

補助事業番号 2023M-306

補助事業名 2023年度 生体内液-液相分離操作のための光応答ナノマシン開発 補助事業

補助事業者名 徳島大学 先端酵素学研究所 分子生命科学分野 齋尾智英

## 1 研究の概要

超高齢化社会を迎える我が国においては、加齢に伴ってリスクが上昇する神経疾患に対する治療法・予防法の確立による健康長寿社会の実現が急務である。健康寿命の延長を妨げる最大の要因の一つとして、神経変性疾患が挙げられる。ガンや糖尿病などの慢性疾患については、近年の治療法開発により、通常の生活を続けながらの闘病も現実的な選択肢になっているが、多くの神経変性疾患については有効な治療法が無く、進行を食い止めることは難しい。神経変性疾患の分子メカニズムを明らかにし、治療法・予防法の開発へとつなげる研究が求められている。

そこで本研究では、神経変性疾患の中でも特に重篤かつ介護負担が大きい、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に狙いを定め、分子レベルでのメカニズムを明らかにし、治療法・予防法の開発へとつなげることを目的とした。特に、ALS治療の新たな介入点として注目を集める「液-液相分離」に着目した研究を推進した。特に、「相分離光操作ツール」という新技術の開発によって、これまで研究を妨げてきた手法面での制約を乗り越え、液-液相分離という新たな視点からALSの分子病態を明らかにすることを目指した。具体的には、相分離を制御する「相分離シャペロン」をタンパク質工学の手法を用いて作製し、光応答シャペロンを細胞内に導入し、細胞内の液-液相分離を操作する技術を確立した。以上のように本研究では、シャペロンの光操作というこれまでにない観点から細胞内のタンパク質動態の時空間制御を可能にする新規光操作ツールを開発することに成功した。

## 2 研究の目的と背景

超高齢化社会を迎える我が国においては、加齢に伴ってリスクが上昇する神経疾患に対する治療法・予防法の確立による健康長寿社会の実現が急務である。健康寿命の延長を妨げる最大の要因の一つとして、神経変性疾患が挙げられる。ガンや糖尿病などの慢性疾患については、近年の治療法開発により、通常の生活を続けながらの闘病も現実的な選択肢になっているが、多くの神経変性疾患については有効な治療法が無く、進行を食い止めることは難しい。神経変性疾患の分子メカニズムを明らかにし、治療法・予防法の開発へとつなげる研究が求められている。

そこで本研究では、神経変性疾患の中でも特に重篤かつ介護負担が大きい、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に狙いを定め、分子レベルでのメカニズム解明における革新的ツールの開発に取り組んだ。ALS治療の新たな介入点として、「液-液相分離」が注目を集めている。液-液相分離とは、細胞内の分子が溶液状態を保ちながら自己集合し、細胞内の動的反応場を形成する現象であり、2010年前後にその現象が発見された後、様々な疾患、特に神経変性疾患との関連も指摘され、病態解明の新たな観点として注目を集めている。しかし、これまでは液-液相分離に関する有効な解析ツールがなかったために、研究の進展が妨げられていた。本研究では、「相分離光操作ツ-

ル」という新技術の開発によって、これまで研究を妨げてきた手法面での制約を乗り越え、液-液相分離という新たな視点からALSの分子病態解明の戸口を開くことを目指した。

### 3 研究内容

#### (1) 光応答シャペロンの開発 (<https://saio-lab.jp/project/>)

本研究では、タンパク質をアゾベンゼン誘導体によって化学修飾することで光応答性を持たせ、シャペロンの機能を光操作するナノマシン「光応答シャペロン」の開発に取り組んだ(図1)。シャペロンは、タンパク質の凝集を抑制するため、そのため液-液相分離液滴を解消させる機能も持つ。液-液相分離液滴は、遺伝子発現制御やシグナル伝達などの重要な生命イベントにおいて可逆的に形成・解消されるため、疾患

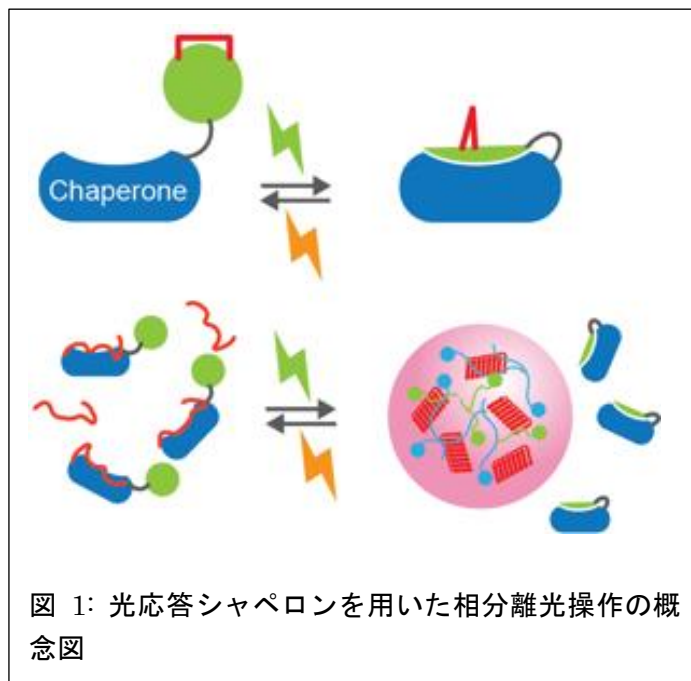


図 1: 光応答シャペロンを用いた相分離光操作の概念図

発症メカニズムの解明や創薬に向けた研究において注目を集めている。液-液相分離を操作するツールは、液-液相分離を介した機能発現や疾患発症のメカニズム解明における革新的ツールとなると期待される。本研究では、シャペロンの機能を光で操作する「光応答シャペロン」を作製し、タンパク質の液-液相分離の光操作を実証することを目指した。

大腸菌発現系を用いたシャペロンタンパク質調製、およびそれに続くアゾベンゼン誘導体での化学修飾、精製の操作によって、アゾベンゼン誘導体で修飾されたシャペロンを高純度で、ミリグラムスケールで調製した。

作製した光応答シャペロンを用いて、精製タンパク質の*in vitro*液-液相分離の光操作の実証に取り組んだ。濁度によって相分離タンパク質の液滴形成を評価する系において、光応答シャペロンを相分離タンパク質溶液に加え、光照射によって相分離液滴形成が制御できるかどうかを実験した。その結果、光応答シャペロンの機能をOFFにする波長の光を照射し、相分離を誘導したところ、濁度が上昇し、液滴が形成されていることが示された。ここで、光応答シャペロンの機能をONにする光を照射したところ、濁度が低下し、液滴が解消したことが示された。さらに、光照射を繰り返して、シャペロン機能のON/OFFを切り替えたところ、光照射に反応して濁度に変化し、可逆的に相分離のON/OFFを切り替えることが可能であることが示された。この結果より、精製タンパク質の*in vitro*での液滴制御が可能であることが実証されたと判断した。

次に、HeLa細胞内での液-液相分離光操作を実証するため、HeLa細胞内に光応答シャペロンを導入し、光照射、ストレス処理後の細胞内の液滴形成を顕微鏡観察した。その結果、光応答シャ

ペロンの機能をOFFにする波長の光を照射した細胞にストレス処理を施したところ、顕微鏡にて液滴が形成されていることが示された。次に、光応答シャペロンの機能をONにする光を照射した細胞にストレス処理を施したところ、液滴形成が抑制されたことが示された。これらの結果より、光応答シャペロンを細胞内に導入することで、光によって細胞内の液-液相分離を操作することが可能であることが実証されたと判断した。

#### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究によって開発された液-液相分離の光操作ツールは、液-液相分離から機能発現に至るメカニズムや、液-液相分離制御の不全から疾患に至るメカニズムを解明する上で有効なツールとなると期待される。液-液相分離は、ALSなどの神経変性疾患の発症メカニズムを理解する上で鍵となるイベントであることから、細胞内での液-液相分離の操作を可能にする本研究ツールは、神経変性疾患のメカニズム解明を目指した研究における革新的ツールとなり、神経変性疾患の治療法・予防法の開発の一助となると期待される。

#### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

神経変性疾患については、現状では有効な治療法や予防法はないが、開発を妨げる最大の要因は、神経変性疾患の発症メカニズムが不明なことである。神経変性疾患患者の神経組織または神経細胞からは、しばしば特定のタンパク質の凝集沈着物が検出されるが、その凝集体の発生メカニズムや、凝集体が毒性を出すメカニズムは明らかにされていなかった。一方で、2010年代に、神経変性疾患に関係するタンパク質の多くが、自己集合する特性を持ち、さらにその集合によって液-液相分離液滴を形成することが明らかになり、液-液相分離の制御不全が、凝集沈着物を発生させる過程に含まれるという考え方が浸透してきた。そのため、生体内での液-液相分離の制御や、制御不全のメカニズムの理解によって、神経変性疾患の分子病態の理解につながると期待されている。そのような背景のもと、液-液相分離を光によって駆動するツールの開発も進み、2010年代後半から、いくつかの手法が提案されてきたが、それらはいずれも、光によって相分離を促進するものであり、相分離を解消する方向の操作手法は開発されていなかった。そのような状況の中、本研究は、シャペロンに注目することにより液-液相分離の解消方向の操作を可能にする、新しい作用機序を持ったツールである。

#### 6 本研究にかかわる知財・発表論文等

論文投稿予定（2024年度中に投稿予定）

#### 7 補助事業に係る成果物

##### (1) 補助事業により作成したもの

該当なし。

(2)(1)以外で当事業において作成したもの  
該当なし.

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 徳島大学 (トクシマダイガク)

住 所: 〒770-8503

徳島市蔵本町3-18-15

徳島大学 先端酵素学研究所 B棟2階

担 当 者: 教授 齋尾 智英 (サイオ トモヒデ)

担 当 部 署: 先端酵素学研究所 (センタンコウソガクケンキュウジョ)

E - m a i l: saio@tokushima-u.ac.jp

U R L: <https://saio-lab.jp>