

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21172

研究課題名(和文)オルガネラ選択性をもつタンパク質分子ヒーターの開発

研究課題名(英文)Developments of protein molecular heaters with organelle selectivity

研究代表者

水谷 泰久(Mizutani, Yasuhisa)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60270469

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、ヘムのもつ高速の無輻射緩和を利用して高効率の分子ヒーターとして働くタンパク質(タンパク質ヒーター)を開発した。高度好熱菌由来のヘムタンパク質シトクロムc552がもつ高い熱安定性と高速の無輻射緩和を示すヘムの光熱変換を利用した。ラマン分光法を用いた温度計測の結果、シトクロムc552はタンパク質周辺温度を最大で5.1 K加熱することがわかった。今回観測したヘムタンパク質による温度上昇は、温度感受性タンパク質を駆動し、生体操作を行うのに十分であることが示された。また、タンパク質ヒーターシグナル配列を付加することによってオルガネラを特定して細胞内を局在加熱できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質ヒーターは細胞操作における研究ツールとして高い将来性を持っている。ヘムタンパク質を用いたタンパク質ヒーターは、遺伝子として細胞中へ導入され、外部からの分子導入を必要としない。したがって、細胞内の分子だけで生合成可能なタンパク質ヒーターは細胞の熱操作技術として高い有用性を持つ。また、神経細胞の操作技術として光を用いたイオン濃度の操作技術が注目されている。タンパク質ヒーターはこれに対して、光を用いた細胞内の熱操作技術を創出するこのように、タンパク質ヒーターの創成は細胞操作の全く新しい手段を提供し、生細胞を舞台とした化学の理解と応用に広く寄与するであろう。

研究成果の概要(英文): In this study, we developed proteins that act as highly efficient molecular heater (protein heater) by utilizing the fast nonradiative relaxation of heme. The heme protein, cytochrome c552 from a highly thermophilic bacterium, exhibits high thermal stability and fast nonradiative relaxation. Temperature measurements using Raman spectroscopy revealed that cytochrome c552 heated the temperature around the protein by up to 5.1 K. The temperature increase caused by the heme protein observed in this study was shown to be sufficient to drive temperature-sensitive proteins and perform cell manipulations. Additionally, we demonstrated the possibility of localized intracellular heating by attaching signal sequences to the protein heaters to identify organelles.

研究分野：生物物理化学

キーワード：分子ヒーター

1. 研究開始当初の背景

熱は変化を駆動するエネルギーであると同時に、環境を規定する情報でもある。生命現象における熱もこの二つの役割を担っている。細胞内の化学反応は体温の熱エネルギーによって駆動される。一方、熱は細胞内で情報伝達のシグナルとしても利用されている。情報伝達機構の理解と制御のためには、細胞内での効率的かつ部位選択的な加熱技術が求められている。そのような技術が開発されれば、熱耐性の向上、熱刺激の理解に基づいた鎮痛技術の開発やフォールディング異常に起因する疾患の治療など、熱シグナルを利用した細胞制御や医療応用に道を拓く。本研究では、タンパク質分子内の熱伝導機構を解明し、明らかになった機構に基づいて高効率の分子ヒーターとして働くタンパク質（タンパク質ヒーター）を開発する。タンパク質を細胞中で分子ヒーターとして利用することは、これまで類似研究のない新規なアイデアであり、さらにこれを用いてオルガネラ選択的な細胞内加熱技術を創出する。

研究代表者はこれまで、自身で開発した計測手法を用いてタンパク質内での熱エネルギー拡散に関する研究を行ってきた。この計測技術が本申請の基盤となっている。応募者は、タンパク質内のヘムで光-熱変換が数ピコ秒で起きることを示した。さらに、10年ほど前から、タンパク質内のエネルギー拡散を時空間マッピングする計測技術の開発に着手し、まず原理検証実験によって計測原理の妥当性を実証した。その後、ヘムタンパク質中のエネルギーフローの時空間マッピングに成功した。この技術を用いると、タンパク質分子内で起きるエネルギー拡散を、エネルギー移動の観測に足る高い時間分解能で、かつアミノ酸残基の空間分解能でマッピング計測できる。この計測手法は応募者のグループが開発したオリジナルなものであり、タンパク質分子内エネルギー拡散の時空間マッピング計測を可能とする、現段階では唯一の手法である。これらの研究を進める中で、タンパク質を分子ヒーターとして利用する着想を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘムタンパク質を用いて高効率のタンパク質ヒーターを開発することである。ヘムは鉄ポルフィリン錯体の一種であり、ヘムタンパク質はヘムを含むタンパク質の総称である。ヘムタンパク質はタンパク質ヒーターとなりうる高いポテンシャルを有している。ヘムは高効率の光-熱変換素子として働くうえ、繰返しの光励起に対して極めて安定である。また、ヘムは細胞中で生合成されるため、外部から何も加えることなく、細胞中でタンパク質ヒーターとしてヘムタンパク質を発現させることが可能である。細胞内で発現したタンパク質ヒーターによって、細胞内サブマイクロメートルの空間に $+10^{\circ}\text{C}$ 以上の温度上昇を得ることができる。また、タンパク質ヒーターによる加熱技術は、従来の細胞加熱技術に対して、オルガネラ選択性を持つ・高い加熱効率を持つ・温度の同時計測ができる、という優位性を持っている。

3. 研究の方法

タンパク質ヒーターの実用化のためには解決すべき課題がある。それは、ヘムから放出された熱を溶媒に放出するうえで、その間にあるタンパク質部分が熱伝導のボトルネックになっている点である。タンパク質部分の熱伝導率は水の10-20%しかないため、ヘムから放出された熱によってタンパク質部分は過渡的に高温になってしまう。このため、ヘムの繰返しのエネルギー放出によって、タンパク質の熱変性が起こりうる。この問題を解決するためには、熱安定性の高いヘムタンパク質を用いる必要がある。そこで本研究では高度好熱菌由来のヘムタンパク質を用いた。

4. 研究成果

高度好熱菌由来のヘムタンパク質の中で、タンパク質ヒーターに適したタンパク質を検討した。タンパク質サイズができるだけ小さいこと、酵素機能を持たない（ヒーター以外の余計な働きをしない）ことを条件に検討し、シトクロム c_{552} を選択した。シトクロム c_{552} の発現用プラスミドを作製し、それを用いてシトクロム c_{552} を大腸菌中で発現させクロマトグラフィーによって精製した。また、市販されており、大量の試料調製が可能なミオグロビンについても調べた。これらを50 mM HEPES バッファー (pH 8.0) に、濃度100 μM になるように調製した。

タンパク質をヒーターとして用いる場合、ヒーターとなるタンパク質が自ら放出する熱によって変性してしまえばヒーターとして機能しない。シ

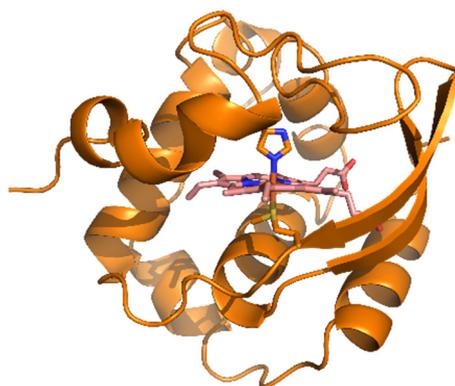


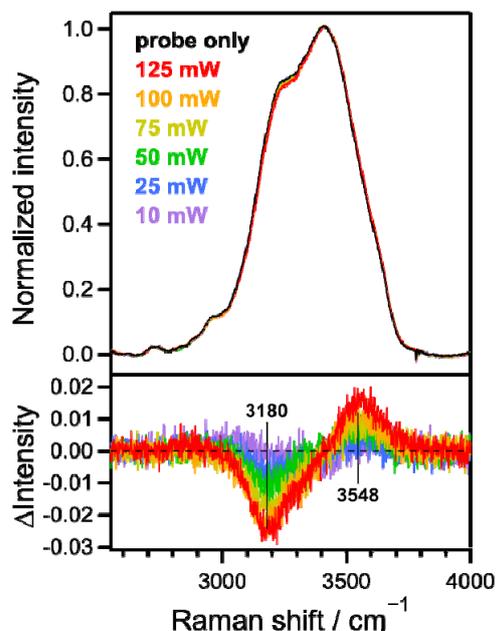
図1 シトクロム c_{552} の立体構造。

トクロム c_{552} 試料について、吸収スペクトルの温度依存性を調べたところ、 90°C を超えてもほとんど変性しないという高い熱安定性を示した。この高い熱安定性から考えて、長時間安定なタンパク質ヒーターとして機能すると予想された。さらに、タンパク質ヒーターの加熱能を定量的に調べるために、シトクロム c_{552} に蛍光タンパク質 (mCherry) をリンカーで繋いだ融合タンパク質を作製した。ヘムタンパク質と吸収帯が重ならないので、ヘムの励起と mCherry 発色団の励起のための光が波長的に干渉しない。また、mCherry は、温度に依存してその蛍光スペクトルが敏感に変化するため、タンパク質ヒーターからの熱放出を高感度で検出することができると考えた。しかし、シトクロム c_{552} -mCherry 融合タンパク質について実際に測定してみると、光熱変換による加熱のために照射する 532 nm の cw 光によって、mCherry の発色団が不可逆的に変化してしまうことがわかった。試料の条件を工夫したものの改善しなかったため、蛍光タンパク質を用いた温度計測は断念した。

代わって、水のラマンスペクトルを温度プローブとして用いることを考えた。水の水素結合ネットワークは温度に対して敏感であるため、そのラマンスペクトルは温度に対して敏感に変化する。溶液セルホルダの温度制御により 292.2 K から 303.1 K の範囲で試料温度を変え、水の OH 伸縮振動バンドをもとにして $\pm 0.3\text{ K}$ の精度で温度変化を検出できることを確認した。ラマンスペクトルの測定には波長 405 nm の cw 光をプローブ光として用いた。光熱変換によるヘムタンパク質の加熱能測定では、試料溶液のプローブ光の照射位置に波長 532 nm の cw 光をポンプ光として照射した。測定中の試料溶液の温度は、恒温セルホルダによって 293.2 K に維持した。これとは独立に、タンパク質溶液の温度を恒温セルホルダによって精密に制御し、 292.2 K から 303.1 K までの範囲の異なる温度でタンパク質溶液のラマンスペクトルを測定した。ここで観測された OH 伸縮振動バンドの変化を温度に対してプロットしたところ、観測の温度範囲においては温度に線形に変化することがわかった。そこで、温度変化に対するスペクトル変化の大きさを一次関数でフィットし、その関係を検量線として用いた。

ポンプ光を照射した場合としない場合とで OH 伸縮振動バンドを比較すると、スペクトル形状に違いがあることがわかった。そこで、この違いを詳細に比較するために、ポンプ光を照射した場合としない場合のスペクトルの差スペクトルを計算した。過去の研究によって、OH 伸縮振動バンドには温度変化に対して 3425 cm^{-1} に等強度点があることがわかっていて、そこで、 3425 cm^{-1} でのバンド強度を規格化し、差スペクトルを計算した。図 2 に示すように、差スペクトルには、 3548 cm^{-1} と 3180 cm^{-1} にそれぞれ正と負のバンドが観測された。これは、温度変化によるスペクトル変化 (図 3) ときわめてよく似ていた。さらに、レーザー強度を変化させて、OH 伸縮振動バンドの形状を調べたところ、 3548 cm^{-1} と 3180 cm^{-1} のバンド強度はポンプ光強度が高いほど大きくなった。一方で、タンパク質が含まれないバッファではスペクトルの差は観測されなかった。これらのことから、ポンプ光照射によるスペクトル変化は、溶液の温度変化に起因すると結論し、ヘムタンパク質がタンパク質ヒーターとして機能していると判断した。

試料温度に対して、差スペクトルに現れる正負のバンド強度の差の絶対値をプロットし



ドの変化。図 2 ポンプ光照射の有無による OH 伸縮振動バンドの変化。ラマンスペクトルの測定には波長 405 nm の cw 光をプローブ光として用いた。光熱変換によるヘムタンパク質の加熱能測定では、波長 532 nm の cw 光をポンプ光として照射した。

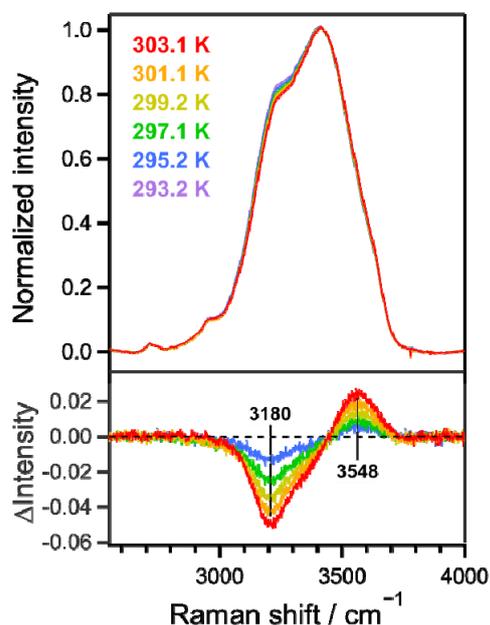


図 3 温度変化に伴う OH 伸縮振動バン

たものを図 4 に示す。実測値を一次関数でフィットし検量線を得た。この検量線を基に、ヘムタンパク質のポンプ光照射による加熱能を求めた。図 4B に、シトクロム c_{552} 溶液の温度上昇のポンプ光強度依存性を示す。本実験条件において、シトクロム c_{552} はタンパク質周辺温度を最大で 5.1 K 加熱することがわかった。同様の実験をミオグロビンに対して行った結果、最大で 3.3 K の温度上昇が観測された。2 種類のタンパク質の間で、上昇温度の比はポンプ光 532 nm におけるモル吸光係数の比とほぼ同じであった。したがって、光熱変換による加熱能の違いは、ポンプ光波長 532 nm における吸光係数の違いに由来すると考えられる。温度依存的にイオンの膜透過を制御する TRP チャンネルタンパク質では 3–6 K の温度変化によってチャンネルの開閉状態が変化することが知られている。当初の見積もりよりは小さかったものの、今回観測したヘムタンパク質の光熱変換による温度上昇は、温度感受性タンパク質を駆動し、生体操作を行うのに十分であることが示された。今後は、アミノ酸変異によって、ヘムのモル吸光係数を上げより大きな加熱能を目指す。また、よりモル吸光係数の大きな近紫外領域の吸収帯を利用することも計画している。

シグナル配列を利用して、細胞中で発現したタンパク質を特定のオルガネラに局在させることもできる。シトクロム c_{552} に、大腸菌のペリプラズムに局在するシグナル配列が付加した場合、シトクロム c_{552} は確かにペリプラズムで発現していた。この結果は、タンパク質ヒーターがオルガネラを特定して細胞内を局在加熱できる可能性を示している。

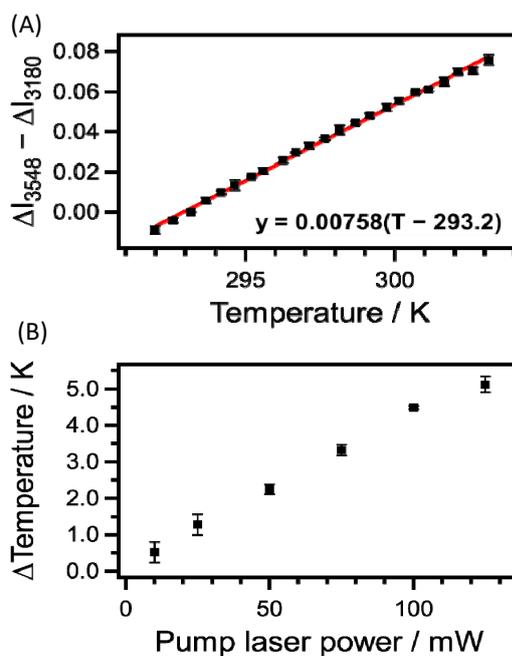


図 4 (A) 図 3 のプロットより得られた温度計測の検量線。(B) ポンプ光強度に対する上昇温度。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuhisa Mizutani, Misao Mizuno	4. 巻 157
2. 論文標題 Time-resolved spectroscopic mapping of vibrational energy flow in proteins: Understanding thermal diffusion at the nanoscale	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 240901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0116734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Yamashita, Misao Mizuno, Kazuhiro Takemura, Akio Kitao, Yasuhisa Mizutani	4. 巻 126
2. 論文標題 Dependence of Vibrational Energy Transfer on Distance in a Four-Helix Bundle Protein: Equidistant Increments with the Periodicity of Helices	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 3283-3290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.2c00956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Yamashita, Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani	4. 巻 156
2. 論文標題 High suitability of tryptophan residues as a spectroscopic thermometer for local temperature in proteins under nonequilibrium conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 75101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0079797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 渡瀬 太郎、水野 操、石川 春人、水谷 泰久
2. 発表標題 ヘムタンパク質を用いた分子ヒーターの開発
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Dependence of Vibrational Energy Transfer on Distance in a Four-helix Bundle Protein
3. 学会等名 27th International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Time-resolved Raman Investigations of Energy Flow at Protein-Solvent Water Interfaces
3. 学会等名 PacifiChem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 聡、水野 操、水谷 泰久
2. 発表標題 ヘリックスの周期性を利用したタンパク質内エネルギー移動の距離依存性の解明
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡瀬 太郎、水野 操、石川 春人、水谷 泰久
2. 発表標題 ヘムタンパク質を用いた分子ヒーターの開発
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳 さくらこ、水野 操、今村 博臣、村越 秀治、水谷 泰久
2. 発表標題 無蛍光性色素タンパク質による分子ヒーターの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Dependence of Vibrational Energy Transfer on Distance in a Four-helix Bundle Protein
3. 学会等名 27th International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiang Gao, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Vibrational Energy Relaxation of Heme in Dimeric Hemoglobin
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 生物物理化学研究室
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------