

論文の内容の要旨

Engineering photoswitching proteins for optogenetic control of cellular signaling processes

(細胞内シグナル伝達の光操作を実現する光スイッチタンパク質の開発)

氏 名 河 野 風 雲

【序】 生体の構成単位である細胞は、細胞内外からの複雑なシグナルを、多様なタンパク質や小分子を介することで、正確な情報伝達を実行し、適切な細胞機能へと結びつけている。こうした細胞機能に重要な役割を担うタンパク質や小分子が、細胞内のいつ、どこで、どのように機能しているかを時空間的に明らかにすることは、生命科学の発展や様々な疾患を詳細に理解する上で非常に重要な意味を持っている。その為の手法として、目的とするタンパク質をマクロライド系抗生物質であるラパマイシンの存在化で二量体化するタンパク質 FK506-binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin-associated protein 1 (FRB) で融合し、細胞における任意の場所への局在化や他のタンパク質との相互作用誘導を、ラパマイシン依存的な FKBP-FRB 二量体化によって制御することで、細胞機能を操作する、いわゆる化学誘導二量体形成 (chemically inducible dimerization : CID) 法が開発されてきた。この CID 法は、細胞内の様々なタンパク質の活性を任意の場所で操作することを可能にし、リガンド刺激や遺伝子ノックイン・ノックアウトといった、既存の手法では知り得なかった細胞内シグナル伝達過程におけるタンパク質や分子の動態や役割について、深い理解を得る手段を提供してきた。近年、この CID 法で用いられている FKBP と FRB を、植物や菌類などの天然に存在する、光依存的に二量体を形成するタンパク質、いわゆる光受容体や光受容ドメインで置き換えることで、これまでの CID 法よりも高い時間分解能、空間分解能で細胞機能を操作しようという試みが行われている。光を用いたこの技術は、ラパマイシンの不可逆的な細胞内拡散が起こる CID 法に対して、可逆的な時空間操作という点において、非常に大きな優位性を与える。しかしながら、そういった天然に存在する光受容体のほとんどは、分子サイズが大きい、種特異的な補因子の必要性、

光応答による活性化の持続時間が長い等の、光操作技術の開発にあたって不都合な複数の問題を同時に抱えている。そこで本研究では、遺伝子工学的アプローチに基づいて、1) 天然の光受容体が抱える問題点を克服した、汎用性や実用性、頑強性の高い二量体形成型青色光スイッチタンパク質の開発、ならびに、2) 光スイッチタンパク質のキネティクスを劇的に向上させる為の方法の創案を行った。

【研究1：二量体形成型青色光スイッチタンパク質の開発】

【VVD の光応答を検出するアッセイ系の構築】 様々な光受容体や光受容ドメインが有する機能を探索した結果、最も有望な候補物質としてアカパンカビ由来の光受容体 Vivid (VVD) に着目した (図1)。VVD の光応答を簡便に検出・評価する為に、ホタルルシフェラーゼ分割体の再構成・再分割に基づく、生物発光アッセイ系を構築した (図2)。本アッセイ系によって、VVD は青色光照射後、直ちにホモ二量体を形成し、光遮断後、約 2.5 時間の半減期で単量体に戻ることが明らかとなった。

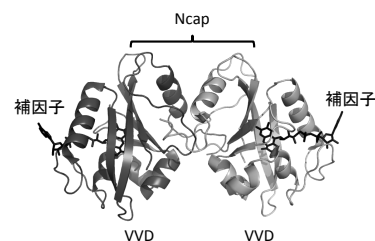


図1. 真菌の光受容体VVDの二量体化結晶構造

【VVD の持つ問題点とその改善】 VVD が形成する“ホモ”二量体は、光操作技術への利用にとって非常に大きな問題を持つ。何故ならば、VVD を使って、タンパク質 A とタンパク質 B の相互作用を誘導したい場合、VVD が形成するホモ二量体は A-B 間の相互作用のみならず、A-A 間や B-B 間の相互作用まで誘導してしまうからである (図3A)。この問題を克服する為に、目的のタンパク質間だけの相互作用を誘導可能な“ヘテロ”二量体を形成する光スイッチタンパク質の開発に取り組んだ。その為の戦略として、VVD の二量体界面をタンパク質工学的アプローチに基づいて改変し、二量体化時の導入された電荷的アミノ酸の静電相互作用 (静電反発) を利用することを思い付いた (図3B)。VVD の結晶構造とアミノ酸配列情報を基に、二量体界面である Ncap に部位特異的アミノ酸変異を実行し、本アッセイ系を用いてヘテロ二量体化が可能なアミノ酸部位を探索した。その結果、52 番目のアミノ酸残基は電荷的アミノ酸の変異によって、ヘテロ二量体化が可能であることが明らかとなった。特に、イソロイシンをアルギニンで置換した変異体 VVD-I52R とアスパラギン酸で置換した変異体 VVD-I52D と組み合わせは、他の電荷的アミノ酸で置換された変異体の組み合わせより、高いヘテロ二量体形成効率を示した。さらに、この二つの変異体、VVD-I52R と VVD-I52D、の 55 番目のアミノ酸残基に電荷的アミノ酸の変異を加えた結果、ヘテロ二量体形成効率のさらなる向上が可能であることが明らかとなった。この 55 番目のアミノ酸残基に置換するアミノ酸の最適化を行った結果、非常に高いヘテロ二量体形成効率を示しつつ、ホモ二量体

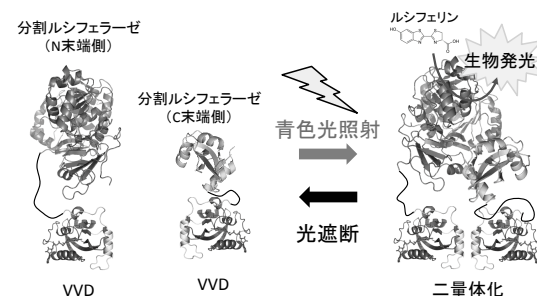


図2. VVD二量体化を検出・評価するための生物発光測定系の構築

化はほとんど誘導されない二つの変異体、VVD-I52R/M55R と VVD-I52D/M55G を開発することに成功した。筆者はこの二つの変異体を光スイッチタンパク質“Magnet”，特に VVD-I52R/M55R を

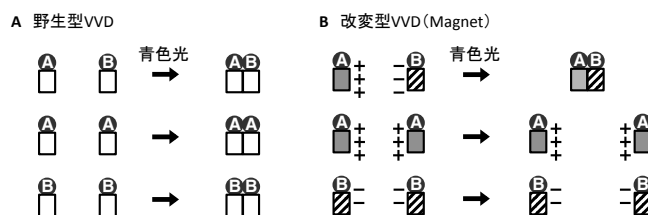


図3. 野生型VVDの問題点とその解決策

“pMag”, VVD-I52D/M55G を “nMag” と命名した。

【光スイッチタンパク質 pMag と nMag の改良】 本アッセイ系によって、pMag と nMag は青色光照射後、直ちにヘテロ二量体を形成し、光遮断後、約 2.4 時間の半減期で単量体に戻ることが明らかとなった。光遮断後に pMag と nMag が単量体に戻るまでの時間を、大幅に短くすることができれば、より高い時空間分解能での光操作が実現可能である。多くの青色光受容体では、光遮断後の不活性化までの時間は光反応サイクル、特にその律速段階である補因子とシステイン残基間の共有結合が熱的に切断されるまでの時間、に依存することが明らかになっている。この光反応サイクルの長さ、すなわち共有結合が切れるまでの時間は、補因子周辺のアミノ酸を変えることによって変化することが知られている。VVD の場合、74, 85, 135, 165 番目のアミノ酸部位において、アミノ酸置換による光反応サイクルの変化が報告されている。pMag と nMag にそれらのアミノ酸変異 (I85V もしくは I74V/I85V) を導入した結果、その変異体(それぞれを、pMagFast1, nMagFast1 もしくは pMagFast2, nMagFast2 と命名)は、光遮断後、数十秒もしくは数分で直ちに単量体に戻ることが明らかとなった。しかし、これらの変異体は非常に短い二量体形成時間の性質を持つ一方で、二量体形成効率が著しく低い変異体であることが明らかとなった。この、二量体形成時間と効率とのトレードオフ問題を解決する為の方法を模索した結果、本アッセイ系で明らかになった二量体形成効率を高めるアミノ酸変異 (M135I/M165I) を導入した変異体 (pMagHigh1, nMagHigh1 と命名) との組み合わせ、すなわち pMagFast1 と nMagHigh1 または pMagFast2 と nMagHigh1 の組み合わせには、非常に短い二量体形成時間の性質を損なうことなく、二量体形成効率の著しい低下を克服する、すなわち二量体形成効率の非常に高い光スイッチタンパク質であることが明らかとなった。

【Magnet の光操作技術への応用】 光スイッチタンパク質 Magnet の光操作技術への応用として、細胞膜上にリン脂質を産生させる光駆動型分子プローブの開発を行った (図 4)。これは、PI3 キナーゼ結合ドメインを融合した pMagFast1 と、細胞膜上に繫留された nMagHigh1 が青色光依存的に二量体を形成し、それに伴って内在性の PI3 キナーゼが細胞膜へと動員され、細胞膜上の PI(4,5)P₂ をリン酸化し PI(3,4,5)P₃ が産生される、という原理である (図 4 A)。これらの分子プローブを、PI(3,4,5)P₃ の産生を可視化する蛍光プローブと同時に哺乳類細胞に共発現させ、青色光照射を行った。その結果、蛍光プローブの青色光照射依存的な細胞膜への動員、すなわち細胞膜局在化が観察された (図 4 B)。したがって、Magnet は細胞内シグナル伝達の光操作を実現する光スイッチタンパク質として機能することが明らかとなった。また、同様のアプローチで、細胞骨格の制御に関与するいくつかのタンパク質 (Rac1 や Cdc42, Akt1) を制御するための光駆動型分子プローブを開発し、それらが導入された細胞を局所的に光照射した結果、照射領域のみの細胞膜突出 (ラメリポディア形成) が確認された。したがって、Magnet は多様な細胞内シグナル伝達の光操作を実現する、非常に頑強で汎用性の高い光スイッチタンパク質として機能することが明らかとなった。

【研究 2：光スイッチタンパク質のキネティクスを劇的に向上させる為の方法の創案】

【光受容体の光応答による活

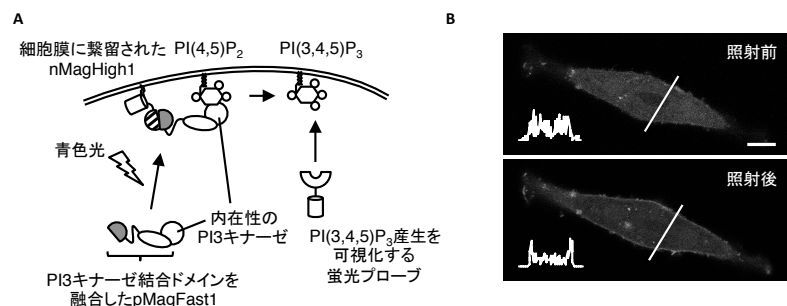


図4. PI(3,4,5)P₃産生を制御する光駆動型分子プローブ

性化持続時間の問題点】 天然に存在する光受容体を基に光操作技術を開発する際の大きな問題点として、光応答による活性化の持続時間が挙げられる。天然に存在する光受容体のほとんどは、光応答後の活性化が、数十分から数十時間にわたって持続することが知られている。このことは、ラパマイシンの不可逆的な細胞内拡散が起こる CID 法と同様に、標的とするタンパク質の活性状態、すなわち ON/OFF を自在に制御することが困難である。光を照射している間や領域でのみ、標的タンパク質の活性を ON にし、光遮断後や照射領域から外れた場合は直ちに OFF 可能な、活性化の持続時間が劇的に短い光スイッチタンパク質の開発は、高い時空間分解能で光操作を実現するための、光遺伝学分野の大きな課題のひとつである。そこで本研究では、次に、天然に存在する光受容体の持つ光反応サイクルに着目し、遺伝子工学的アプローチに基づいて、光反応サイクルが劇的に短縮した光スイッチタンパク質の開発を行った。

【光反応サイクルの短い変異体を効率的に単離可能なスクリーニング系の構築】 天然に存在する多くの青色光受容体は、補因子とシステイン残基間の共有結合形成が重要であり、光反応サイクル、すなわち光応答による活性化の持続時間は、補因子-システイン間の共有結合が切断される時間に依存することが明らかになっている。本研究では、まず、青色光受容体が有する光反応サイクルが蛍光イメージングによって簡便に検出可能であることを明らかにした。そして、蛍光イメージング技術と大腸菌クロニング技術を組み合わせることで、光反応サイクルが変化した変異体ライブラリーの中から、光反応サイクルの短い変異体を効率的に単離可能な新規スクリーニング系を構築した。

【非常に速い光反応サイクルを有する光スイッチタンパク質の開発】 本スクリーニング系の有用性を実証する為に、光操作技術で最も利用されている植物由来の光受容体 phototropin1 の光受容ドメイン (AsLOV2) をモデルタンパク質として、非常に速い光反応サイクルを有する光スイッチタンパク質の開発を行った。光反応サイクルに影響する補因子周辺のアミノ酸残基 7 カ所にランダム変異を導入し、形質転換された大腸菌コロニーのスクリーニングを実行した。20,000 コロニーのスクリーニングを行った結果、 1.28×10^9 存在する変異体候補の中から、12 の変異体が単離された。最も速い蛍光回復を示したいくつかの変異体の中で、V416T 変異体を代表として、タンパク精製ならびに吸光度測定を行った結果、野生型 AsLOV2 (time constant $\tau = 55$ 秒) より、21 倍短い光反応サイクル (time constant $\tau = 2.6$ 秒) を示すことが明らかとなった。また、この変異体は、これまで報告されている AsLOV2 の光反応サイクル変異体の中で、最も短い光反応サイクルを示すことが明らかとなった。AsLOV2-V416T が光スイッチタンパク質として機能するかどうかを確認するために、光駆動型分子プローブの開発を行った結果、AsLOV2-V416T は目的タンパク質の青色光照射依存的な細胞膜への動員と光遮断後の非常に速い細胞質への拡散を操作できることが明らかとなった。したがって、AsLOV2-V416T は現存する光操作技術の中で、最も高い時空間分解能を実現する光スイッチタンパク質と成り得ることが明らかとなった。

【まとめ】 本研究では、天然の光受容体を遺伝子工学的アプローチに基づいて改変し、汎用性や実用性、頑強性の高い二量体形成型光スイッチタンパク質 Magnet を開発するとともに、光スイッチタンパク質のキネティクスを劇的に向上させる為の方法を開発した。なお、この方法は Magnet のみならず様々な光受容体に応用可能である。本研究で開発した光スイッチタンパク質とそれに基づくタンパク質の光操作技術は、既存の関連技術の抱える問題点を克服し、オプトジェネティック (光遺伝学) に革新的な進歩をもたらすことが期待される。