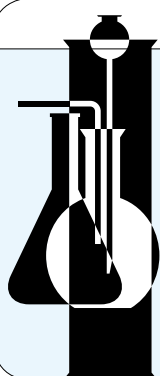


実験講座



細胞内シグナル分子を特異的に活性化 する新ツール“SLIPT”

築地 真也

Key words : 細胞内情報伝達, シグナル分子, 細胞膜, 局在移行, SLIPT

細胞内の狙ったシグナル分子を素早く特異的に活性化することのできるツールは、細胞内情報伝達的作用機序解明や人工操作のための強力な基盤技術となる。筆者らはそのような細胞内シグナル分子活性化のための新しいケミカルバイオロジーツール“SLIPT”を開発した。本稿では、細胞膜内葉(インナーリーフレット)を起点とする様々なシグナル分子やシグナル経路を自在に活性化することのできる“SLIPT-PM システム”を中心に、その基本原理から、特徴、使用方法、実施例について概説する。

I. 細胞内シグナル分子の特異的活性化技術の重要性

はじめに、なぜ細胞内シグナル分子の活性化技術が重要かについて説明したい。細胞が刺激(入力)を受けると、細胞内の様々な情報伝達経路が活性化する。細胞はそれらの多重のシグナル・情報を統合・処理することで、増殖、分化、分泌、遊走などの細胞応答(出力)を引き起こす。近年、蛍光イメージング技術の進歩により、細胞内の様々なシグナル分子が、いつ、どこで、どれくらいの時間、活性化するのかといった情報伝達ダイナミクスに関する理解が深まり始めている。一方、シグナル分子群が制御する情報伝達ネットワークと細胞応答との関係を解明するためには、蛍光イメージングのような“見る”技術だけでは不

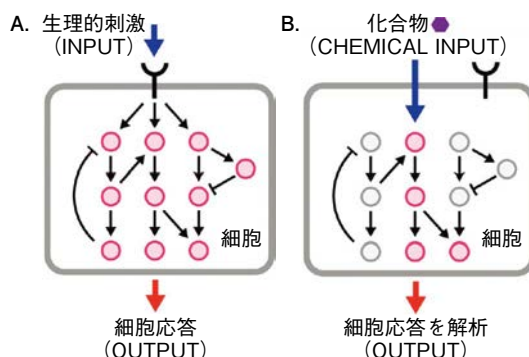


図1 細胞内シグナル伝達システム

- A. 生理的刺激では複数以上のシグナル分子・経路が同時に活性化される。
B. 化合物で特定のシグナル分子・経路を特異的に活性化するアプローチ

十分である。先にも触れたように、細胞は刺激を受けると、受容体の下流で複数のシグナル分子やシグナル経路が同時に活性化される(図1A)。そのため、ある特定のシグナル分子の活性ダイナミクスをイメージングによって明らかにしたとしても、そのシグナル分子の活性が、対象とする細胞応答を直接誘導しているのかわかりにくい。そこで重要になるのが、シグナル分子の“活性化を誘導する”技術である。細胞内の特定のシグナル分子を、化合物のような人工的な刺激で、素早く特異的に活性化することができれば、その活性化によって引き起こされる下流の情報伝達プロセスや細胞応答をリアルタイムに解析すること

SLIPT: a new tool for target-specific activation of intracellular signaling molecules

Tsukiji Shinya : 名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻 (〒466-8555 愛知県名古屋市中区御器所町)

0370-9531/12/¥500/論文/JCOPY

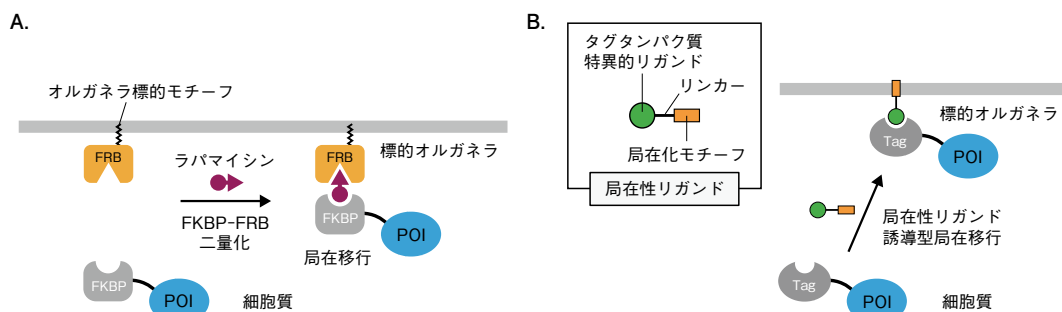


図 2 細胞内シグナル分子の局在移行誘導技術
A. ラパマイシン CID 法, B. SLIPT 法. POI : protein of interest

が可能になる(図 1B)。これにより、そのシグナル分子の情報伝達ネットワークにおける役割を直接的かつ構造的に明らかにすることができる。また、狙ったシグナル分子やシグナル経路を活性化する技術は、細胞の機能や運命を自在に操作するための基盤技術としても有用であり、細胞医薬や細胞工学、合成生物学などへの応用にもつながる。

II. シグナル分子の局在移行誘導

では、どのようにすれば、細胞内のシグナル分子を人為的に活性化できるだろう。最も有効な戦略の一つが、シグナル分子の局在を制御するアプローチである。細胞は、シグナル分子の局在をダイナミックに制御することで、様々な情報伝達プロセスを時空間的に調節している。例えば、細胞が刺激を受けると、Ras の上流因子である SOS (RasGEF) は細胞質から細胞膜へ移行することで、細胞膜内葉上の Ras を活性化する。また、活性化した Ras は下流の Raf キナーゼを細胞膜へリクルートすることで、Raf の活性化を誘導する。このほかにも、細胞内で起こる様々な情報伝達プロセスにシグナル分子の局在移行が関与している。したがって、シグナル分子の局在移行を人為的に誘導することができれば、様々なシグナル分子やシグナル経路を場所(移行先)特異的に活性化することが可能となる。

III. ケミカルダイメライゼーション法

シグナル分子の局在移行を化合物で誘導する技術として、免疫抑制剤ラパマイシンを用いた“CID (chemically induced dimerization) 法”がこ

れまで広く利用されてきた¹⁾(図 2A)。ラパマイシンは、FK506 結合タンパク質 (FKBP) と FKBP-ラパマイシン結合ドメイン (FRB) という 2 つのタンパク質のヘテロ二量化を誘導する化合物である。ラパマイシン CID 法では、対象シグナル分子に FKBP を融合し、それを細胞質に発現させる。一方、相手方となる FRB には局在化配列を融合し、対象シグナル分子を移行させたい細胞内部位にあらかじめ局在させておく。その細胞培養液にラパマイシンを添加すると、FKBP-FRB のヘテロ二量化に伴い、対象シグナル分子が細胞質から標的部位へ移行するというしくみである。局在化配列を選ぶことで、FRB を細胞内の任意のオルガネラに配置することができ、細胞膜内葉をはじめ、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアなどの様々な場所へ FKBP 融合タンパク質をリクルートすることが可能になっている²⁾。

一方、ラパマイシン CID 法には幾つかの問題点がある。まず、ラパマイシンは強力な mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害剤である。そのため、解析対象となるシグナル分子の機能や細胞応答が mTOR 阻害によって(何かしらの)影響を受ける場合には、ラパマイシン CID 法は不向きである。また、ラパマイシンによる FKBP と FRB のヘテロ二量化は極めて強固なため、一度移行させたシグナル分子の局在を元の状態に戻すことができない。つまり、可逆性がない。更に、もう 1 つの短所は、1 種類の対象タンパク質を制御するのに必ず 2 種類のタンパク質 (FKBP 融合タンパク質と標的部位局在型 FRB) を適切な発現量かつ量論比で発現させる必要がある点であ

る。これは必ずしも容易ではない場合が多い。したがって、理想的には、動物細胞に対する生理活性がなく、可逆的で、タンパク質のヘテロ二量化に依存しないタンパク質局在移行誘導ツールが求められる。

IV. SLIPT 法

ここから、筆者らが開発した SLIPT 法について紹介する。SLIPT とは、“self-localizing ligand-induced protein translocation (自己局在性リガンド誘導型タンパク質局在移行)” の略称で、自己局在性リガンド (以下、局在性リガンド) と呼ぶ化合物一つで標的タンパク質の細胞内局在移行を誘導することのできる技術である^{3,4)}。

1. 基本原理・特徴

SLIPT 法では、“タグタンパク質”と“局在性リガンド”のペアを用いる (図 2B)。局在性リガンドは、タグタンパク質に特異的に結合する“リガンド”と、細胞内の特定のオルガネラや膜領域に結合・集積する“局在化モチーフ”を柔軟なリンカーで連結したハイブリッド型 (二官能性) リガンド化合物である。SLIPT 法では、まず、局在を操作したいシグナル分子にタグタンパク質を融合したものを細胞質に発現させる。その後、望みのタイミングで局在性リガンドを細胞培養液に添加する。すると、局在性リガンドは細胞膜を透過後、タグタンパク質に (リガンド部位を介して) 結合しつつ、局在化モチーフが指定する場所へ自発的に集積することで、標的となるタグ融合シグナル分子を細胞質から細胞内の特定の (局在性リガンドが指定する) 場所へ移行させることができる。すなわち、SLIPT 法は前述の CID 法とは異なり、標的タンパク質の局在を“single ligand-single protein”の様式で制御することができる。

2. 細胞膜内葉を標的とした SLIPT-PM システム

細胞機能を制御する情報伝達系のほとんどは、細胞膜受容体の直下、すなわち細胞膜内葉上で活性化される。そのため、細胞膜内葉を起点とするシグナル分子やシグナル経路を特異的に活性化する技術は、細胞内情報伝達の解析において極めて有用である。筆者らは、そのための基盤技術とし

て、細胞膜内葉に対して任意のシグナル分子を移行誘導可能な SLIPT-PM システムを開発した⁵⁾ (図 3A)。このシステムでは、細胞膜内葉に対する局在性リガンドとして、図 3B に示す化合物“m^DcTMP”を用いる⁶⁾。m^DcTMP は、ミリスチン酸を修飾した D 体システイン (myr^DCys) を局在化モチーフとし、これにリンカーを介して小分子トリメトプリム (TMP) を連結した構造をしている。TMP はもともと大腸菌に対する抗生物質として開発された化合物で、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) に対して数 nM オーダーの解離定数で特異的に結合するリガンドである⁷⁾。一方、哺乳類細胞由来の DHFR に対しては親和性が 1,000 倍以上低い。そのため、TMP を母核とする局在性リガンドは、哺乳類細胞内の DHFR による影響は受けず、発現させた eDHFR 融合タンパク質特異的に作用することができる。

また、m^DcTMP 中の myr^DCys モチーフは、タンパク質の翻訳後修飾の一つである S-パルミトイル化を受ける合成モチーフとして機能する⁶⁾。m^DcTMP は細胞膜を透過後、ゴルジ体上のパルミトイル化修飾酵素によって^DCys の側鎖のチオール基がパルミチン酸修飾を受け、細胞膜内葉に対する局在性を示す (図 3C)。一方、m^DcTMP は細胞膜だけでなくゴルジ体にも集積する性質があるため、SLIPT-PM システムでは、eDHFR のループ領域 (Asp69 と Asp70 の間) にリジン残基の 6 回繰り返し (K6) 配列を挿入した“^{iK6}DHFR”をタグタンパク質として用いる⁵⁾ (図 3D)。m^DcTMP に結合した^{iK6}DHFR は、ループ中の K6 配列と、細胞膜内葉に存在するアニオン性脂質 (主にホスファチジルセリン) との静電相互作用により細胞膜局在が安定化され、細胞膜特異的に局在することができる。m^DcTMP/^{iK6}DHFR ペアを基盤とする SLIPT-PM システム (図 3A) は、以下の特徴と汎用性を有する。

実験系のシンプルさ：SLIPT-PM システムでは、細胞膜に移行させたいシグナル分子に^{iK6}DHFR タグを融合したものを細胞に発現させるだけでよい。これは、2 種類のタンパク質の共発現を必要とする CID 法と比較すると、実験系が圧倒的にシンプルである。また、アデノ随伴ウイ

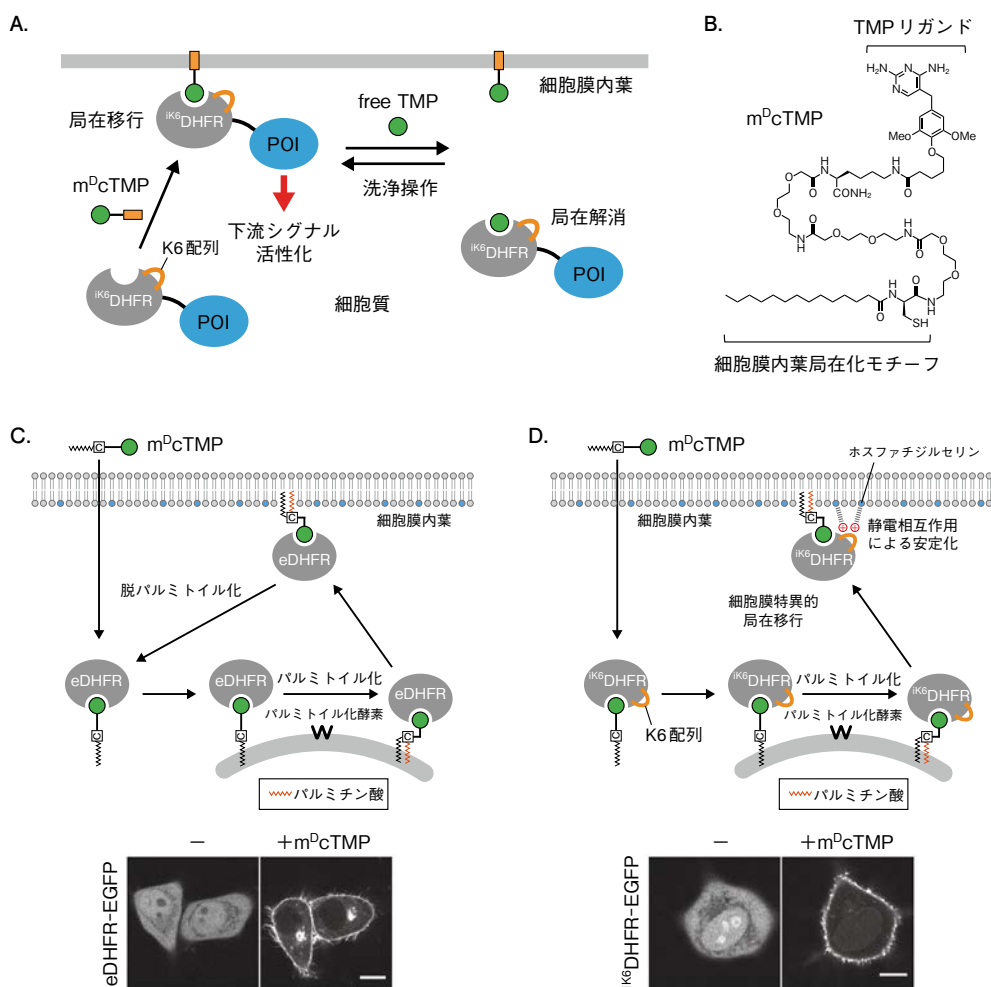


図 3 SLIPT-PM システム

A. SLIPT-PM システムの概略図

B. 細胞膜内葉局在性リガンド m^DcTMP の分子構造

C. パルミトイル化に依存した m^DcTMP の細胞膜局在化と eDHFR の局在移行誘導の原理図。野生型 eDHFR は m^DcTMP によって細胞膜とゴルジ体の両方に局在する。画像は、eDHFR-EGFP の m^DcTMP による局在移行誘導前後の蛍光像。スケールバー：10 μm

D. m^DcTMP による $IK6DHFR$ の細胞膜特異的局在移行誘導の原理図。画像は、 $IK6DHFR$ -EGFP の m^DcTMP による局在移行誘導前後の蛍光像。スケールバー：10 μm

ルス (AAV) ベクターなど、導入できる遺伝子サイズに制限がある遺伝子導入系を用いる場合においても、単一遺伝子の発現で済む SLIPT-PM システムは有効である。なお、 $IK6DHFR$ タグは 165 アミノ酸で、分子量は 18.8 kDa、DNA サイズは 495 bp であり、十分小さい。

融合部位の自由度の高さ： $IK6DHFR$ タグは任意のタンパク質の N 末端、C 末端のいずれに融合してもよい。更には 2 つのタンパク質ドメインの間に挿入してもよく、筆者らが試した限り、どこに

融合しても m^DcTMP に応答して細胞膜特異的な局在移行を示す。この融合部位の自由度の高さは、本技術を様々な構造のシグナル分子の局在制御に応用するうえで大きな利点となる。

素早い応答と局在移行の持続性・可逆性・繰り返し性： m^DcTMP による $IK6DHFR$ 融合タンパク質の細胞膜リクルートは素早く、通常の m^DcTMP 添加濃度条件 (10 μM) では、5 分以内には局在移行が完了する。また、 m^DcTMP によって誘導されたタンパク質の細胞膜局在は安定で、

数時間以上持続する。一方、 m^DcTMP による局在移行誘導後、フリーの(未修飾の)TMP を過剰に添加することで $^{iK6}DHFR$ 融合タンパク質を細胞膜から解離させ、再度細胞質に戻すこともできる(図 3A)。このリバース局在移行の速度は、フォワード局在移行よりも若干遅いものの、およそ 15-20 分間以内には完了する。

更にもう 1 つ、ユニークな特徴を紹介する。本システムでは、 m^DcTMP とフリー TMP を用いて $^{iK6}DHFR$ 融合タンパク質の細胞膜への移行と解離を可逆的に誘導したのち、細胞の洗浄操作を行うと、そのタンパク質を細胞膜へ再度移行させることができる。これは、 m^DcTMP は細胞を洗浄しても細胞内に残るのに対して、フリー TMP は細胞洗浄操作によって細胞内から除去されるためである(図 3A)。したがって、 m^DcTMP によって $^{iK6}DHFR$ 融合タンパク質の細胞膜移行を誘導した後、フリー TMP の添加と洗浄操作を繰り返し行うことで、 $^{iK6}DHFR$ 融合タンパク質を細胞膜と細胞質の間で行き来(シャトリング)させ、下流シグナルを決まった時間パターンで振動させるといったことが可能である。

V. SLIPT-PM システムによる細胞内シグナル分子・経路の特異的活性化⁵⁾

前述の SLIPT-PM システムを用いることで、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)や G タンパク質共役型受容体(GPCR)の直下に位置する様々なシグナル分子やシグナル経路の活性化を自在に誘導できる。本節では、その代表例を紹介しつつ、SLIPT-PM システムを用いるために必要となる具体的な実験デザインを示す。

1. $^{iK6}DHFR$ タグを末端に融合したシグナル分子の細胞膜移行と特異的活性化

SLIPT-PM システムを用いるうえで最も標準的な実験デザインは、細胞膜内葉上で機能を発現する任意のシグナル分子の N 末端もしくは C 末端に $^{iK6}DHFR$ タグ(と蛍光タンパク質)を融合するアプローチである。

タンパク質キナーゼ cRaf は、細胞膜内葉に局在移行することで cRaf/MEK/ERK 経路を活性化

する。そこで、全長の cRaf の N 末端に緑色蛍光タンパク質(EGFP)と $^{iK6}DHFR$ タグを融合した EGFP- $^{iK6}DHFR$ -cRaf を設計し、これを HeLa 細胞内に発現させた(図 4A)。その際、下流の ERK の活性をモニターするために ERK-KTR-mKO プローブを共発現させた。ERK-KTR-mKO は、ERK 活性が低い場合には核内に局在し、ERK 活性が亢進すると(プローブがリン酸化を受けて)細胞質へ移行することで ERK 活性を検出するプローブである⁸⁾。EGFP- $^{iK6}DHFR$ -cRaf は初期状態では細胞質全体に局在していたが、 m^DcTMP を添加すると、素早く細胞膜へ移行する様子が観察された。更に、EGFP- $^{iK6}DHFR$ -cRaf の細胞膜移行に伴って ERK の活性化がみられた。MEK 阻害剤(PD184352)の存在下では EGFP- $^{iK6}DHFR$ -cRaf を細胞膜へリクルートしても ERK の活性化は起こらず、先にみられた ERK の活性化は MEK を経由していることが示された。また、cRaf を持たない EGFP- $^{iK6}DHFR$ の細胞膜移行は ERK 活性に影響を与えず、cRaf の細胞膜移行によって初めて ERK の活性化が誘導されていることも示された。これらの結果から、SLIPT-PM システムを用いて cRaf キナーゼを細胞膜局在化させることで、cRaf/MEK/ERK 経路を活性化できることが示された。

このほかにも、 $^{iK6}DHFR$ タグを末端に融合する戦略で、PI3 キナーゼを用いたホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸[PI(3,4,5)P₃]産生、RasGEF を用いた Ras 活性化、RacGEF を用いた Rac 活性化とラメリポディア形成誘導、Gaq を用いた Ca²⁺ オシレーション誘導、Gas を用いた cAMP 産生誘導など、様々な細胞内シグナル分子やシグナル経路を SLIPT-PM システムによって高汎用的に活性化できることが確認されている。

2. 内部ドメイン置換による m^DcTMP 応答性キメラタンパク質の創製

受容体の刺激に依存して細胞膜に移行するシグナル分子の多くは、活性型受容体のリン酸化チロシン部位に結合する SH2 ドメインや、脂質ジアシルグリセロールに結合する C1 ドメインなど、細胞膜ターゲティング用のドメインを有している。また、これらのドメインはシグナル分子の

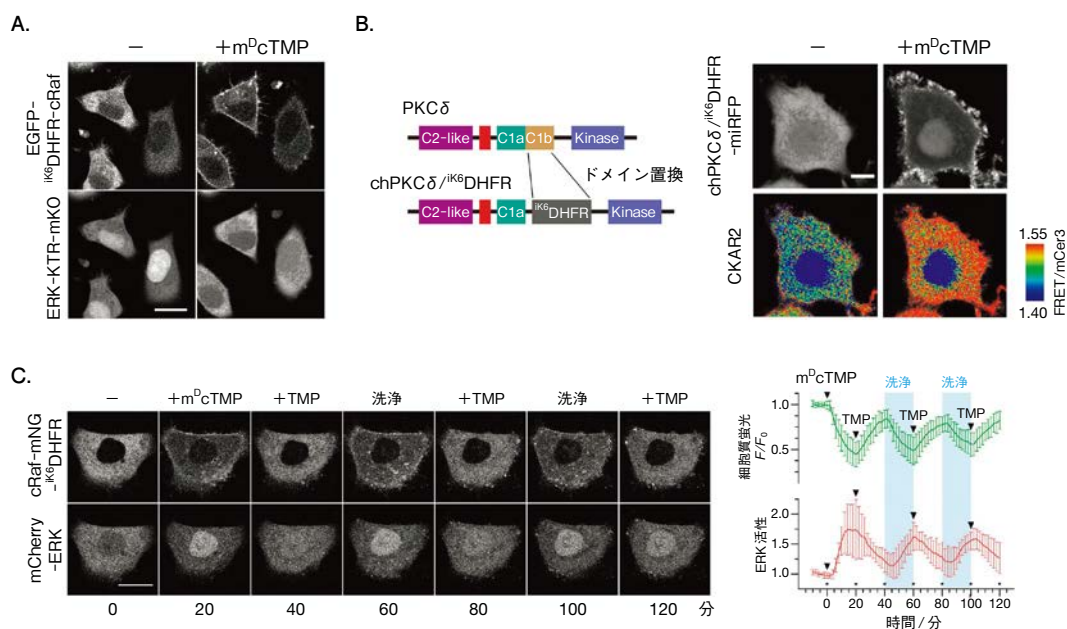


図 4 SLIPT-PM システムによるシグナル分子活性化

- A. cRaf の細胞膜移行による cRaf/ERK 経路の活性化。画像は、EGFP- $iK6$ DHFR-cRaf および ERK 活性検出プローブ (ERK-KTR-mKO) の m^D cTMP 添加前後の蛍光像。スケールバー：20 μ m。EGFP- $iK6$ DHFR-cRaf の細胞膜移行によって ERK-KTR-mKO が核外へと移行した (ERK が活性化したことを示す)。
- B. 内部ドメイン置換によるキメラ PKC δ の創製。左：ジアシルグリセロール結合ドメインである C1b ドメインを $iK6$ DHFR に置換したキメラ PKC δ の設計。右：キメラ PKC δ -miRFP670 および PKC 活性検出 FRET プローブ (CKAR2) の m^D cTMP 添加前後の蛍光像。スケールバー：10 μ m。キメラ PKC δ -miRFP の細胞膜移行によって CKAR2 の FRET 比が増加した (PKC が活性化したことを示す)。
- C. cRaf の細胞膜移行・解消の繰り返し操作による人工 ERK シグナル振動誘導。画像は、cRaf-mNeonGreen- $iK6$ DHFR および ERK 活性検出プローブ (mCherry-ERK) の蛍光像。スケールバー：20 μ m。 m^D cTMP 後、フリー TMP の添加と細胞洗浄操作を繰り返し行うことで cRaf の細胞膜移行と解離を操作し、ERK 活性をオンオフ振動させることが可能であった。

(末端ではなく) 内部に配置されている場合が多い。そのため、そのようなシグナル分子の N 末端や C 末端に $iK6$ DHFR タグを融合した場合、本来の生理的な状態とは大きく異なる配向で細胞膜上に局在化させることになり、そのシグナル分子の機能や活性に予期せぬ影響を与える可能性が懸念される。そこで筆者らは、マルチドメイン構造のシグナルタンパク質をより天然状態に近い配向で細胞膜上に局在化させるアプローチも重要であると考え、末端融合ではなく、内部にある細胞膜ターゲティングドメインを $iK6$ DHFR タグで置き換えることを検討した。

Proof of concept として、プロテインキナーゼ C の δ アイソフォーム (PKC δ) の内部に位置する C1 ドメインを $iK6$ DHFR タグと置換したキメラタンパク質 chPKC δ / $iK6$ DHFR-miRFP670 を設計し、

細胞に発現させた (図 4B)。内部に $iK6$ DHFR タグを有する chPKC δ / $iK6$ DHFR-miRFP670 の場合でも m^D cTMP に応答して細胞膜へ移行し、更にその細胞膜局在化によって PKC 活性が増加した。

筆者らは同様の戦略によって、アダプタータンパク質 Grb2 (SH3-SH2-SH3 ドメイン構造を有する) の真ん中の SH2 ドメインを $iK6$ DHFR タグで置換することで、 m^D cTMP に応答して内在性の SOS を細胞膜へ連れて行くことのできるキメラ型 Grb2 を創製することにも成功している。このように、シグナルタンパク質の内部に位置する細胞膜ターゲティングドメインを $iK6$ DHFR タグで置換する戦略は、SLIPT-PM システムで操作できる人工シグナル分子を設計するうえで有用なタンパク質工学アプローチとなり得る。

3. ERK シグナル振動の人工誘導

近年, ERK や NF- κ B などのシグナル分子の活性が繰り返し変動することが明らかになり, シグナル分子活性の時間的ダイナミクスと細胞機能の関係に注目が集まっている^{9,10)}。シグナル分子活性のダイナミクスがどのようにして細胞機能を制御しているのかを解明するためには, 特定のシグナル分子の活性を望みの時間パターンで可逆的に繰り返し操作する技術が有効である。そこで筆者らは, ^{ik6}DHFR 融合 cRaf の細胞膜移行を繰り返し可逆的に操作することで, ERK シグナルの振動(オシレーション)を人工的に誘導することを試みた。^{ik6}DHFR タグを融合した cRaf (cRaf-mNeonGreen-^{ik6}DHFR) を m^DcTMP によって細胞膜へ移行させたのち, フリー TMP の添加と細胞洗浄操作を繰り返すことで, ERK シグナルをおよそ 40 分間の周期で反復振動させることが可能であった(図 4C)。なお, 本システムでは, TMP によるタンパク質の細胞膜局在解消と, 洗浄操作による細胞膜への再局在化にそれぞれ 20 分間程度かかる。そのため, シグナル分子活性化の周期をより早くするのは難しいが, TMP 添加と洗浄操作のタイミングを調節することで, シグナル活性化の持続時間や頻度(周波数)を人為的に制御することが可能である。

おわりに

本稿では, 筆者らが開発した SLIPT 法, 特に任意のタンパク質の細胞膜内葉への局在移行を誘導する SLIPT-PM システムについて概説した。SLIPT-PM システムは, 受容体型チロシンキナーゼや GPCR の直下で機能する様々なシグナル分子やシグナル経路の特異的な活性化を誘導できるため, 細胞内情報伝達ネットワークの解析のための強力な基盤技術になるものと期待される。実際に最近になり, 上皮細胞が示す集団細胞遊走の制御機構解明に SLIPT-PM システムが利用され¹¹⁾, 細胞生物学における強力な新ツールとして

の有用性が示され始めている。

SLIPT-PM システムの構成要素である m^DcTMP (商品名: SLIPT-PM) はフナコシ株式会社から, ^{ik6}DHFR 融合タンパク質の発現プラスミドは addgene から入手できるため, 興味のある方は是非使ってみていただきたい(<https://www.addgene.org/browse/article/28216838/>)。

補足 筆者らは, SLIPT 法の拡張を目指し, 光に応答してタンパク質の局在移行を誘導するケージド m^DcTMP¹²⁾ や, 細胞膜内葉以外のオルガネラ膜を標的とした局在性リガンドの開発も進めている。後者に関しては, 小胞体膜¹³⁾ とゴルジ体膜¹⁴⁾ に対する局在性リガンドの開発に成功しており, 小胞体とゴルジ体の膜の上で進行するシグナル伝達の操作も可能となっている。これらの局在性リガンドは市販化されていないため, リクエストをいただければ, 筆者から提供可能である。

●文 献

- 1) DeRose R, Miyamoto T, Inoue T : *Pfugers Arch.* **465** : 409-417, 2013
- 2) Komatsu T, Kukelyansky I, McCaffery JM et al : *Nat Methods.* **7** : 206-208, 2010
- 3) Ishida M, Watanabe H, Takigawa K et al : *J Am Chem Soc.* **135** : 12684-12689, 2013
- 4) 築地真也 : *生体の科学.* **66** : 95-101, 2015
- 5) Suzuki S, Nakamura A, Hatano Y et al : *Cell Chem Biol.* **29** : 1446-1464, 2022
- 6) Nakamura A, Oki C, Sawada S et al : *ACS Chem Biol.* **15** : 837-843, 2020
- 7) Miller LW, Cai Y, Sheetz MP, Cornish VW : *Nat Methods.* **2** : 255-257, 2005
- 8) Regot S, Hughey JJ, Bajar BT et al : *Cell.* **157** : 1724-1734, 2014
- 9) Aoki K, Kumagai Y, Sakurai A et al : *Mol Cell.* **52** : 529-540, 2013
- 10) Tay S, Hughey JJ, Lee TK et al : *Nature.* **466** : 267-271, 2010
- 11) Hino N, Matsuda K, Jikko Y et al : *Dev Cell.* **57** : 2290-2304, 2022
- 12) Yoshii T, Oki C, Watahiki R et al : *ACS Chem Biol.* **16** : 1557-1565, 2021
- 13) Nakamura A, Katahira R, Sawada S et al : *Biochemistry.* **59** : 205-211, 2020
- 14) Sawada S, Nakamura A, Yoshii T et al : *Chem Commun (Camb).* **56** : 15422-15425, 2020