

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

吉川 優¹・吉井 達之²・築地 真也^{1,2*}

1. はじめに

近年、さまざまなタンパク質やRNAが自己集合することで液-液相分離し、細胞内に液滴やゲル状の構造体（ここでは、特に断りのない限り、ゲル状の構造体も液滴と呼ぶ）を形成することが明らかとなってきた¹⁾。細胞は、生体分子を液滴にしたり溶解したりすることで、転写、翻訳、シグナル伝達など、さまざまな生命現象を調節しているようである。このような細胞内相分離の重要性が明らかになるにつれ、細胞内液滴の化学・物理的特性や、液滴が制御する生命現象・疾患の理解へ向けた研究がここ数年で勢いを増している。一方、細胞にストレスや刺激を与え、その結果生じる液滴を観察するだけでは、液滴の形成メカニズム、物性、細胞内での役割などを詳細に解析することは難しい。そのような中、近年、“細胞まかせ”ではなく、光や小分子化合物を用いて、細胞内の液滴形成を人為的に操作するという試みが行われるようになってきた。さらには、相分離するタンパク質を人工的に設計することで、細胞内でのタンパク質-タンパク質間相互作用を検出する技術や、細胞内のシグナル分子を制御するツールなども開発されるようになってきた。本稿では、そのようなケミカルバイオロジーや合成生物学の視点からエンジニアリングされた「人工相分離ツール」に焦点を当て、それらの分子設計と応用例について紹介する。

2. 細胞内相分離の人工制御システム

細胞内で見られる天然タンパク質の相分離（液滴形成）は動的かつ細胞内環境に依存する現象であり、それをそのまま解析するだけでは、細胞内液滴の物理化学的特性や生理機能を明らかにするのは難しい。その突破口となるのが、光や化合物にตอบสนองして相分離する人工設計タンパク質を用いるというケミカルバイオロジー的手法である。これらの手法では、1) 低複雑性（LC: low complexity）ドメインなどのオリゴマー形成タンパク質と、2) 光あるいは化合物によって二量化（もしくは多量化）するドメインを融合した融合タンパク質を用いる。これを細胞に発現させるだけでは液滴を形成しないが、光もしくは

化合物を作用させると、タンパク質が高次に自己集合（クラスターリング）し、細胞内で相分離するという仕組みとなっている。このような人工相分離制御システムの大きな利点は、天然タンパク質の生理的な（細胞まかせの）相分離とは異なり、クラスターリングの際の分子間相互作用の価数や強さなど、相分離に重要なパラメーターを自由に調節できることにある。また、任意のタイミングで相分離を誘導（または解消）することができるため、細胞内での液滴形成やそのあとの融合・成熟過程をリアルタイムに追跡するうえでも有用であり、細胞内相分離のボトムアップ的な理解に大きく寄与するものと期待される。

optoDroplet Shinらは、光で細胞内に人工の液滴を形成させることのできる「optoDroplet」システムを開発した（図1A）²⁾。分子設計としては、N末端にFUS（Fused in sarcoma）やTDP43（TAR DNA-binding protein of 43 kDa）などの天然変性タンパク質由来のLCドメインを配置し、そのC末端に観察用の蛍光タンパク質、さらに青色光にตอบสนองしてホモ二量体を形成するシロイヌナズナ由来の光受容タンパク質CRY2（Cryptochrome-2）を連結する。このタンパク質は、暗所では相分離しないが、光照射によってCRY2が二量体を形成すると、LCドメインを介した分子間多点相互作用によりクラスターリングし、細胞内に液滴を形成する。optoDropletでは、照射する光の強さや照射時間をコントロールすることでクラスターリングするタンパク質量を自在に調節することができる。また、CRY2は光照射を止めると単量体に戻るため、optoDropletは可逆的なシステムとなる。たとえば、FUSのLCドメイン（FUS^{LC}）とCRY2の融合タンパク質（FUS^{LC}-mCherry-CRY2）を細胞に発現させた実験では、青色光を数分間照射することで、細胞全体に拡散していたmCherryの蛍光が徐々に多数の輝点となって細胞全体に現れた。この輝点は、光退色後蛍光回復（FRAP）実験で素早い蛍光回復を示すことから、流動性の高い液-液相分離した液滴であることが確認された。また、光照射を停止すると液滴は再溶解し、液滴の形成と解消を何度も繰り返すことができた。一方、大変興味深いことに、強い光を長時間照射した場合や、CRY2を変異体（光

* 著者紹介 名古屋工業大学大学院工学研究科（教授） E-mail: stsukiji@nitech.ac.jp

¹名古屋工業大学大学院工学研究科共同ナノメディシン科学専攻

²名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻

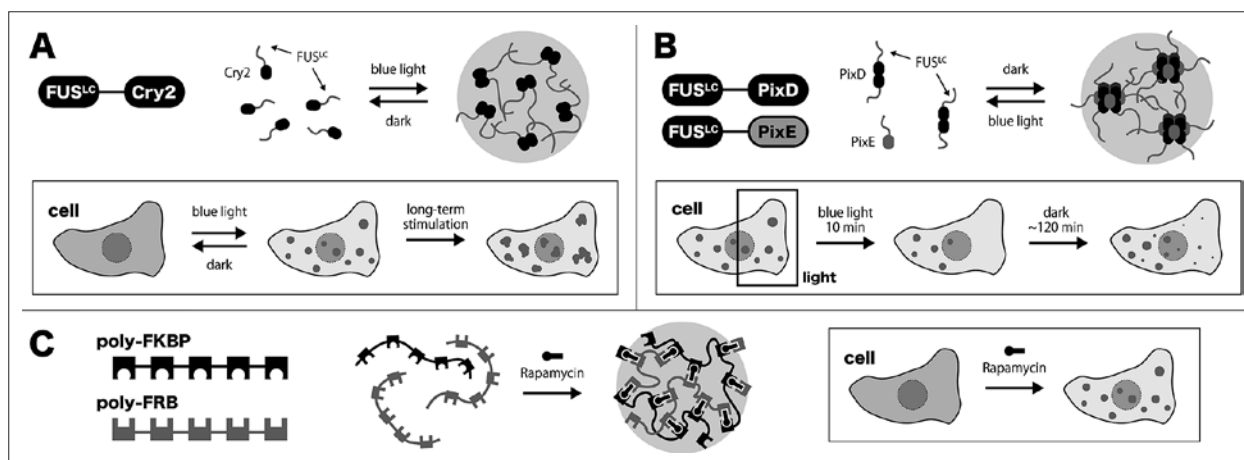


図1. 細胞内相分離の人工制御システム。(A) optoDroplet. (B) PixELLS. (C) iPOLYMER.

によってオリゴマー化するCRY2olig³⁾)に置き換えることで、クラスタリングをより強化した場合には、液滴ではなく、不定形な相分離構造体が形成された。この相分離構造体は、FRAP実験で蛍光がほとんど回復しないことからゲル状態に近いことが示された。さらに、一度ゲル状態構造体になってしまうと、光照射を止めても再溶解は起こらず、不可逆な凝集体に成熟してしまうことが明らかとなった。このように、optoDropletでは光照射の強度や時間、またタンパク質の相互作用の強さといったパラメーターを振ることで、用いているLCドメインがどのような条件で液滴を形成し、どのような条件を境目として不可逆的な凝集体に成熟するのかなどを詳細に調べることが可能となる。特に、FUSタンパク質をはじめとする自己集合性タンパク質が細胞内で異常な不可逆的凝集体を形成することは、神経変性疾患の原因になると考えられているため、そのメカニズムに迫ることのできるoptoDropletは病理学的研究においても非常に有用なツールとなる。

PixELLS 前項のoptoDropletは光照射によって相分離を誘導するシステムであるため、細胞内に液滴を長時間作るのには不向きであった。この問題を解決するために、Dineらは、暗所下で液滴を形成し、光照射によってそれが崩壊（溶解）するシステムとして「PixELLS (Pix evaporates from liquid-like droplets in light)」を開発した(図1B)⁴⁾。PixELLSは、細胞内シグナルの空間パターンや非対称性の形成・維持における液滴の役割を解析するために考案された。このシステムでは、シアノバクテリア由来の光受容タンパク質PixDとその結合タンパク質PixEのペアを使用する。PixDとPixEは、暗所下において、10:5の高次ヘテロ複合体を形成するが、青色

光を照射するとそれが解離する性質を持つ。Dineらはこの光応答性に着目し、FUSのLCドメインを融合したFUS^{LC}-FusionRed-PixDおよびFUS^{LC}-Citrine-PixEを設計した。これらを細胞に共発現させると、FUS^{LC}を介した相互作用とPixD/PixE複合体の形成によって両コンストラクトがクラスタリングし、細胞全体に多数の液滴が形成された。また、これらの液滴は青色光の照射によって消失した。大変面白いことに、細胞の一部の領域の液滴を残す形で光照射を行った場合、液滴を消失させた領域（光照射領域）では液滴の再形成が起きにくくなり、液滴の空間配置（細胞内分布）が長時間（～2時間程度）にわたって細胞内に残り続けることが分かった。このことは、液滴が細胞内分子の空間パターンを保持するための“記憶素子”として働いている可能性を示している。液滴の分布が細胞内シグナルの空間分布や非対称性の獲得に重要な働きをしているのだとすると、それは実に新しい概念である。

iPOLYMER optoDropletやPixELLSのように光で相分離を制御するシステムだけでなく、小分子化合物で液滴の形成を誘導する技術も開発されている。その代表例が、Nakamuraらによって考案された「iPOLYMER (intracellular production of ligand-yielded multivalent enhancers)」である(図1C)⁵⁾。このシステムでは、タンパク質FKBP (FK506-binding protein)を複数タンデムに連結したpoly-FKBPと、タンパク質FRB (FKBP12- rapamycin-binding domain)を複数連結したpoly-FRBという二種類のコンストラクトを用いる。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、poly-FKBPとpoly-FRBを細胞に共発現させ、任意のタイミングでラパマイシンを添加すると、

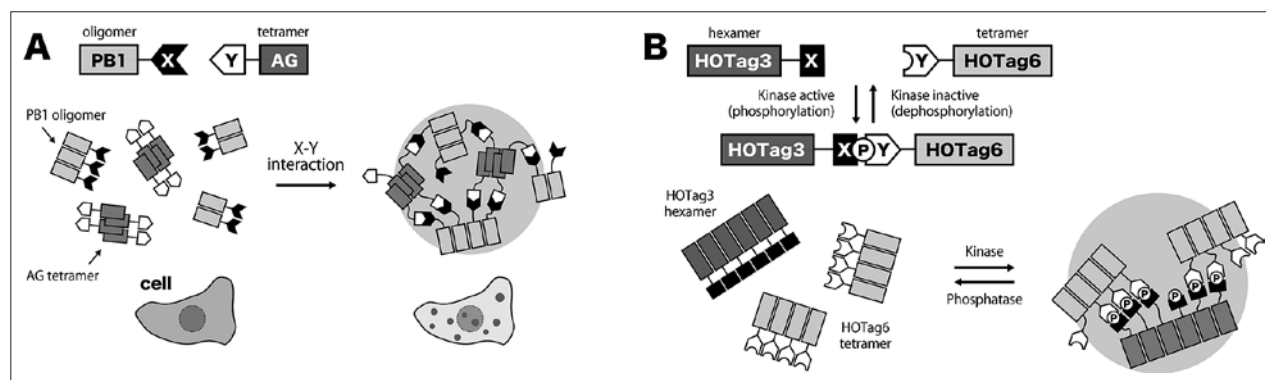


図2. 相分離を利用したタンパク質間相互作用検出. (A) Fluoppi. (B) SPARK.

FKBPとFRBのポリマー間で多点架橋が起こり、相分離する。この手法で生じる相分離構造体は液滴というよりは、より流動性の低いヒドロゲルに近い性質を示しており、RNA顆粒のようなゲル状の膜レスオルガネラの人工模倣物として利用することができる。たとえば、Nakamuraらは、ストレス顆粒を構成するタンパク質であるTIA-1 (T-cell intracytoplasmic antigen-1) のRNA結合ドメインをpoly-FRBに融合したタンパク質とYFP-poly-FKBPを細胞に共発現させ、ラパマイシンによってそれらを相分離させた。面白いことに、この相分離構造体の内部にはストレス顆粒マーカーとして知られる複数のタンパク質 [G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) など] が含まれており、ストレス顆粒マーカーではないタンパク質 (ribosomal P antigen) は含まれていないことが分かった。このことは、iPOLYMERによって人為的に構築した“シンセティックな”ストレス顆粒が天然ストレス顆粒と類似の機能を示すことを示している。iPOLYMERは今後、RNA顆粒をはじめとする、さまざまなゲル状膜レスオルガネラの細胞内特性や機能を解析するための有用なツールになるであろう。

3. 相分離を利用したタンパク質間相互作用検出

近年では、相分離現象を巧みに利用することで、生きた細胞内のタンパク質—タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) や酵素活性を検出・可視化する分析ツールの開発も報告されている。たとえば、タンパク質XとYが相互作用すると液滴を形成するといったシステムで、液滴の形成を蛍光観察することで、タンパク質XとYの相互作用を検出することできる。このような相分離を利用した検出法の利点は、レポーター分子が液滴として濃縮される (輝点となる) ことで高感度な検出

ができる点にあり、既存のFRETなどの手法と比較しても非常に明確なシグナル変化を得ることができる。

Fluoppi Watanabeらによって開発された「Fluoppi (Fluorescent PPI-visualization)」システムは、生細胞内のPPIをリアルタイムかつ簡便に検出できる画期的なツールである (図2A)⁶⁾。このシステムでは、ホモオリゴマーを形成するPB1 (Phos and Bem1) ドメインと、ホモ四量体を形成する緑色蛍光タンパク質AzamiGreen (AG) に、相互作用を調べたいタンパク質XとYをそれぞれ融合する。XとYが相互作用する場合には、PB1オリゴマーとAGテトラマーが架橋されて液滴となり、AGの緑色蛍光が輝点として観察される。たとえば、p53とMDM2 (Murine double minute 2) は細胞内で相互作用することが知られるが、PB1-p53とAG-MDM2を細胞に共発現させると、液滴を形成し、輝点が観察された。そこへp53-MDM2のPPI阻害剤を加えると、輝点は消滅し、AGの蛍光は細胞全体に分布した。このように、Fluoppiシステムは、細胞内でのPPIを検出できるばかりでなく、PPI阻害剤の評価にも利用できる。また、Fluoppiシステムは拡張性が高く、AGを別の四量体蛍光タンパク質に置き換えることで検出波長を変えたり、AGのモノマー変異体を用いたりすることで標的タンパク質のホモオリゴマー化を検出することも可能である。

SPARK Zhangらが開発した「SPARK (Separation of Phases-based Activity Reporter of Kinase)」はFluoppiの発展型と言えるもので、相分離を利用して特定のリン酸化酵素 (キナーゼ) の活性を追跡可能なシステムとなっている (図2B)⁷⁾。分子設計としては、標的キナーゼの基質配列をX、リン酸化された基質に結合するドメインをYとして、それぞれを別のホモオリゴマー形成タンパク質に連結させる。これらを共発現させると、基質をリン酸化するキナーゼが活性化している場合でのみ、Xが

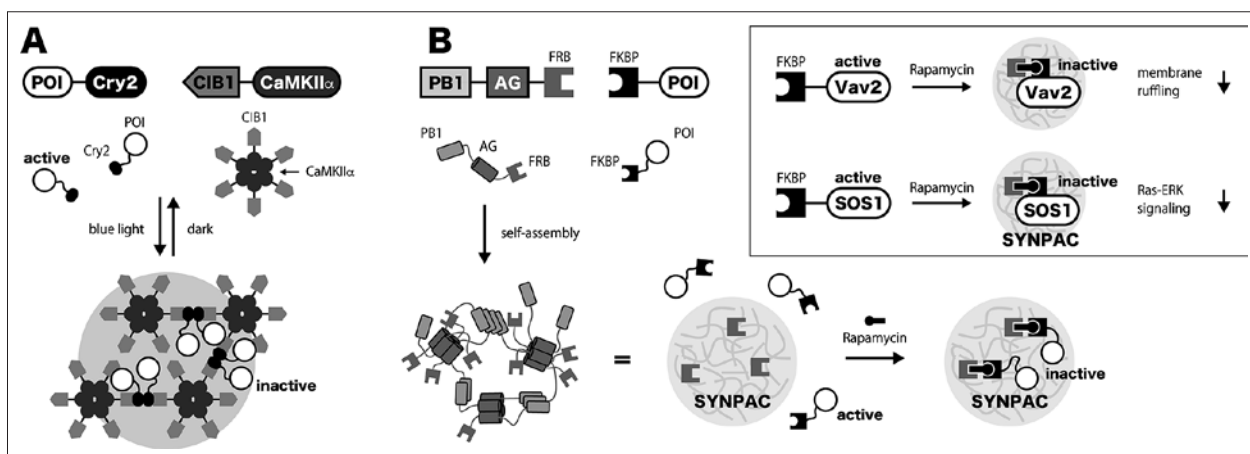


図3. 人工相分離構造体を用いた細胞内分子制御。(A) LARIAT. (B) SYN PAC.

リン酸化され、そこにYが結合することで相分離するという仕組みになっている。たとえば、キナーゼERKに対するSPARKプローブ(ERK-SPARK)を用いることで、EGFによる刺激後の細胞内ERKの活性化と不活性化を液滴の生成と消失によって追跡することが可能であった。また、ERK-SPARKを発現した遺伝子組換えショウジョウバエを用いることで、*in vivo*組織中のERK活性を検出できることも示されている。

相分離を利用したPPI検出法では、あくまでも液滴の形成を観察するため、PPIやキナーゼ活性の空間情報を正確には反映しないことが欠点としてあげられる。しかし、人工相分離を利用した検出系は、培養細胞や*in vivo*での分子間相互作用を簡便かつ高い信頼度で高感度に検出・可視化するための強力な新しいアプローチとして重要である。

4. 人工相分離構造体を用いた細胞内分子制御

細胞内の狙ったタンパク質の機能を制御する手法の開発は、ケミカルバイオロジーの重要課題の一つである。しかし、タンパク質は構造・機能・機能発現機構が多様であるため、さまざまなタンパク質の機能制御に適用可能な汎用的な手法の開発は今なお難しい。一方、細胞は、特定の分子を液滴(相分離構造体)に閉じ込めるという原理を用いて、実にさまざまなタンパク質の機能を制御している。これをヒントに、相分離構造体を利用することでタンパク質活性を制御するという新しい試みが行われるようになってきた。

LARIAT 相分離を利用したタンパク質活性制御の先駆けは、Leeらが考案した「LARIAT (light-activated reversible inhibition by assembled trap)」である(図3A)⁸⁾。

このシステムでは、光受容タンパク質CRY2とその結合タンパク質CIB1(Calcium and integrin-binding protein 1)のペアを利用する。まず、ホモ12量体を形成するCaMKIIαにCIB1を融合し、それを細胞内に発現させることで、12分子のCIB1を提示した多量体タンパク質(CIB1-MP)を構築する。一方、標的タンパク質はCRY2との融合タンパク質(CRY2-POI)として細胞に共発現させる。暗所下では、CRY2-POIは単量体として細胞質中を拡散し、正常な機能を果たす。そこへ青色光を照射すると、CRY2は二量化すると同時にCIB1と結合し、CRY2-POIとCIB1-MPがクラスターリングすることで相分離する。標的タンパク質はこの相分離構造体の中にトラップされるため、活性を失う。実際に、LARIATシステムを用いることで、Tiam1, Vav2, Rac1, さらにはチューブリンなどのさまざまなタンパク質の活性を光で不活性化できることが示された。LARIATは、(optoDropletと同様)光照射を止めると相分離状態が解消されるため、細胞内のさまざまなシグナル分子を高い時空間分解能で可逆的に光制御可能な強力なオプトジェネティクスツールとして注目されている。

SYN PAC 核小体やRNA顆粒などで見られるように、細胞は相分離によってできたメンブレンレスオルガネラの中でさまざまな生命現象を制御している。もし細胞内に完全人工の相分離構造体を作ることができれば、そこを「人工場(人工オルガネラ)」として利用した新しい生体分子制御法が創出できるかもしれない。筆者らは現在、このような発想のもと、生細胞内にさまざまな分子を制御可能な人工場を作ることに取り組んでいる。筆者らは、人工場を構築するための戦略として、自己集合して相分離するように設計した人工タンパク質を利用しており、そのよう

にして作製したタンパク質ベースの人工場を「SYNPAC (synthetic protein-assembled compartments)」と呼んでいる (図3B)。たとえば、先述のFluoppiシステムを参考に、二種類のホモオリゴマータンパク質 (PB1とAG) とFRBをタンデムに連結したコンストラクトを設計した。これを細胞に発現させることで、FRBを内包したSYNPAC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FKBPを融合し、それを同じ細胞に共発現させる。初期状態では、標的タンパク質は細胞質に局在するが、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SYNPACに急速に取り込むことができた。SYNPACに取り込まれた標的タンパク質は周囲から隔離されることでその機能を発現できなくなる。実際に筆者らは、このシステムを用いることで、Vav2やSosといったGEFタンパク質を望みのタイミングで不活性化できることを実証した (論文投稿準備中)。SYNPACの方法論では、さまざまなタンパク質やドメインをモジュール的に組み込むことで、さまざまな機能を搭載した人工場を生細胞内に構築することができるであろう。現在筆者らは、このコンセプトのもと、生きた細胞や動物個体内のタンパク質やRNAを制御するユニークなSYNPACシステムの

開発を鋭意展開中である。

おわりに

本稿で紹介したように、タンパク質の相分離をエンジニアリングすることで、細胞内相分離を理解するための合成生物学的ツールや、生体分子プロセスを可視化・操作する新しいケミカルバイオロジーツールが開発できるようになってきた。今後、相分離生物学の発展に伴い、生命研究における人工相分離ツールの重要性と可能性はますます高まっていくであろう。人工相分離ツールの開発は今まさに黎明期を迎えようとしており、今後どのような革新的なツールがデザインされていくか非常に楽しみである。

文 献

- 1) 白木賢太郎：相分離生物学，東京化学同人 (2019).
- 2) Shin, Y. *et al.*: *Cell*, **168**, 159 (2017).
- 3) Taslimi, A. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 4925 (2014).
- 4) Dine, E. *et al.*: *Cell Syst.*, **6**, 655 (2018).
- 5) Nakamura, H. *et al.*: *Nat. Mater.*, **17**, 79 (2018).
- 6) Watanabe, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 46380 (2017).
- 7) Zhang, Q. *et al.*: *Mol. Cell*, **69**, 334 (2018).
- 8) Lee, S. *et al.*: *Nat. Methods*, **11**, 633 (2014).