

標的タンパク質を取り込む小分子誘導型相分離システムの開発

(名工大工¹・名工大院工²) ○深谷 陽子¹・吉川 優²・鈴木 祥央²・波多野 結香²・築地 真也^{1,2}

Development of a small molecule-inducible phase separation system for target protein sequestration (¹Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology, ²Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) ○Yoko Fukaya¹, Masaru Yoshikawa¹, Sachio Suzuki², Yuka Hatano², Shinya Tsukiji^{1,2}

The ability to rapidly inactivate specific proteins in living cells provides a powerful approach for investigating the mechanism of cell function regulation. In previous work, we developed a chemogenetic system that can recruit target proteins from the cytoplasm to synthetic condensates by the addition of a small molecule, enabling enforced protein activity sequestration. However, in the previous system, access of the target protein to the deep region of the condensate was difficult due to the low dynamic fluidity of the condensate. Here we present a new small molecule-inducible phase separation system for rapidly and efficiently sequestering target proteins inside synthetic condensates in living cells.

Keywords: chemogenetics, protein engineering, phase separation, chemically induced dimerization, protein inactivation

細胞内の特定のタンパク質の活性を任意のタイミングで迅速に阻害することのできる技術は、タンパク質の活性と細胞機能の関係を解明するための強力な手法となりうる。タンパク質活性阻害のための最も代表的なアプローチは、小分子阻害剤を用いる薬理学的手法だが、標的的特異的小分子阻害剤の開発はいまなお難しく、阻害剤のないタンパク質の方が圧倒的に多い。そこで当研究室では、既存の小分子リガンドと遺伝子工学を組み合わせることで、さまざまなタンパク質を一種類の化合物で迅速かつ汎用的に阻害できる化学遺伝学的タンパク質活性阻害技術の開発に取り組んでいる。

これまでに当研究室では、自己集合タンパク質の相分離を利用して細胞内に人工オルガネラを構築し、そこへ任意の標的タンパク質を小分子添加によって急速に取り込む(隔離する)ことのできるシステムを開発した^{1,2}。しかし、この人工オルガネラシステムでは、自己集合タンパク質の凝縮によって形成される相分離構造体(人工オルガネラ)の流動性が低く、標的タンパク質を人工オルガネラの内部まで取り込むことが難しかった。そのため、細胞質で機能するタンパク質の活性を完全に阻害できないといった問題があった。

本研究では、上記の問題点を克服する新たなシステムとして、小分子の添加によって相分離構造体の形成と標的タンパク質の取り込みが同時に進行するシステムを開発を行った。二種類のホモオリゴマータンパク質、ラパマイシン化学誘導二量化(CID)システム、および2A自己切断ペプチドを活用することで、ラパマイシン添加に応答して、FKBPもしくはFRBでタグ付けされた標的タンパク質を人工相分離構造体の内部に効率よく取り込むことのできるコンストラクトを開発した。本システムは、さまざまな標的タンパク質のより効果的な活性阻害を可能にするものと期待される。

本発表では、小分子誘導型相分離システムの分子設計、コンストラクト最適化、相分離効率・特性、標的タンパク質取り込み効率などについて詳細を報告する。

- 1) M. Yoshikawa, T. Yoshii, M. Ikuta, S. Tsukiji, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6434.
- 2) M. Yoshikawa, S. Tsukiji, *Biochemistry* **2021**, *60*, 3273.