

論文の内容の要旨

Development of photoactivatable heterotrimeric G-proteins and an affibody-based engineered system to switch cellular processes

(光駆動型ヘテロ三量体 G タンパク質及び Affibody に基づく細胞操作技術の開発)

兪 改改 (YU Gaigai)

生命現象を光で操作する技術は近年大きな発展を遂げている。しかし、細胞で最も重要なシグナル分子の一つである三量体 G タンパク質の光操作はまだ報告されていない。本研究の前半は、二種類の三量体 G タンパク質 α サブユニットをマルチカラーで光操作し、それぞれ異なる細胞機能を制御することに成功した。本研究の後半は、affibody に基づいて、従来の技術では実現できなかった、一つの刺激により二つのタンパク質を活性化させる新しい細胞操作技術を開発した。このシステムの開発により、従来の技術では解明できなかった、より複雑な生命機能の解明が期待できる。

1. マルチカラーでの三量体 G タンパク質の光操作技術の開発

セカンドメッセンジャーは細胞内の情報伝達物質として重要な分子である。例えば、セカンドメッセンジャーの一つである Ca^{2+} は、筋肉の収縮、炎症などの様々な生命活動を支えている。一方、セカンドメッセンジャーの cAMP はタンパク質キナーゼの活性化を通じて脂肪分解などの生物過程をコントロールし、脳での記憶に関しても大きな役割を果たしていることが分かっている。細胞内では複雑なシグナル伝達が働いているが、その中の一つは G タンパク質共役受容体 (GPCR) によるシグナル伝達である。細胞外の情報伝達物質が G タンパク質共役受容体に結合すると三量体 G タンパク質が活性化される。その後、エフェクタータンパク質に接近、相互作用をすることで、エフェクタータンパク質を活性化する。さらにエフェクタータンパク質はセカンドメッセンジャーを産生し、細胞機能の活性化を誘導する(図1-1)。

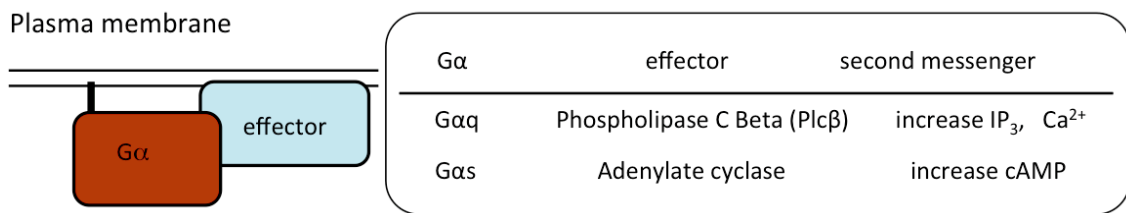


図1-1: Gα タンパク質の種類及び制御するセカンドメッセンジャー。

この研究では青い光で制御できる Magnet システムと赤い光で制御できる PhyB/PIF6 システム(図1-2)を用いて、光刺激で三量体 G タンパク質の α サブユニット(Gα)を操作することにより、細胞中のセカンドメッセンジャーを光刺激で誘導する。

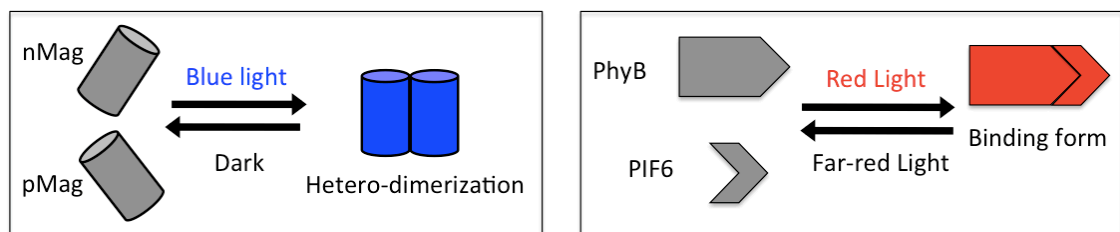


図1-2: (左)青色光スイッチ Magnet システム; (右)赤色光スイッチ PhyB/PIF6 システム。

コンセプトとして(図1-3)、まず膜局在配列を使って、光スイッチタンパク質 A を膜に局在させる。そして A の結合相手である B に Gα を繋ぎ、細胞質に存在させる。光を照射することで、A と B が結合し、B に繋いだ Gα が細胞質から膜へ動き、さらに近傍にあるエフェクタータンパク質を活性化し、セカンドメッセンジャーである小分子を誘導する。Gα は何種類が存在し、それぞれ働きが異なる。この研究では二色の光で Gαq 及び Gαs をそれぞれ光操作し、細胞中の Ca²⁺と cAMP の上昇を誘導することができた(図1-4)。セカンドメッセンジャーは細胞において重要なシグナル分子であり、様々な生命現象に関わっている。本研究で開発した光操作技術により、多様な細胞機能の操作を実現できると考えている。

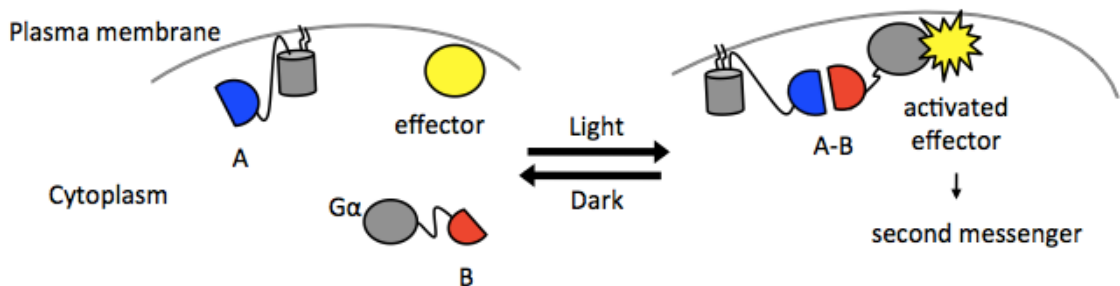


図1-3: 光でセカンドメッセンジャーを誘導するシステム。

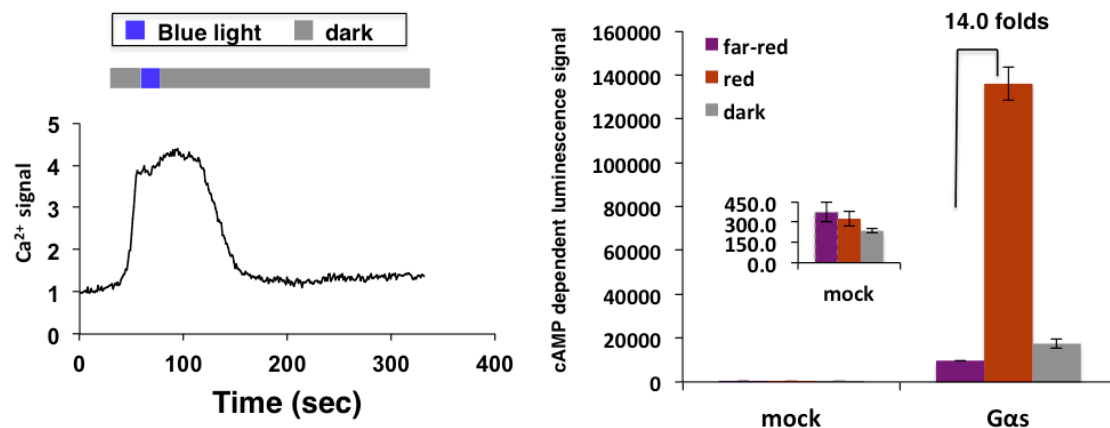


図1-4: (左)青い光による Ca^{2+} 上昇; (右)赤い光による cAMP 上昇。

2. Affibody に基づく細胞操作技術の開発

まず、筆者は Ribosome Display を用いて Affibody library をスクリーニングし、バクテリオフィトクロム DrBphP の Photo Sensory Module (DrBphP-PSM) に結合する Affibody (Affi24) を見つけた。Affi24 は DrBphP-PSM に特異的に結合する一方、全長体の DrBphP (DrBphP-FL) とは結合できないことがわかった。この結果は、Affi24 が、HK ドメインが存在すると DrBphP には結合せず、HK ドメインを失うと DrBphP に結合する Affibody であることを示している。この Affi24 の特長を利用するために、DrBphP-FL に TEV 認識配列を導入し、TEV 誘導型の DrBphP (TEV-inducible DrBphP: TI-DrBphP) を設計した(図2-1)。

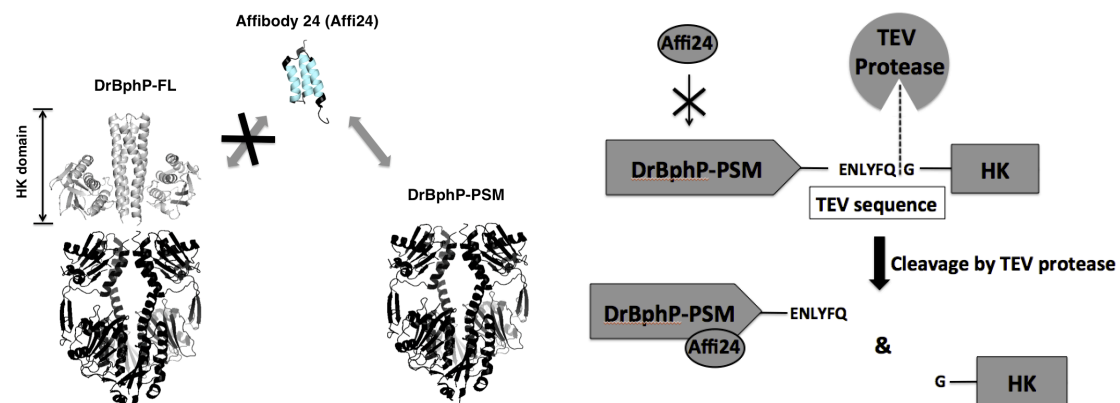


図2-1: (左)Affi24 は DrBphP-PSM に特異的に結合する; (右)TEV 誘導型 DrBphP (TI-DrBphP)。

さらに、TEV タンパク質を分割し、化合物もしくは光で誘導できる二量体タンパク質と融合することで、化合物誘導型 TEV (chemically activatable TEV: CA-TEV) と、光誘導型 TEV (photoactivatable TEV: PA-TEV) を作製できることを示した(図2-2)。

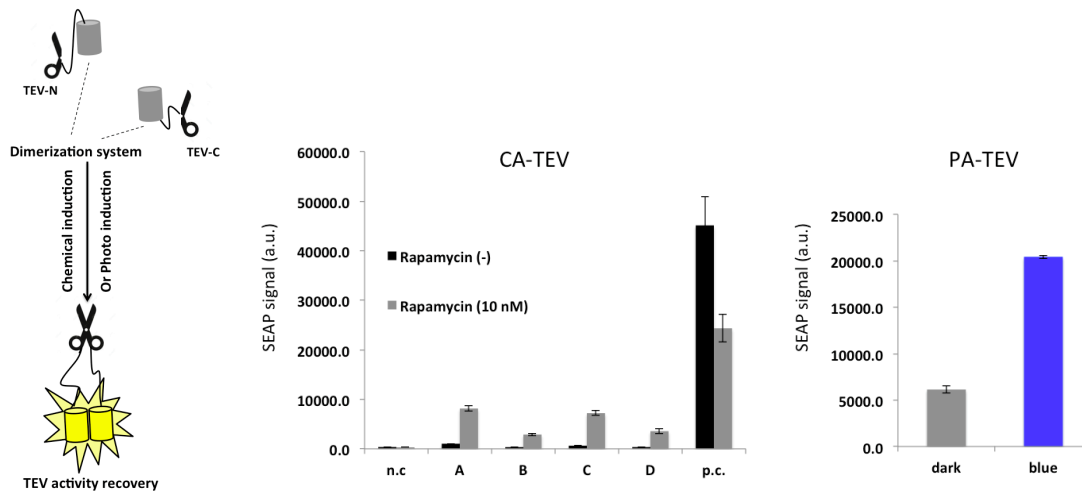


図2-2: CA-TEV および PA-TEV。

TI-DrBphP と CA-TEV/PA-TEV を用いると、一種類の刺激(化合物もしくは光)のみで、二種類の目的タンパク質(POI)の操作が同時に実現可能となる(図2-3)。例えば、赤い蛍光タンパク質 RFP を POI-1 とし、黄色の蛍光タンパク質 YFP を POI-2 とする。TI-DrBphP には、さらにヒストンと細胞膜局在化配列(MLS)を繋ぐ。なお、ヒストンの方が MLS よりも局在化能が高い。従って、刺激する前では、RFP と YFP はそれぞれ核と細胞質に存在する。刺激を与えると、TEV の活性により TI-DrBphP が切断され、RFP と YFP はそれぞれ細胞膜と核にトランスロケーションする。このように、蛍光タンパク質の代わりに局在を変えると活性化できるような目的タンパク質を使えば(例えば、細胞膜で活性化するタンパク質や核で活性化するタンパク質など)、このタンパク質の活性が刺激により制御できる。本研究で開発した技術により、従来技術では不可能だったマルチタスクの同時制御が実現可能になる。

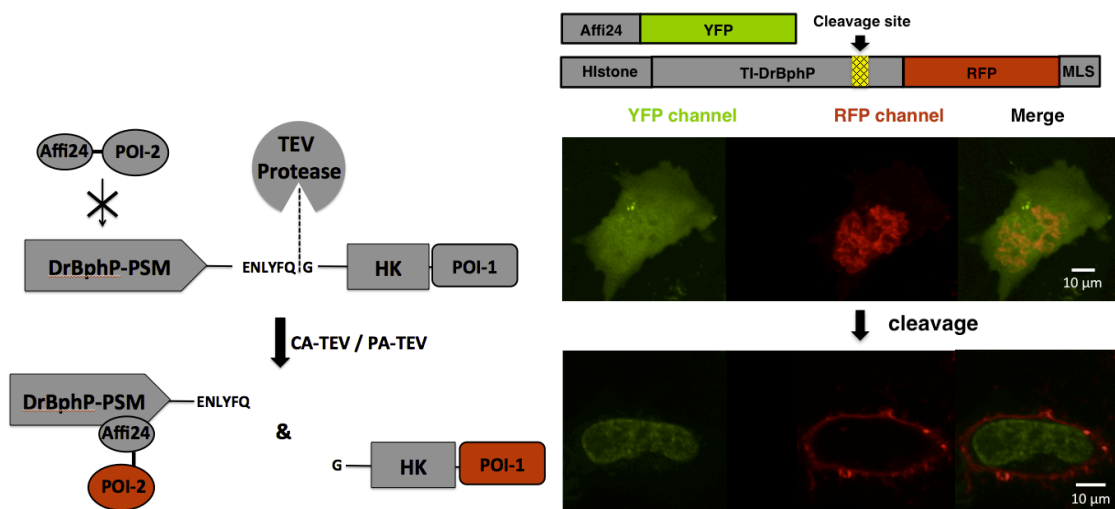


図2-3: Affibody に基づく TI-DrBphP システムは同時に二種類タンパク質が制御できる。