



細胞内で目的のタンパク質の量を ありのままの姿で操る手法の開発に成功

タンパク質は細胞内の重要な構成要素の一つであり、生体が機能を維持するために必要不可欠な役割を果たしています。タンパク質の発現や構造に異常が生じると、タンパク質が有する機能に破綻が生じ、疾病の発症につながる可能性があります。

基礎生物学や医学などの研究分野では、タンパク質の生体内での役割や機能を研究するために、目的とするタンパク質の細胞内の量を操る技術が頻繁に用いられます。本研究グループはこれまで、細胞内において目的とするタンパク質の量を低分子薬剤の添加により制御する技術を開発してきました。この技術は、遺伝子工学的手法を用い、目的とするタンパク質に、destabilizing domain (DD) と呼ばれる分子を恒久的に融合させるに基づいています。しかし、融合させたDDの存在が、目的とするタンパク質の機能や構造保持に影響を与える可能性が指摘されてきました。

本研究では、このDDを用いた技術に、細胞が元々有しているユビキチン鎖を切断する機構を組み合わせることにより、目的とするタンパク質の量を、余分なものが付加していないありのままの姿で制御する手法の開発に成功しました。

本手法は、従来技術では制御することができなかったタンパク質にも適用でき、基礎生物学のみでなく、遺伝子治療や細胞治療など医学への応用も期待されます。

研究代表者

筑波大学 生命環境系
宮前 友策 准教授

研究の背景

タンパク質は細胞内の重要な構成要素の一つであり、生体が機能を維持するために欠かせない役割を果たしています。タンパク質の発現や構造に異常が生じると、タンパク質が有する機能に破綻が生じ、疾病の発症につながる可能性があります。

基礎生物学や医学の研究分野では、タンパク質の生体での機能や役割を研究するために、目的とするタンパク質の細胞内の量を操る実験手法が頻繁に用いられます。これまで最もよく用いられてきた技術の代表例は、目的とするタンパク質をコードする遺伝子をノックアウトすることで、タンパク質を欠損させる手法が挙げられます。この手法は世界中で多くの研究者が利用する技術ですが、効果が現れるまでに時間を要すること、不可逆的であること、などと言った欠点があります。こうした弱点を克服するため、目的とする分子の量を、翻訳後レベル（注1）で制御する手法の開発が行われており、中でも低分子薬剤を用いる手法は、迅速かつ自在に調節可能な技術として、近年、研究が盛んに行われています。

今回、本研究チームは、責任著者である Prof. Wandless が長年開発してきた destabilizing domain (DD) と呼ばれる分解誘発分子を用いて、細胞の中の目的タンパク質の量を、ありのままの姿で操る技術の開発に取り組みました。

研究内容と成果

Prof. Wandless らが開発している DD は、分子量約 15,000 から 50,000 前後のタンパク質に、人為的に変異を導入し、不安定化を促進したタンパク質のことです。DD は、細胞内に発現させると速やかに分解され、この不安定性は DD に融合させたタンパク質にも伝播します。一方、DD に結合する低分子薬剤を投与すると、薬剤が DD に結合し、DD と融合させたタンパク質全体の構造を安定化させ、分解から保護される特徴を有します。言い換えると、低分子薬剤は、タンパク質発現のためのスイッチを入れる役割を担います（参考図上部）。これにより、目的とするタンパク質を DD に融合させることにより、その細胞内での発現量を、低分子薬剤の容量依存的に自在にコントロールすることができます。しかし、本手法では、目的とするタンパク質に DD を恒久的に融合させる必要があります。その結果、本来細胞が持つタンパク質とは異なる姿になり、対象とするタンパク質によっては、その構造保持や機能に影響が生じる可能性が指摘されてきました。

本研究チームは、この課題を克服するため、細胞が自然に備えているユビキチン鎖を切断する仕組みを利用することを着想しました。ユビキチン（注2）は分子量約 7,600 のポリペプチドであり、通常、細胞内のタンパク質が分解されるための目印として働きます。ユビキチンは、分解に導くタンパク質に一時的に結合した後、そのタンパク質が分解を受ける際、脱ユビキチン化酵素（注3）の働きにより、タンパク質からユビキチンの末端配列が切り離されます。研究チームは、この仕組みを利用して、ユビキチンを、DD から目的とするタンパク質を切り離すための切断因子として用いることを考えました（参考図下部）。

この時、研究チームは二つの工夫を施しました。一つは、ユビキチンが元々有している、分解の目印としての機能を削除するため、全てのリシン残基をアルギニンに置換しました。もう一つの工夫は、ユビキチンが切断される速度を調節するため、末端配列に変異を導入したことです。研究チームが着目した脱ユビキチン化酵素は、細胞内に豊富に存在するため、細胞が元々備えているユビキチンの末端配列の場合、極めて速やかに酵素により認識され、切断されてしまうことが研究の過程で判明しました。もし、末端配列に何も修飾を施していないユビキチン分子を DD と目的タンパク質の間に挿入した場合、DD による分解が生じる前にユビキチン分子が切断され、分解の制御を失うという、研究の前提となる目的を揺るがしてしまう事態に直面しました。研究チームは、脱ユビキチン化酵素による認識に重要とされる、ユビキチ

ンの末端配列の 75 番目の Gly (Gly75: 注 4) に変異を導入して、脱ユビキチン化酵素による切断を遅らせることにより、問題の解決を図りました。

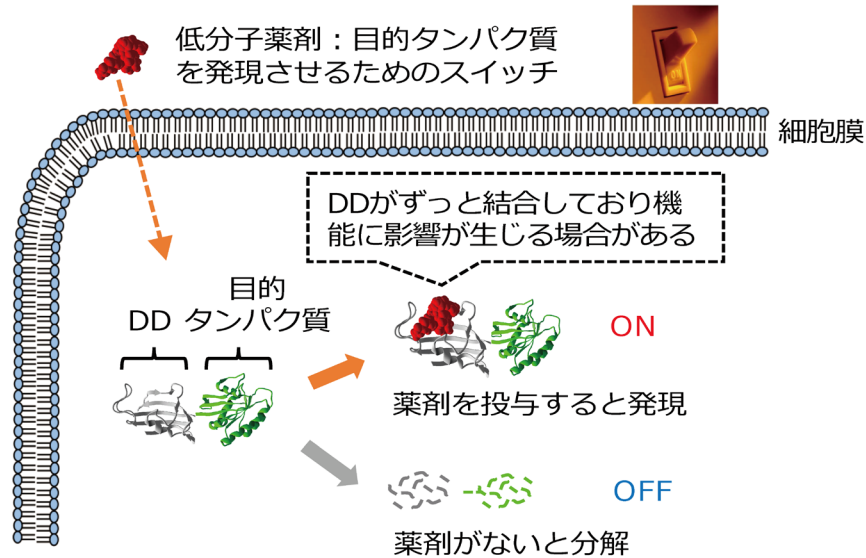
DD を融合させた目的タンパク質が翻訳されてから分解を受けるまで、およそ 15 分から 30 分程度要します。分解の制御を失わないためには、その間、脱ユビキチン化酵素による切断に対して耐性を持たせる必要があります。すなわち、15 分から 30 分程度の間、「部分的に」耐性を持つような変異を、細胞が持つ全アミノ酸一つ一つから探したところ、Gly75 をセリンまたはシステインに置換したときだけ、酵素の切断に対して部分的に耐性を持ち、望む速度で切断されることが分かりました。Gly75 をセリンまたはシステインに置換したユビキチンを、DD と目的タンパク質の間に挿入した融合タンパク質を細胞内に発現させると、低分子薬剤がない状態では、全長タンパク質が速やかに分解されます。一方、低分子薬剤を投与したとき、薬剤が DD に結合して全体が安定化された後、次いで、脱ユビキチン化酵素の働きにより、ユビキチンの末端配列が切り出され、目的タンパク質を DD など他の分子が付加していない「ありのまま」の姿で出現させることができました (参考図下部)。

研究チームは、開発した手法の適用範囲を検証するため、DD を用いるだけでは制御することができなかったタンパク質の安定性や機能を制御できるか調べました。研究チームが注目した SIV-Nef というタンパク質は、アミノ基末端の Gly 残基が脂質修飾されることが、細胞膜表面上で機能を発揮するために必要であることが知られています。この場合、アミノ基末端に DD のような分子が融合していると、脂質修飾が起らず、SIV-Nef は本来の機能を発揮することができません。そこで、DD と SIV-Nef の間にユビキチンの変異体を挿入して細胞に発現させたところ、低分子薬剤がない状態では全長タンパク質が分解され何も起きませんが、薬剤を加えたときだけ、全長タンパク質が発現した後、SIV-Nef が切り出されてその機能を発揮することが実証されました。

今後の展開

DD は、低分子薬剤の投与をスイッチとして、目的タンパク質の発現を薬剤の投与量依存的にコントロールできることが最大の利点です。この利点を生かし、アメリカ大手製薬メーカーが細胞治療や遺伝子治療において、免疫応答に関連するタンパク質の発現量の制御に利用するための研究に着手しています。ある種の免疫応答は、細胞膜表面上で生じる場合がしばしばあり、そうした場合、タグ分子 (注 5) の存在は目的タンパク質の機能発現に影響がある可能性が懸念されます。今回の研究で開発した手法を用いることができれば、低分子薬剤を投与したときだけ、目的タンパク質の発現量をありのままの姿で出現させることができ、その機能を発揮することができると考えられます。研究チームは今後、分解や切断効率の向上に取り組むとともに、ゲノム編集技術を用いて内在的なタンパク質に対して制御可能か検証し、手法のさらなる利便性の向上を行っていく予定です。

従来技術 : Destabilizing domain (DD)



今回の研究

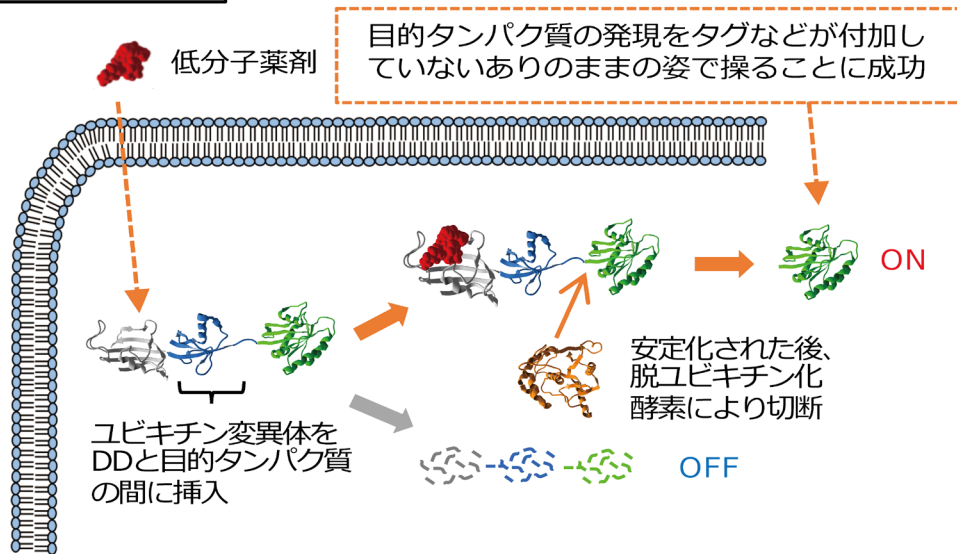


図 従来技術と本研究で開発した手法の概念図

Destabilizing domain (DD)を利用したタンパク質制御技術では、低分子薬剤を発現のためのスイッチとして投与し、その投与量依存的に発現量を制御できる一方、DD を目的タンパク質に接続し続ける必要があります。その機能に影響が生じる場合があります（上部）。今回の研究では、ユビキチンを DD と目的タンパク質の間に挿入し、末端配列に変異を導入して切断速度をコントロールすることにより、低分子薬剤により安定化された後、目的タンパク質を出現させることに成功しました（下部）。これにより、目的タンパク質の発現を、余分なものが付加していないありのままの姿で操ることができます。

用語解説

- 注1) **翻訳後レベル** 細胞内の全てのタンパク質は、DNA から RNA に転写された後、アミノ酸配列 に翻訳されて初めて、細胞内に出現する。古典的に用いられている手法では、目的とするタンパク質の発現を遺伝子レベルでノックアウトするが、今回の手法ではタンパク質の発現のオン・オフを「翻訳された後」に制御する。これにより、迅速かつ正確なコントロールが可能になる。
- 注2) **ユビキチン** 分子量約 7,600 のポリペプチドのこと。細胞内のタンパク質分解の目印として働き、分解が終わったあとは、脱ユビキチン化酵素によって切り出される。今回の研究では、切り出される仕組みに注目し、切断のための目印として利用した。
- 注3) **脱ユビキチン化酵素** タンパク質の分解が終わったあと、分解されるタンパク質からユビキチンを切り出す酵素タンパク質。ユビキチンのカルボキシ基末端の配列を認識して切断する。細胞内に豊富に発現している。
- 注4) **Gly** アミノ酸残基のグリシンの略称。
- 注5) **タグ** 特定のタンパク質の目印（荷札、タグ）として、遺伝子工学的に融合させたペプチド分子のこと。性質に応じて、タンパク質の精製、検出、可視化などに利用される。今回の研究では、destabilizing domain を分解のためのタグとして用いている。

掲載論文

【題 名】 A Method for Conditional Regulation of Protein Stability in Native or Near-Native Form
(タンパク質の安定性を未修飾または未修飾に極めて近い状態で制御する手法)

【著者名】 Yusaku Miyamae^{1,2}, Ling-chun Chen¹, Yuki Utsugi³, Helen Farrant¹, Thomas J. Wandless¹

¹Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, ²Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, ³Master's/Doctoral Program in Life Science Innovation, University of Tsukuba

【掲載誌】 Cell Chemical Biology

【掲載日】 2020年10月1日

【DOI】 10.1016/j.chembiol.2020.09.004

問い合わせ先

【研究に関すること】

宮前 友策 (みやまえ ゆうさく)

筑波大学生命環境系 准教授

URL: <https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003934>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp