

## 論文の内容の要旨

論文題目：

可逆的 CID system を用いたシグナル分子の核内外局在制御法の開発

氏名：粕谷有沙

### 【背景】

Chemically Inducible Dimerization (CID) system とは、小分子薬剤を介して二つのタンパク質が二量体化する現象である。小分子薬剤 rapamycin を dimerizer として FKBP と FRB が結合する FKBP-FRB system はその代表であり<sup>1</sup>、例えば FKBP と Rac 活性化因子である Tiam1 を結合させた分子を細胞質に、FRB を細胞膜に発現させた細胞へ rapamycin を添加すると、細胞膜上で Rac が活性化される<sup>2</sup>(Fig. 1)。CID system は小分子薬剤をスイッチとする on rate の速さと、遺伝工学的に作成されるタンパク質ツールの標的選択性の高さを併せ持つ摂動系であることから、細胞内のシグナル伝達を理解する上で強力なツールとされてきた。しかし、従来の CID system は不可逆であり、本来シグナル伝達で見られる一過的な活性化や時間的振動を再構築出来ないことが課題であった。例えば p65 などの一部の転写因子では核細胞質間で局在が繰り返し変動することが知られており、その振動パターンが発現遺伝子群の選択において重要であることが示唆されている(Fig. 2)<sup>3,4</sup>。このように振動を伴ったシグナルネットワークの解明のためには、振動を再構築可能な摂動法の確立が期待されている。

### 【目的・戦略】

私は本学修士課程において、可逆的 CID system の構築を達成している。可逆的 CID system は、可逆的に結合する一本鎖抗体 5D4<sup>5</sup> と dinitrophenyl 類縁体(以下タンパク質 A と小分子 a) のペア、不可逆的に結合する HaloTag protein と HaloTag ligand (以下タンパク質 B と小分子 b) のペアから構成される。小分子 a, b をリンカーを介して結合させたものを dimerizer、

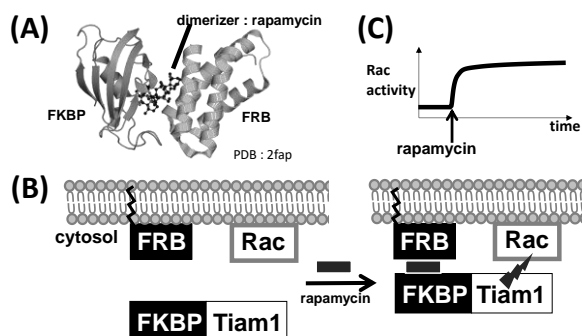


Fig. 1 (A) FKBP-FRB system. (B, C) Activation of Rac using FKBP FRB - system<sup>2</sup>.

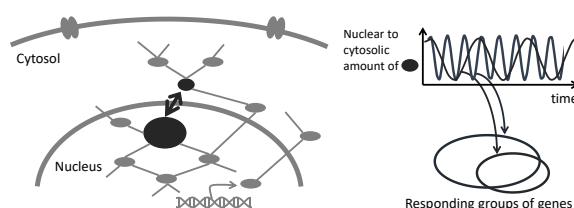


Fig. 2 The patterns of nucleocytoplasmic shuttling of signaling molecules are suggested to be important in determination of the groups of genes to express.

小分子 a を competitor とし、これら小分子薬剤の添加と washout によってタンパク質 A, B の二量体化と解離を生細胞内で sec~min のタイムスケールで繰り返し誘起可能である。本研究ではこの独自に確立した可逆的 CID system を応用することでタンパク質の核内外局在を繰り返し制御可能な系を構築することとした。

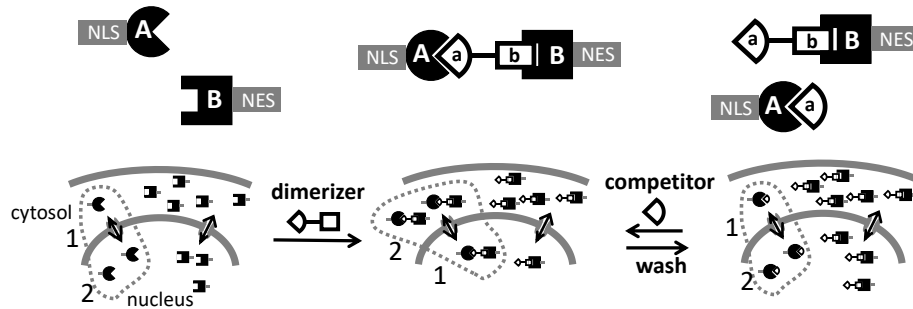


Fig. 3 Strategy of our CID-based system for controlling the nucleocytoplasmic shuttling of proteins.

## 【結果】

### ① CID タンパク質の核内外局在の制御

はじめに、小分子薬剤により制御される二量体化によって CID タンパク質の核内外局在を操作可能であるか調べるために、CID タンパク質 A と B にそれぞれ NLS、NES のいずれかを付与したタンパク質を系統的に設計し、任意の組み合わせで HEK293T 細胞に発現させた。これにより、NLS、NES 付与の位置や個数に応じて、dimerizer 添加前のタンパク質の核内外局在の割合や、添加による局在の変化幅が異なることが明らかとなった。また、二量体化によって核外へのタンパク質輸送を惹起することに適した組み合わせを見出すことに成功した(Fig. 4A)。この組み合わせを用いると、competitor 添加と washout によって、min~hr のタイムスケールで可逆的に局在を制御可能であることが示唆された(Fig. 4B)。

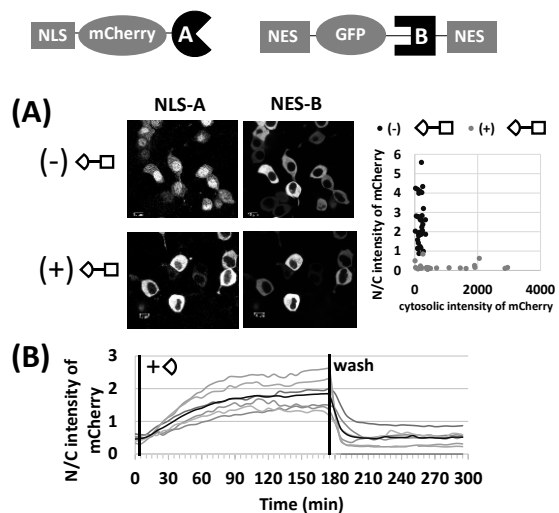


Fig. 4 Effects of (A) addition of dimerizer, (B) competitor and washout on nuclear to cytosolic intensity of mCherry in (A) HEK293T and (B) HeLa cells expressing NLS-mCherry-5D4 and NES-GFP-Halo-NES.

### ② 可逆的 CID system による人工転写因子 tTA の核内外局在制御

続いて本手法を転写因子に適用可能であるか調べるために、CID タンパク質 A に人工転写因子 tTA を付与し、B に NES タグを付与して発現させた。タイムラプスイメージングより tTA コンストラクトの局在を追跡すると、薬剤添加と washout により min~hr のタイムスケールで可



きがあるものの、本手法を用いて過剰発現 p65 の核内外局在の制御が可能であり、下流遺伝子発現を変動させることが可能であることが示唆された。

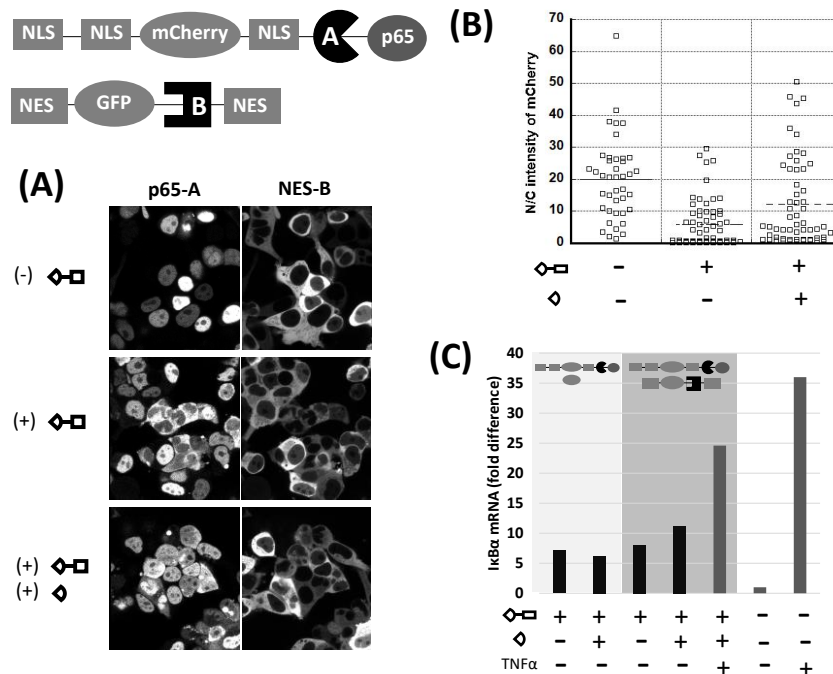


Fig. 6 (A, B) Effects of addition of dimerizer and competitor on N/C intensity of mCherry. (C) The increase of the amount of nuclear p65 caused by our system raised the expression level of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mRNA.

【総括・展望】 我々が開発した可逆的 CID System に NLS、NES を組み合わせることで、CID タンパク質に付与して発現させたシグナル分子の核内外局在を、薬剤添加と washout によって可逆的に操作可能な手法の開発を達成した。操作範囲は薬剤濃度や NLS、NES 付与方法の検討によって調整可能であることが示唆された。P65 に関する検討で得られた結果のように細胞間でのばらつきが見られる場合には、イメージングにより一つ一つの細胞で核内外局在の変化と下流応答を調べるのが望ましいと考えている。シグナル分子によっては内在性分子の影響で操作に制限を受ける可能性があるため、その場合にはノックダウンを行う等の解決策を模索しながら、今後核内外を振動するシグナル分子を含んだシグナルネットワークについて解明するための実験手法として用いられることが期待される。

【参考文献】 1. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **465**, 409–417 (2013) 2. *Nat. Methods* **2**, 415–418 (2005) 3. *Elife* **5**, 1–38 (2016) 4. *Science* **324**, 242–246 (2009) 5. 廣瀬謙造、浅沼大祐、並木繁行、田中理恵子. 特願 2017-7952・新規蛍光標識方法 6. *Cell* **132**, 344–362 (2008) 7. *Genes Dev.* **6**, 2664–2665 (1992)