

## 光応答性局在分子システムによる細胞操作

吉井 達之<sup>1,2\*</sup>・築地 真也<sup>1,3</sup>

## はじめに

動物細胞は、さまざまな酵素反応やタンパク質間相互作用のカスケードによって細胞外部からの情報を内部へと伝達する。このようなシグナル伝達の過程におけるメインプレイヤーはタンパク質であり、シグナルタンパク質がさまざまなタイミングや場所で活性化することで細胞の高次機能や運命が時空間的に制御されている。したがって、狙ったタンパク質の活性を任意の場所・タイミングで操作する技術は、それらの分子の動きに関する時空間的な情報を得るために有用である。また、細胞の増殖や分化、細胞死など、細胞の運命に関わるタンパク質を高い時空間分解能で活性化・阻害することができれば、発生や組織形成を人為的に制御することが可能になるものと期待される。このような背景から、タンパク質の活性を光によって操作する技術が非常に注目されている。光は照射する位置やタイミング、持続時間を自由にコントロールできるため、光でタンパク質活性を操作する技術は、細胞や組織におけるシグナル伝達を時空間的に精密制御する強力なアプローチとなる。

## 細胞内シグナル伝達を操作する光遺伝学

近年、細胞内タンパク質を操作する技術として、Cryptochrome-2 (CRY2)<sup>1)</sup>やPhytochrome B (PhyB)<sup>2)</sup>といった植物由来の光受容タンパク質を用いたオプトジェネティクスが飛躍的な進展を見せている。光受容タンパク質が示す光依存的な構造変化や相互作用(二量化・多量化)特性を利用することで、キナーゼやGTPアーゼなど、さまざまなシグナル伝達において重要なタンパク質の活性を、光で制御することが可能になってきた。オプトジェネティクスツールは、プラスミドDNAやウイルスを用いて動物細胞内に簡単に発現させられることから、多くの細胞生物学者に愛用されている。一方で、課題も残されている。CRY2などのフラボタンパク質は、有機補酵素であるフラビンを吸収団として用い、青色光に応答する。これらの光受容タンパク質を用いたオプトジェネティクスツールは、他の分子や活性を可視化するバイオセンサーと併用できることが望ましいが、

多くのバイオセンサーで使用されているCFPやGFPなどの励起光でフラボタンパク質も励起されることが問題となる。PhyBを用いたシステムは赤色光と近赤外光に応答する魅力的なものであるが、補因子であるフィコシアノビルリンが動物細胞内にはないため、外から添加する、あるいは細胞にフィコシアノビルリンを作らせるための代謝酵素を導入することが必要となる<sup>3)</sup>。このような光遺伝学の問題を解決するための相補的なアプローチとして、光応答性化合物を利用した化学的手法の重要性が高まってきている。

## 細胞内シグナル伝達を光操作する化学的アプローチ

有機化合物でシグナル伝達を光操作するためには、光に応答して構造変化し、タンパク質などの標的分子との結合や相互作用が変化する分子が必要である。そのような光応答性分子を創製するための戦略として、光ケージド化合物<sup>4)</sup>や、光異性化化合物を用いる手法がこれまでに考案されている。光ケージド化合物は、光によって切断される保護基を化学修飾することで、活性を一時的にマスクした生理活性分子である(図1A)。これを細胞に適用し、光を照射することで、生理活性を望みのタイミングと場所で放出することができる。光分解性保護基(ケージド基)としてこれまでに、ニトロベンジル基、

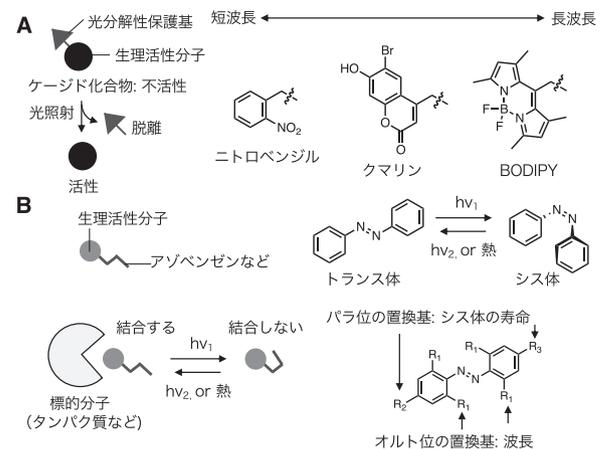


図1. (A) ケージド化合物の例, (B) アゾベンゼンの光異性化による生体分子の制御。

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

<sup>1</sup>名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻, <sup>2</sup>JST さきがけ

<sup>3</sup>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

クマリン骨格, BODIPY骨格など, 吸収波長の異なるさまざまなものが報告されている. これらを適宜選択することで, 実験系に適した波長での光刺激が可能となる. また具体的な例として, グルタミン酸, GABA, 生理活性ペプチドなどのケージド化合物が開発されており, 生命研究に利用されている. 一方, ケージド化合物の弱点は可逆性がないことであり, 光による生理活性分子の放出に限定される.

可逆性の問題を解決するアプローチとして, 光で構造異性化を示すフォトクロミック化合物を用いる手法が開発されている. 光異性化を示す代表的分子としては, アゾベンゼン<sup>5)</sup>がある (図1B). アゾベンゼンは一般的に, 光を当てていない状態ではトランス体をとる. トランス体の吸収波長の光を当てるとシス体に変化する. シス体は自発的 (熱的) にトランス体へと戻るが, シス体の吸収波長の光を当てると高速にトランス体へと異性化する. このようなアゾベンゼンの構造異性化を利用することで, 生体分子の活性や相互作用を光で可逆的に操作することができる. たとえば, アゾベンゼンを連結したグルタミン酸を用いることで, 神経細胞上のグルタミン酸受容体を光で可逆的に刺激できることが示されている<sup>6)</sup>. また, アゾベンゼンも分子構造を改変することで光応答特性のチューニングができる. たとえば, オルト位の置換基を変更することで吸収波長を, パラ位の置換基を変更することでシス体の寿命を調節することが可能である.

このように, ケージド化合物やアゾベンゼンなどの光機能性化合物を用いたアプローチは, 吸収波長などの光応答特性をテーラーメイドに変換できることが大きな魅力である. したがって, 光機能性化合物によって制御可能な人工タンパク質や人工シグナル伝達経路を生細胞内にボトムアップ的に構築することができれば, 光遺伝学とは相補的, かつ, より拡張性の高い生命光操作システムの創製へとつながるものと期待される. しかしながら,

これまでに報告されている有機化合物を用いた細胞内シグナル伝達の操作技術のほとんどは, タンパク質に作用する生理活性リガンド (阻害剤や活性化剤) を光機能化したものである. そのため, 生理活性リガンドがないタンパク質への適用は未だ限られており, そのようなタンパク質の活性や, それらを介したシグナル伝達経路の光制御に応用可能な, 新しい汎用的な化学的方法論の開発が待ち望まれている.

### 光応答性局在分子システム (paSLIPT) の開発

そこで筆者らは, 光機能性化合物の利点を生かしつつ, さまざまな細胞内シグナルタンパク質の光操作に展開可能な新しい化学ツールの開発を目指した. その際, タンパク質の細胞内局在に着目した. 細胞内にはさまざまな細胞小器官や膜領域があり, キナーゼやGアニンヌクレオチド交換因子などのシグナルタンパク質の多くは, 細胞内でその局在場所を変化させる. そして, 移行先に局在している下流分子との酵素反応や相互作用を介して, 細胞内シグナルが時空間的に下流へと伝搬される. このようなタンパク質の局在変化は細胞内シグナル伝達のもっとも重要な機構の一つであり, 光によって任意のシグナルタンパク質の局在を人為的にコントロールすることが可能になれば, さまざまな細胞内シグナル伝達経路を自在に操作する強力な基盤技術になるものと考えた.

このような光操作を実現するための基盤となるのが, 筆者らがこれまでに開発した化合物技術「SLIPT (self-localizing ligand-induced protein translocation)」である. SLIPTでは, 標的タンパク質に特異的に結合する小分子リガンドと, 特定の細胞内部位に結合・局在する分子 (局在化モチーフ) を, リンカーを介して連結した化合物を用いる (図2A)<sup>7)</sup>. このような設計にすることで, 小分子リガンドは細胞内の狙った場所に自発的に局在するようになるため, 筆者らはこのような化合物を「局在

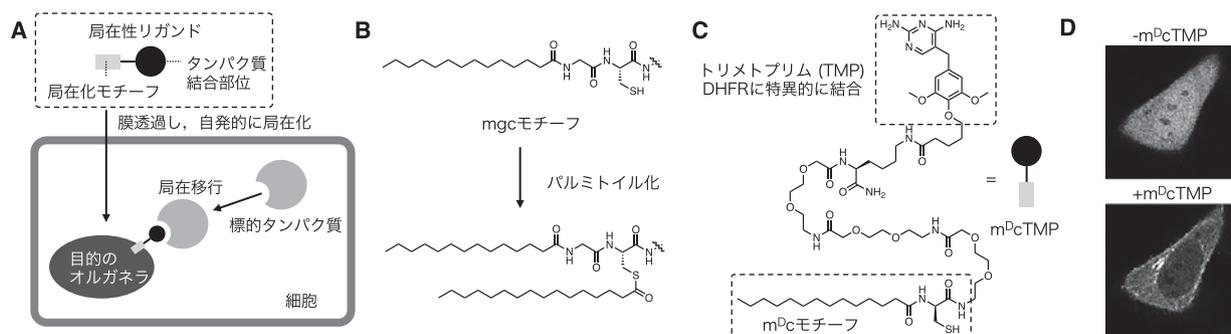


図2. (A) SLIPTの概念図, (B) mgcモチーフ, (C) m<sup>Dc</sup>TMPの構造, (D) m<sup>Dc</sup>TMPによるDHFR-GFPの局在変化.

性リガンド (Self-localizing ligand)」と呼んでいる。そして重要なことは、局在性リガンドは、細胞膜を透過後、それ自身が局在化するだけでなく、その標的タンパク質を細胞質からその局在化部位へ移行させることができる (図2A)。すなわち、局在性リガンドは、細胞内タンパク質の局在移行誘導剤となる。

細胞膜インナーリーフレット (内葉) は、細胞内シグナル伝達のもっとも重要な場である。そこで筆者らは、細胞膜内葉にさまざまな任意のシグナルタンパク質をリクルートすることのできる局在性リガンドの開発を目指した。そのための局在化モチーフの設計として、LynキナーゼのN末端に存在する「myristic acid-glycine-cysteine (mgc) モチーフ」に着目した (図2B)。このmgcモチーフは、細胞内でシステイン側鎖のスルフヒドリル基がパルミトイル化を受けることで、細胞膜内葉へと局在する。しかし、このmgcモチーフは細胞内で分解を受けやすいことが判明したため、筆者らは、分解耐性を持ち、より構造も単純な局在化モチーフとして、ミリスチン酸とD体システインからなる「m<sup>D</sup>cモチーフ」を新規に開発した<sup>8)</sup>。そして、このm<sup>D</sup>cモチーフと小分子トリメトプリム (TMP) をリンカーでつないだ化合物「m<sup>D</sup>cTMP」を局在性リガンドとして合成した (図2C)。TMPは、大腸菌由来ジヒドロ酸還元酵素 (DHFR) に特異的に結合するリガンドである。そのため、任意の標的タンパク質にDHFRを“タグ”として融合したものを細胞内に発現させ、培養液にm<sup>D</sup>cTMPを添加することで、DHFR融合タンパク質を望みのタイミングで細胞膜へ移行させることができる。実際に、DHFRと緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質 (DHFR-GFP) を発現させた細胞に、m<sup>D</sup>cTMPを添

加すると、DHFR-GFPは細胞質から細胞膜へ数分以内に移行することが明らかとなった (図2D)。また、その後、長時間 (12 h) インキュベートしても、DHFR-GFPの細胞膜局在は持続した。一方、mDcTMPを用いたSLIPTシステムでは、培養細胞中のすべての細胞でタンパク質局在移行を誘導する。そのため、多細胞集団中の狙った細胞でのみタンパク質局在を制御したり、単一細胞の局所領域にタンパク質を移行させたりといった応用には不向きであった。ここで、光機能性化合物の出番である。

上述のm<sup>D</sup>cTMPのTMP部位に光分解性保護基を導入すれば、光によって活性化される局在性リガンドを創製できるはずである。このアイデアのもと、ケージド局在性リガンド「m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>」を合成した (図3A)。これを細胞培養液に添加すると、m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>は自発的に細胞膜に局在し、細胞膜内葉にTMP<sup>NVOC</sup>が提示される。しかし、この状態では、TMPリガンドはケージド基で保護されており、DHFRは結合できない。そこへ光を照射すると、ケージド基 (NVOC) が脱離することでTMPが再生し、DHFR融合タンパク質を細胞質から (光を照射した) 細胞膜領域へ局在移行させられるものと考えた (図3B)。実際に、合成したm<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>をDHFR-RFP発現細胞に作用させ、洗浄後、405 nmの光を照射すると、細胞質に局在していたDHFR-RFPが細胞膜へ局在移行する様子が共焦点レーザー走査顕微鏡による観察で明らかとなった (図3C)。一方、過剰量の未修飾のTMPが存在する条件下で同様の実験を行った場合、光を照射してもDHFR-RFPの局在移行は起こらなかった。したがって、m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>を用いたシステムでは、光によるアンケーシングによって生じたm<sup>D</sup>cTMPのTMP部位とDHFRが結合することで、DHFR-RFPの細胞膜局在化が進行したと考えられる。この光誘導型の局在制御システムを「photo-activatable SLIPT (paSLIPT)」と名付けた。

### 光応答性局在分子システムによる細胞操作

paSLIPTシステムでは、DHFRに融合するタンパク質をモジュール的に組み合わせることで、光に応答するさまざまな人工シグナル経路を生細胞内にボトムアップ的に構築することができる。その代表例を以下に紹介する。

まず、細胞運動シグナルの光操作を検討した。細胞運動を制御するRacはグアニンヌクレオチド交換因子であるTiam1との相互作用により活性化する。そこで、Tiam1をDHFR-RFPに融合した (DHFR-RFP-Tiam1) (図4A)。このキメラタンパク質をマウス線維芽由来のNIH3T3細胞に発現させ、m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>を作用させた。この細胞の局所に405 nmの光を照射すると、DHFR-RFP-

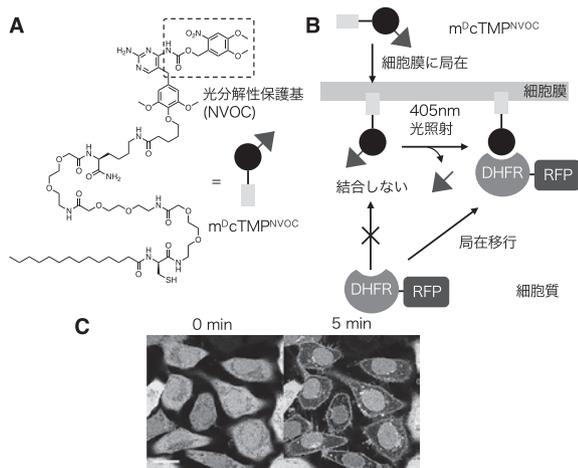


図3. (A) m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>の構造, (B) paSLIPTの概念図, (C) m<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>と光照射によるDHFR-RFPの膜移行。

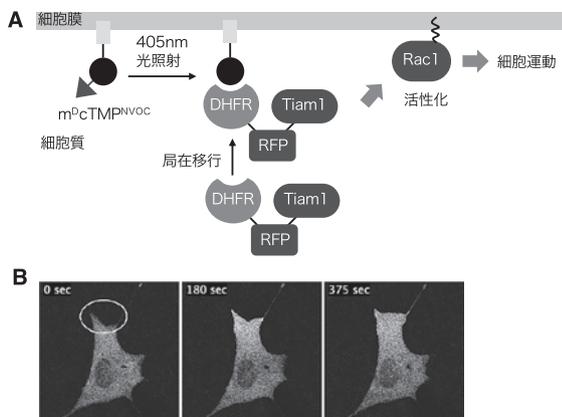


図4. paSLIPTによる細胞運動の光操作。(A) 概念図, (B) 光照射前後におけるNIH3T3細胞の形態変化。印を付けた領域に光を照射した。

Tiam1は細胞膜上の光照射部位へと局在移行した。それに伴い、局所的な運動の活性化と葉状仮足の形成が見られた(図4B)。すなわち、paSLIPTを用いることで、GTPaseの活性化と細胞運動を時空間的に光制御できることが明らかとなった。

また、代謝、増殖、生存などの細胞機能に関わっているPI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) 経路の活性化も試みた(図5A)。PI3Kは細胞膜上でPhosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) をリン酸化することで、Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) を産生する。この下流では、さまざまな分子が活性化される。筆者らは、p85のinner-*Src* homology 2 (iSH2) ドメインをDHFR-YFPに融合したキメラタンパク質 (DHFR-YFP-iSH2) をヒト子宮頸がん由来のHela細胞に発現させた。iSH2は細胞内に発現させると、PI3Kの触媒ドメイン (p110) と複合体を形成するため、iSH2を細胞膜へとリクルートすることで、PI3Kを複合体として細胞膜へ局在化させることができる。PIP3の産生を可視化するために、PIP3に結合するPHドメインにRFPを融合したRFP-PHを用いた。また、Aktが活性化するとリン酸化され核外に移行するAkt-KTR-CFPを同じ細胞に共発現させた。この細胞にm<sup>D</sup>cTMP<sup>NVOC</sup>を作用させ、405 nmの光を照射すると、iSH2の細胞膜への局在移行と、それに続くPIP3産生および内在性Aktの活性化が見られた(図5B, C, D)。このイメージング実験において、CFP, YFPおよびRFPを蛍光プローブとして用いたが、これらの励起光ではpaSLIPTは影響されなかった。すなわち、paSLIPTは光刺激とマルチカラーイメージングを同時に実現するプラットフォームであると言える。また、上記の結果は、paSLIPTを用いることで、細胞膜内葉を

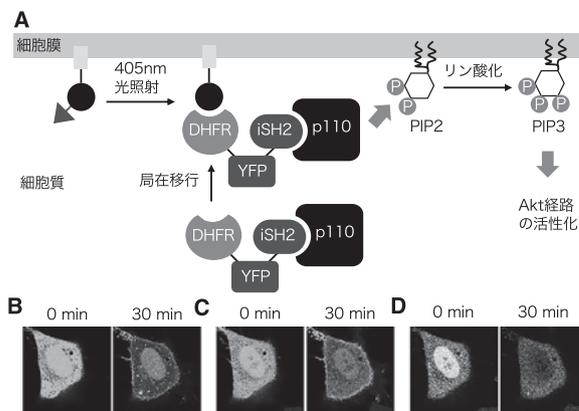


図5. paSLIPTによるPI3Kの膜移行とAkt経路の活性化。(A) 概念図, (B) DHFR-YFP-iSH2の局在変化, (C) RFP-PHの局在変化, (D) Akt-KTR-CFPの局在変化。

起点とするさまざまなタンパク質・脂質シグナルを光操作できることを示している。

### おわりに

以上のように、光機能性化合物(有機化学)とタンパク質タグ(タンパク質工学)を統合することで、動物細胞内のタンパク質局在を光操作することのできる新ツール「paSLIPT」を開発した。paSLIPTでは、ケージド局在性リガンドをボトムアップ的に組み上げる(化学合成)ため、リガンド、光分解性保護(ケージド)基、局在化モチーフをモジュール的に自在に変更することができる。たとえば、リガンドを変更することで、DHFR以外のタンパク質をタグとして用いることができる。このようなアプローチにより、一細胞内の複数の異なるタンパク質の局在を操作することが可能になる<sup>9)</sup>。ケージド基を変更すれば、光刺激に必要な波長や光分解特性などをチューニングすることもできる。実際に筆者らは、上記の405 nmよりも長波長の光に応答するケージド局在性リガンドを開発することにも成功しており、目的に応じて光刺激波長を変えることのできるpaSLIPTシステムシリーズを構築しつつある(論文投稿準備中)。また、光によって構造異性化するアゾベンゼンを組み込んだ局在性リガンドを用いることで、タンパク質の細胞膜移行と解離を可逆的に光操作することも可能になりつつある。局在化モチーフを変更すれば、細胞膜以外の細胞内小器官へのタンパク質局在移行も可能である。筆者らは、核<sup>7)</sup>、ゴルジ体<sup>10)</sup>、ER<sup>11)</sup>、微小管<sup>7)</sup>といったさまざまなオルガネラや細胞内部位を標的とした局在化モチーフも見いだしており、これらはより多様なタンパク質局在光制御への基盤となるであろう。paSLIPTの方

法論は、有機化合物を用いて細胞内タンパク質の局在と活性を光で自在に時空間操作するための強力なオプトケミカルツールであり、今後、ケミカルバイオロジーや合成生物学への応用展開が期待される。

#### 文 献

- 1) Kennedy, M. *et al.*: *Nat. Methods*, **7**, 973 (2010).
- 2) Levskaya, A. *et al.*: *Nature*, **461**, 997 (2009).
- 3) Uda, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11962 (2017).
- 4) Ellis-Davies, G. C. R.: *Nat. Methods*, **4**, 619 (2007).
- 5) Mart, R. J. and Allemann, R. K.: *Chem. Commun.*, **52**, 12262 (2016).
- 6) Volgraf, M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 260 (2007)
- 7) Ishida, M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12684 (2013).
- 8) Nakamura, A. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **15**, 837 (2020).
- 9) Nakamura, A. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1004 (2020).
- 10) Sawada, S. *et al.*: *Chem. Commun.*, <https://doi.org/10.1039/D0CC06908F> (2020).
- 11) Nakamura, A. *et al.*: *Biochemistry*, **59**, 205 (2020).