

蛋白質ラベル化の光制御法の開発と生命システムの理解

(東北大多元研) 小和田 俊行

Development of optical control methods for protein labeling and understanding of biological systems (*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University*)
Toshiyuki Kowada

Since many intracellular proteins function at specific times and locations, optical control of protein localization is one of the important technologies for understanding complex biological systems. We have so far developed a caged protein dimerizer, CBHD, to achieve optical control of protein localization in cells. Recently, we also developed a reversible photo-regulation method of protein localization based on the photo-reversible protein labeling technology using a photochromic dimerizer, pcDH, and established a photo-regulation method for mitophagy induction.

Keywords : Photochromism; Protein labeling; Protein-protein interaction; Fluorescence imaging; Mitophagy

細胞内で多くの蛋白質は特定の時間・場所でその機能を発現している。したがって、細胞内蛋白質の人為的な局在制御法は、蛋白質機能の解明やシグナル伝達経路の詳細解析のための有力なツールである。その代表的な手法として、光受容蛋白質を用いるオプトジェネティクスがあり、光刺激の程度・時間を調節することで、同一のシグナル伝達経路で異なる細胞応答を誘起可能であることが示されている。しかし、既存の蛋白質局在の光制御法には、蛋白質複合体の形成・解離の光可逆性、複合体の解離速度、標的蛋白質の機能を阻害する蛋白質ドメインサイズ、などの点について課題が残されている。

これらの課題を克服し、オプトジェネティクスを補完する技術を開発するために、我々はこれまでに蛋白質ラベル化の光制御法の開発に取り組んできた。そのうちの1つが、ケージド蛋白質二量化剤 (CBHD) を用いた細胞内蛋白質局在の光制御法である (図 1a)¹⁾。本技術では、 β ラクタマーゼ変異体 (BL-tag) と HaloTag の光照射依存

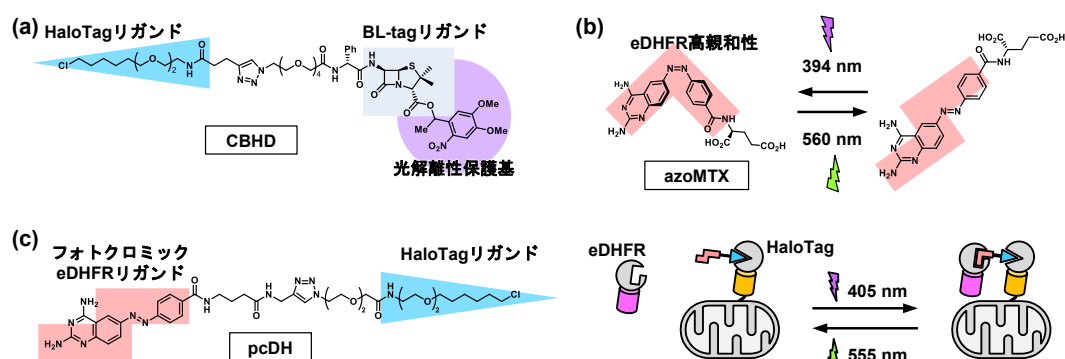


図 1. (a) ケージド蛋白質二量化剤 CBHD. (b) eDHFR に対するフォトクロミック阻害剤 azoMTX. (c) フォトクロミック蛋白質二量化剤 pcDH と蛋白質ヘテロ二量化の光制御の概念図.

的な二量体形成が可能であり、形成された二量体は CBHD を介して共有結合で連結されるため、細胞内で安定に維持される。

さらに我々は可逆的システムの構築を目指し、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) に対するフォトクロミック阻害剤 (azoMTX) を開発した (図 1b)²⁾。紫外～可視光照射によるアゾベンゼン骨格の可逆的な光異性化を利用することで、azoMTX の eDHFR に対する親和性を光制御可能であった。そこで我々は、azoMTX を蛋白質タグ (eDHFR) のフォトクロミックリガンドとして用いることで、哺乳動物細胞内における蛋白質ラベル化の光制御法が構築可能であると考え、フォトクロミック蛋白質二量化剤 (pcDH) を開発した (図 1c)³⁾。pcDH を用いることで、生細胞内で eDHFR と HaloTag の会合・解離を紫色・緑色光照射により繰り返し制御可能であった (図 2)。また、蛋白質局在の変化に要する時間は会合・解離ともに 1 秒未満であり、既存の技術と比較しても十分早いことが明らかとなった。さらに我々は、本技術の可逆性・迅速制御性は細胞内シグナル伝達の制御に応用可能であると考え、マイトファジーの分子機構理解にむけたマイトファジー光誘導法の確立に取り組んだ。本講演ではその詳細を議論するとともに、ヒト由来培養細胞の内在性 DHFR (hDHFR) に対する親和性を低下させた、eDHFR 選択的リガンドの開発⁴⁾についても併せて紹介する。

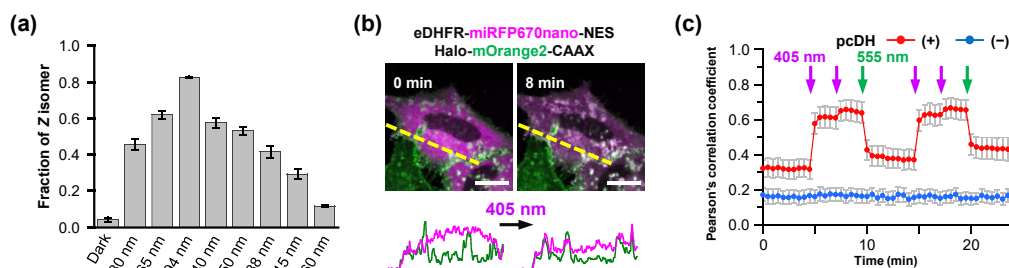


図 2. (a) 光定常状態における pcDH の Z 体の比率. (b, c) pcDH を用いた生細胞内蛋白質局在の光制御. 紫光照射により eDHFR 融合蛋白質が細胞質から細胞膜内葉へと移行する様子の共焦点顕微鏡画像 (b) とピアソン係数 (共局在の指標) の時間変化 (c).

- 1) T. Kowada, K. Arai, A. Yoshimura, T. Matsui, K. Kikuchi,* S. Mizukami,* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 11378.
- 2) T. Mashita, T. Kowada, H. Takahashi, T. Matsui, S. Mizukami,* *ChemBioChem* **2019**, 20, 1382.
- 3) T. Mashita,[†] T. Kowada,[†] H. Yamamoto, S. Hamaguchi, T. Matsui, S. Mizukami,* *ChemRxiv* **2022**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2022-7vq8s.
- 4) H. S. Sarkar,[†] T. Mashita,[†] T. Kowada,[†] S. Hamaguchi, T. Sato, K. Kasahara, N. Matubayasi, T. Matsui, S. Mizukami,* *ACS. Chem. Biol.* **2023**, *accepted*.

([†] Equal contribution)