

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。