

生体内においてタンパク質は様々な機能を担っており、多くの生体分子と動的なネットワークを形成することでその機能が制御されている。タンパク質の動的ネットワークや機能の異常は様々な疾患を引き起こすことが知られているため、それらの解析は疾患メカニズムの解明において重要である。そのため解析ツールの一つとして、タグタンパク質とラベル化リガンドの特異的な結合反応を利用した「タンパク質ラベル化技術」が挙げられる。この技術によって、タグタンパク質を標的とするタンパク質に融合発現させ、機能性分子を導入したりリガンドによってラベル化することで、標的タンパク質に様々な機能を付与することができる。光可逆的に制御可能なタンパク質ラベル化技術を開発することで、生きた細胞内の特定の領域のタンパク質に様々な機能を付与することが可能になり、従来のラベル化技術よりも緻密な機能制御が可能になると考えた。本研究では、既存のタンパク質ラベル化技術の一つ「大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) -メトトレキサート (MTX)」に着目し、まずリガンドの着脱を光可逆的に制御可能な手法を開発し、続いて開発したリガンドを用いた光可逆的タンパク質二量体化システムの開発とその応用研究に取り組んだ。

1. タグタンパク質 (eDHFR) への結合・解離を光可逆的に制御可能なリガンドの開発¹

eDHFR-MTX-NADPH 三者複合体中において、MTX は中央部の *N*-メチルアミノメチレン部分が折れ曲がった構造で eDHFR に結合していた。そこで、MTX 中央部のいくつかの原子を置換し、アゾベンゼン構造を導入することで、可逆的な光異性化が期待できる MTX 誘導体 (azoMTX) を設計した。azoMTX は、トランス体では、eDHFR に結合した MTX と大きくコンフォメーションが異なるため、eDHFR に結合しにくい一方で、シス体では eDHFR に結合した MTX と良く似たコンフォメーションを取るため eDHFR に強く結合すると予想した。azoMTX は、394 nm と 560 nm の光を交互に照射することで可逆的な光異性化が可能であった。さらに、azoMTX の eDHFR に対する解離定数はトランス体では 0.30 nM、シス体では 0.034 nM と求められ、トランス体-シス体間で約 10 倍の親和性の差があることがわかった。

2. 光可逆的タンパク質二量体化システムへの応用²

開発した光異性化リガンド azoMTX に基づいて、標的とする細胞内タンパク質の二量体化・局在化を光可逆的に制御するシステムの開発に取り組んだ。光異性化リガンドである azoMTX の細胞膜透過性誘導体と HaloTag リガンドを連結させ、光異性化型二量体化剤を合成した。HaloTag リガンドは HaloTag タンパク質と特異的に共有結合を形成する化合物であり、タンパク質ラベル化技術として広く利用されている。細胞質に eDHFR を、ミトコンドリア外膜上に HaloTag タンパク質を発現させた HeLa 細胞に光異性化型二量体化剤を添加し、さらに紫色光 (405 nm) および緑色光 (555 nm) を照射した。光照射前と緑色光照射後は eDHFR と HaloTag タンパク質の二量体化は抑制されていたのに対し、紫色光照射後はタンパク質の二量体化が誘起され、ミトコンドリア外膜上に局在していることがわかった。

開発した光可逆的タンパク質二量体化システムを利用して、ミトコンドリアの分解を担っているマイトファジーを光制御することを試みた。マイトファジーでは、損傷したミトコンドリア外膜上にリン酸化酵素 PINK1 が蓄積し、蓄積した PINK1 により活性化されたユビキチンリガーゼ Parkin がユビキチン鎖を形成し、ミトコンドリアが分解される。そこで、PINK1 の局在を光制御することでマイトファジーの誘導を制御でき、マイトファジー機構の詳細な解析が可能になると考えた。細胞質に PINK1 と eDHFR の融合タンパク質を、ミトコンドリア外膜上に HaloTag タンパク質をそれぞれ発現させた HeLa 細胞に光異性化型二量体化剤を添加した後、紫色光を照射すると、PINK1 がミトコンドリア上に局在化し、続いてマイトファジーの誘導が観察された。

1) Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382–1386.

2) Mashita, T. et al. *in preparation*.