

## 光を使った凝集体機能障害とその後の細胞運命解析に成功

～遺伝子破壊技術では達成できない細胞内非膜オルガネラの機能解明に期待～

### ポイント

- ・光を用いて細胞内凝集体であるストレス顆粒に機能障害を引き起こさせることに成功。
- ・ストレス顆粒の機能障害により細胞死が起こることを実証。
- ・様々な細胞内非膜オルガネラの生理的役割解明と疾患原因凝集体の破壊療法に期待。

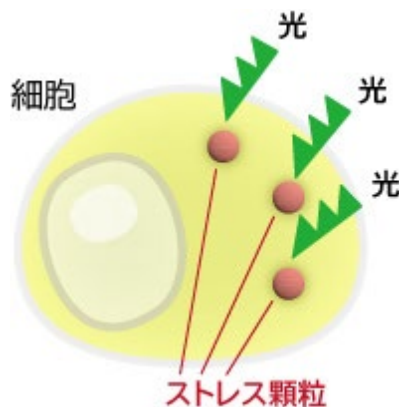
### 概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の北村 朗講師らの研究グループは、単量体赤色蛍光タンパク質（以下 SuperNova-Red<sup>\*1</sup>）を細胞内のストレス顆粒<sup>\*2</sup>へ局在化させた後、光を照射することで、時空間を制御しつつ、ストレス顆粒の機能障害を引き起こすことが可能な光遺伝学<sup>\*3</sup>の開発に成功しました。光遺伝学とは、光でタンパク質の機能や活性を制御する技術の総称です。代表的な光遺伝学の方法では光で制御されるイオンチャネルやイオンポンプなどの活性を制御する方法が知られていますが、本成果では蛍光タンパク質に光を照射することにより、タグ付けしたタンパク質の機能を不活性化することができる発色団補助光不活化法（CALI法）<sup>\*4</sup>をストレス顆粒に適用し、その後細胞に起こる運命を解明したものです。

細胞内には様々な凝集体の存在が知られていますが、これら区画の特徴的な機能を調べる方法はこれまで確立されていませんでした。特に、遺伝子工学の手法である遺伝子ノックアウトやノックダウンといった方法を用いると、細胞内の対象タンパク質はすべて合成されなくなることから、凝集体そのものも形成されなくなり、その機能を調べることが原理上不可能でした。

そのため、時空間を制御しつつ凝集体の機能障害を引き起こすことができる新しい手法が必要であり、本研究はその実証を行ったものです。本研究により開発した光遺伝学実験法は、細胞内の様々な機能性構造の解析に応用させることにより、非膜オルガネラ機能の全貌解明や疾患の原因となる凝集体破壊療法のためのツールとなることが期待されます。

なお、本研究成果は、2024年5月3日（金）公開のACS Omega誌にオンライン掲載されました。



細胞内に形成されたストレス顆粒と、それに対する光遺伝学的破壊法（CALI法）の適応。

## 【背景】

細胞内には、光学顕微鏡で観察可能な凝集体と総称されるタンパク質や、核酸などの生体分子が集積した構造があります。伝統的にこのような構造は総称として凝集体と呼ばれていましたが、近年は凝集体の性質により細胞内の生理的機能差があるということが知られてきています。例えば、タンパク質は特徴的な折り畳み状態を有することで機能を発しますが、この折り畳み状態が正常のものとは異なった状態になってしまうことは「変性」と呼ばれ、タンパク質の性質が変化していることを意味します。このような変性したタンパク質は正しい折り畳み状態へ巻き戻せる場合もあれば、それが困難な状態もあり得ます。細胞内ではそのような変性状態を見分けた上で、折り畳み直せるものと直せないものを識別し、それぞれ異なる区画に仕分けしていることが分かっています。

これはさながら工場における製品製造時の仕分けのような作業に相応するもので、一時不良品ながら修正後に出荷可能なものを保管しておく部屋と、もはや再生不可であり壊してしまうしかないものを保管しておく部屋にそれぞれ対応すると例えることができます。別の例では、製品の生産効率が大きく滞っている場合、中間製造品やその製造に必要な部品（以下、中間部品と呼びます）を保管しておく部屋を用意しておくことで、生産効率が回復したときに保管されていた中間部品を効率的に用いて製造を再開することで、工場の機能や生産状態を効率的に維持することができます。

このような、生産停滞時に中間部品を一時保管する部屋に例えられる区画が小さな単一細胞内にも存在すると考えられています。しかしながら、このような「部屋＝機能的な細胞内区画の役割」を研究する上で、従来の遺伝子破壊技術であるノックアウト・ノックダウンの手法を用いると、工場における原材料供給を根元から完全に止めてしまうことになるため、製品が製造できなくなることは実証できても、製造過程に存在する中間部品の保管部屋が存在するのか、あるいはその部屋が生産過程に対してどのように働いているのかということを調べることは困難でした。

そこで着目したのが光を用いて目的タンパク質の機能を制御することができる光遺伝学法です。具体的には、蛍光タンパク質と光を使って標的タンパク質を不活化できる発色団補助光不活化法（CALI法）を用いて、ストレス顆粒の機能障害を引き起こした後、細胞の生存性（何割の工場が閉鎖してしまうか）とストレス顆粒の消失経過時間（工場の生産ラインが回復するまでの時間）を調べることにしました。

## 【研究手法】

まずストレス顆粒に局在するタンパク質である G3BP1 または TDP-43 に、光で起爆できる時限爆弾に相当する SuperNova-Red を融合させて、細胞内に発現させました。これらの細胞に高塩濃度ストレスを施すことにより、細胞内の原材料供給は維持しつつタンパク質生産経路を抑制し、中間部品の保管部屋と予想されているストレス顆粒という凝集体を形成させました。次に、ストレスを取り除いて生産経路を元の状態に戻す操作を行った後、光照射によりこれらの SuperNova-Red 時限爆弾を爆発させました。SuperNova-Red からは高反応性の活性酸素種<sup>\*5</sup>が高效率に産生され、10 ナノメートル以内程度に近接して存在するタンパク質を機能不全に陥れることができます。

## 【研究成果】

G3BP1 型あるいは TDP-43 型 SuperNova-Red 時限爆弾を発現する細胞を、高塩濃度ストレス処理すると、ストレス顆粒を形成する細胞と形成しない細胞が出現しました。そこで、高塩濃度ストレスを除去し、ストレス顆粒陰性細胞とストレス顆粒陽性細胞で爆発させた後、10 時間にわたり細胞の生存性を顕微鏡下で観察したところ、ストレス顆粒陽性細胞では細胞死率が増加することが分かりま

した。このことは、ストレス顆粒が細胞の生存性を向上させているという従来の仮説を支持するものとなりました。また、G3BP1 型爆弾と TDP-43 型爆弾の効果を比較すると、G3BP1 型爆弾を用いたときに細胞生存性が低くなったことから、ストレス顆粒の機能維持に G3BP1 の貢献度が高いことが示唆されました。さらに、G3BP1 型爆弾を用いると、ストレス顆粒の消失時間が遅延することも分かりました。

つまり、機能不全になったストレス顆粒内では、その構成分子が連結されたような状態となっており、この時限爆弾は単に分子を切断して破壊するのではなく、分子同士を連結して機能不全を引き起こしていることが示唆されました。

## 【今後への期待】

細胞内に形成される凝集体の形成過程や、その役割はまだ謎が深く、粘り強い研究が必要です。凝集体には細胞にとって毒となるものも知られており、そのような毒性の凝集体は神経変性疾患など重篤な病気の原因として知られています。本研究成果は、細胞生物学的課題である凝集体の謎を解き明かす上で極めて重要な方法論であることに加え、神経変性疾患における凝集体の光破壊法の確立を経て、難治性神経変性疾患の治療法へと進展させていくことも、重要な社会的意義であると考えられます。

## 【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業・新学術領域研究『情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理』・公募研究(課題名:蛍光動的消光測定による生細胞内 RNA 立体構造の情報物理解析、代表者:北村 朗)(22H04826)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構・革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ (AMED-PRIME)・研究開発領域「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」(課題名:細胞内プロテオスタシスを維持するシャペロン RNA の作動機序解明、代表者:北村 朗)(JP22gm6410028)、公益財団法人「中谷医工計測技術振興財団」・技術開発研究助成(代表者:北村 朗)、公益財団法人 北海道科学技術総合振興センター・研究助成(代表者:北村 朗)、公益財団法人「蓬庵社」・研究助成(代表者:北村 朗)、公益財団法人「萩原学術振興財団」・研究助成(代表者:北村 朗)、北海道大学 L-Station 研究支援(代表者:北村 朗)、北海道大学 DX 博士人材フェローシップ (JST-SPRING) (助成受領者:藤本 愛)などの支援を受けて行われました。

## 論文情報

論文名 Stress granule dysfunction via chromophore-associated light inactivation (発色団補助光不活化法によるストレス顆粒の機能障害)  
著者名 鯉住拓未<sup>1</sup>、藤本 愛<sup>1</sup>、川口遥香<sup>1</sup>、黒崎 紬<sup>1</sup>、北村 朗<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院生命科学院、<sup>2</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究院)  
雑誌名 ACS Omega (米国化学会発行の学術誌)  
DOI 10.1021/acsomega.4c01469  
公表日 2024年5月3日(金)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 講師 北村 朗 (きたむらあきら)  
TEL 011-706-9542 FAX 011-706-9045 メール akita@sci.hokudai.ac.jp  
URL <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)  
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

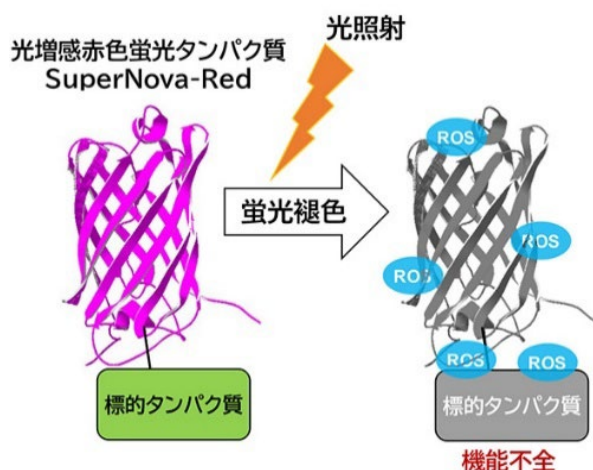


図1. タグ付けした SuperNova-Red 蛍光タンパク質への光照射と発生させた活性酸素種 (ROS) による標的タンパク質破壊の模式図

## 光破壊されたストレス顆粒



= 分子間の連結場所

図2. CALI 法により破壊されたストレス顆粒の内部予想図

## 【用語解説】

- \* 1 SuperNova-Red … 単量体型赤色蛍光タンパク質の一つ。世界で初めて開発された遺伝子コード型の光増感剤を単量体型に改変し、標的タンパク質に対しタグ付けを行いやすくしたものの。宇宙における超新星爆発から名付けられた。
- \* 2 ストレス顆粒 … 高塩濃度、高酸化、高浸透圧などのストレス環境下に置かれた細胞内で、細胞質に形成されるタンパク質と核酸（RNA）から構成される凝集体の一つ。ストレスから解放されると消失する。
- \* 3 光遺伝学 … 光を使ってタンパク質の機能や活性を制御する技術の総称。細胞のみならず個体におけるタンパク質発現量や行動など様々な生物プロセスを制御できることから「遺伝学」という名称がつけられている。元来、光を利用していない生物に対しても適応可能である。
- \* 4 発色団補助光不活化法（CALI 法） … Chromophore-assisted light inactivation の略称で、反応性の高い活性酸素種を産生しやすい蛍光分子や蛍光タンパク質を標的タンパク質と融合して細胞内へ導入または発現させ、光照射により標的タンパク質及びそれに近接する生体分子を不活化する手法のこと。
- \* 5 活性酸素種 … 反応性が高く存在寿命の短い酸素分子の総称。タンパク質に対して作用すると、主鎖の切断、アミノ酸側鎖の修飾などが起こり、結果としてそのタンパク質が不活化される。英語の略称から ROS とも呼ばれる。