

## 可逆的かつリピータブルなタンパク質隔離・放出誘導が可能な小分子応答性人工非膜オルガネラ

○深谷陽子・吉川優・築地真也（名工大院工）

**Synthetic membraneless organelles that enable chemically reversible and repeatable control of targeted protein sequestration and release** (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) FUKAYA, Yoko; YOSHIKAWA, Masaru; TSUKIJI, Shinya

光や化合物を用いて細胞内のタンパク質の活性を制御する技術は、タンパク質の機能や作用機序の解明に貢献するばかりでなく、細胞機能を操作する新しいツールとしても有用である。なかでも、細胞内に発現させた改変型タンパク質の活性を小分子化合物によって制御する化学遺伝学 (chemogenetics) は、生体深部での使用が可能であるばかりでなく、創薬基盤技術になりうることから注目されている。当研究室ではこれまでに、独自の化学遺伝学ツールとして、自己集合性タンパク質からなる人工非膜オルガネラを細胞内に構築し、その内部に封入した標的タンパク質を化合物添加によって細胞質へ放出することでその活性を誘導する SPREC (synthetic protein-recruiting/-releasing condensates) システムを開発した<sup>1,2)</sup>。一方、第一世代のシステムでは、標的タンパク質と人工非膜オルガネラを TEV プロテアーゼ基質配列によって共有結合的に連結し、その基質配列を小分子応答性 TEV プロテアーゼによって切断することで、標的タンパク質の細胞質への放出を誘導していた。そのため、放出された標的タンパク質を再度人工非膜オルガネラに取り込むことができず、タンパク質の一方向的な活性化誘導にしか使えなかった。

そこで本研究では、タンパク質の活性化 (放出) と不活性化 (隔離) を可逆的に操作できる新たな人工非膜オルガネラシステムの創製に取り組んだ。その戦略として、小分子応答性人工抗体「LAMA」に着目した<sup>3)</sup>。LAMA は、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に結合する抗体と円順列変異型ジヒドロ葉酸還元酵素 (cpDHFR) からなるキメラタンパク質で、小分子トリメトプリム (TMP) 非存在下では EGFP と結合し、TMP 存在下では EGFP と解離する。この性質を利用することで、標的タンパク質の人工非膜オルガネラへの隔離・放出を TMP で操作できると考えた。具体的には、人工非膜オルガネラ形成タンパク質として、p62 タンパク質の PB1 ドメイン (ホモオリゴマー) と赤色蛍光タンパク質 Monti-Red (四量体) のタンデムフュージョン<sup>1)</sup>を用い、その C 末端に LAMA を連結した PB1-MR-LAMA を設計した。PB1-MR-LAMA と EGFP を細胞内に共発現させたところ、初期状態では EGFP が人工非膜オルガネラ内部に隔離されている様子が観察された。その培養液に TMP を添加すると、EGFP が人工非膜オルガネラから細胞質中に素早く放出された。さらに、洗浄操作により TMP を除去すると、EGFP が人工非膜オルガネラ内に再隔離された (図 1)。さらに、この一連の操作を繰り返し行ったところ、EGFP の隔離と放出を“リピータブル”に制御できることが示された。本発表では、LAMA 内包型人工非膜オルガネラ的设计と基本特性、さらにシグナルタンパク質の活性制御への応用について報告する。

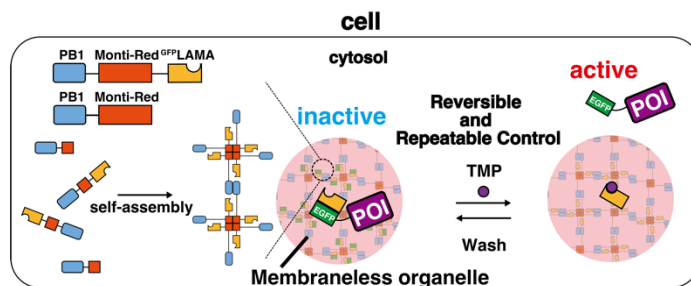


図1: タンパク質の活性を可逆的に制御できる人工非膜オルガネラシステム

- 1) M. Yoshikawa et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 6434. 2) M. Yoshikawa et al. *Biochemistry*, **2021**, 60, 3273.
- 3) H. Farrants et al. *Nat. Methods*, **2020**, 17, 279.