形成を誘導するシステムの開発にも成功し、本戦略がさまざまな細胞内コンタクト形成の人工制御に有用であることを実証した。

以上の成果は、今まで有効な制御法のなかったタンパク質や細胞機能の人工操作を可能とし、その生理的機能の解明に貢献する汎用的かつ強力な基盤技術になると期待される。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、生細胞内に構築した人工的なオルガネラを利用した標的タンパク質活性制御技術、ならびに内在性オルガネラに機能付加して構築した半人工的なオルガネラを利用したメンブレンコンタクト制御技術の開発とその有用性について示したものである。論文は以下の5章より構成される。

第1章（序論）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、細胞内に人工的なオルガネラを細胞内に構築し、標的タンパク質の不活性化に応用する手法について述べている。まず、二種類のホモオリゴマー形成タンパク質と FRB を組み合わせることで自己集合性タンパク質 (PB1-AG-FRB) を設計し、これを細胞に発現させることで細胞質中に FRB を内包した人工相分離構造体 (FRBPAC) を構築可能であることを示した。続いて、細胞質中に FKBP 融合標的タンパク質 (FKBP-POI) を共発現させ、そこに FKBP と FRB のヘテロ二量化剤であるラパマイシンを添加すると POI が FRBPAC 内部へ取り込まれ、その機能が不活性化されることを示した。

第3章では、前章の人工オルガネラシステムの分子設計を拡張することで作製した、タンパク質活性化システムについて述べている。まず、POI と FRB をあらかじめ切断可能なリンカー (TEVcs) で連結したタンパク質 (PB1-AG-FRB-TEVcs-POI) を設計し、これを細胞に発現させることで細胞質中に POI を内包した人工オルガネラ (POI-FRBPAC) を構築可能であることを示した。続いて、細胞質中に TEVcs を切断する酵素 (TEVp) と FKBP の融合タンパク質 (FKBP-TEVp) を共発現させた。そこにラパマイシンを添加すると、TEVp の POI-FRBPAC への取り込みと TEVcs の切断が起こり、POI が細胞質中へ放出されて機能が活性化されることを示した。また、機能や立体構造が異なる POI であってもシステムの分子設計を変えずに制御可能であることや、逆に分子設計を変えることで光応答的に POI を可逆放出するシステムが構築可能であることも示されており、人工オルガネラシステムが高い汎用性と拡張性を兼ね備えたタンパク質活性制御手法であることが証明された。

第4章では、オルガネラ膜同士の近接現象であるメンブレンコンタクト（以下、コンタクト）の化学的制御法について述べている。小胞体上に存在するコンタクト形成制御タンパク質に着目し、そのコンタクト形成に必要なドメイン（標的オルガネラ膜結合部位）を人工誘導可能な膜結合システムに置換したタンパク質を設計した。これを細胞に発現させることで、化合物応答的に任意のオルガネラとコンタクトを形成可能な改変型の小胞体を構築可能であることを示した。また、本手法で誘導したコンタクトは生理的機能を維持しており、今後のコンタクト研究に有用な手法となることを実証した。

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、本論文では人工オルガネラの構築や既存のオルガネラの改変を行うことで、今までに有効な制御法が存在しなかったタンパク質や細胞機能を操作可能にする技術基盤を作製した。本論文の成果は、学術誌1編の論文（審査あり）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。