

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19008

研究課題名（和文）光により可逆的に重合・脱重合するペプチドからなる人工細胞骨格の創製

研究課題名（英文）Creation of artificial cytoskeleton consisting of peptides that undergo reversible polymerization and depolymerization by light

研究代表者

松浦 和則（Matsuura, Kazunori）

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60283389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格は、構成タンパク質の可逆的な重合・脱重合によって細胞形態を動的に制御している。我々は、スピロピラン/メロシアン修飾ペプチドナノファイバーをGUVに可逆的に重合・脱重合させることで、細胞サイズのGUVの形態を劇的に変化させる人工細胞骨格システムを開発した。スピロピラン修飾ペプチドは、シートナノファイバーを形成したが、メロシアン型の光異性化によりナノファイバーは完全に解離した。メロシアンペプチドを内包した球状GUVは、スピロピラン型への光異性化により、劇的かつ可逆的にワーム状ベシクルに変化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、球状GUVに内包したメロシアン修飾ペプチドに可視光を照射すると、ワーム状ベシクルに劇的かつ可逆的な形態変化が誘発することを見出した。この分子設計は、細胞内でのアクチンナノファイバーや微小管などの細胞骨格の重合/脱重合を模倣した光制御人工細胞骨格の分子設計ガイドラインを与える。このような光制御人工細胞骨格を細胞内に導入することで、細胞の変形や移動を光で制御する革新的な分子技術が実現できると考えられる。また、将来の人工細胞や分子ロボットを構築する際の構成要素として、本研究で得られた成果が活用できると考えられるため、学術的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cytoskeletons in eukaryotic cells, such as microtubules and actin filaments, dynamically control cellular morphology by reversible constituent protein polymerization/depolymerization. We developed an artificial cytoskeleton-like system, in which reversible polymerization/depolymerization of spiropyran/merocyanine-modified peptide nanofiber in GUV dramatically changed the morphology of giant unilamellar vesicles with diameters that are near cell size. Spiropyran-modified peptide formed beta-sheet nanofibers, whereas merocyanine-form photoisomerization completely dissociated the nanofibers. Spherical GUVs that encapsulate the merocyanine-peptide dramatically changed into worm-like vesicles by the photoisomerization to the spiropyran-form. UV and visible light irradiation reversibly controlled the dramatic morphological changes in GUVs.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：ペプチドナノファイバー 人工細胞骨格 スピロピラン -シート 光異性化 自己集合 リボソーム

1. 研究開始当初の背景

これまでに、ペプチドナノファイバー形成を外部刺激で制御した研究がいくつか知られている。例えば Schneider らは、光による脱保護をトリガーとした自己集合によりヒドロゲル形成するペプチドを開発している (*J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17025)。Hilvert らは、主鎖にアゾベンゼンを導入したペプチドの光異性化による不可逆な凝集体形成を報告している (*J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2929)。丸山らは、酵素反応をトリガーとしたペプチド脂質の自己集合による細胞内での繊維形成により、ガン細胞死を誘起できることを示している (*J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 770)。我々はこれまでに、光解離性アミノ酸で連結した DNA-ペプチドコンジュゲートの光切断によるペプチドナノファイバー成長システム (*Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 8020)、ならびに、それを用いた光によるリポソーム運動システム (*Sci. Rep.*, **2018**, *8*, 6243) を開発している。しかし、このシステムはコンジュゲートの光切断により β -シート形成ペプチドが遊離され、ナノファイバー形成するものであるため、繊維成長を不可逆的に光制御したものである。これらの先行研究は全て、外部刺激により不可逆的な繊維形成を制御したものであり、可逆的に重合・脱重合できる人工システムはこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

生物の細胞内には、微小管・アクチンフィラメント・中間径フィラメントといったタンパク質繊維状集合体からなる「細胞骨格」が存在しており、それらの伸長・収縮、繊維間での相互作用、細胞膜や細胞内分子との相互作用により、細胞の形態変化・遊走・分裂・オルガネラ配置などを動的に制御している (図 1)。細胞骨格の 1 つである微小管は、チューブリンというタンパク質がグアノシン三リン酸(GTP)と結合することで重合、GTP が GDP に加水分解されることで脱重合し、これらのダイナミクスは微小管結合タンパク質(MAP)により制御されている。このような細胞骨格の動的制御を模倣して、重合・脱重合を可逆的に動的制御できる分子集合体からなる「人工細胞骨格」を創製すれば、超分子化学・ナノマテリアル化学といった学術分野の方向性を大きく転換できると期待される。上述のように、これまで、外部刺激によるペプチドの繊維状分子集合体の動的制御を試みた研究がいくつか報告されているが、それらは不可逆的な重合制御や、わずかな構造変化を誘起しているにすぎないものであり、可逆的に重合・脱重合を制御したペプチド繊維集合体からなる人工細胞骨格の創製は全く報告されていない。そこで本研究では、ペプチドナノファイバーの重合・脱重合を光制御する方法論を開拓し、ジャイアントリポソームの変形・運動を動的制御する人工細胞骨格を創製することに挑戦した (図 2)。

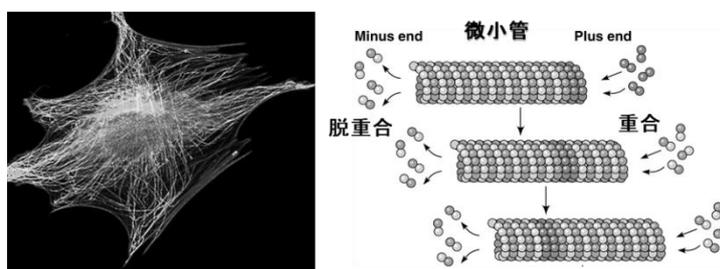


図 1. 細胞骨格を形成する微小管の重合・脱重合

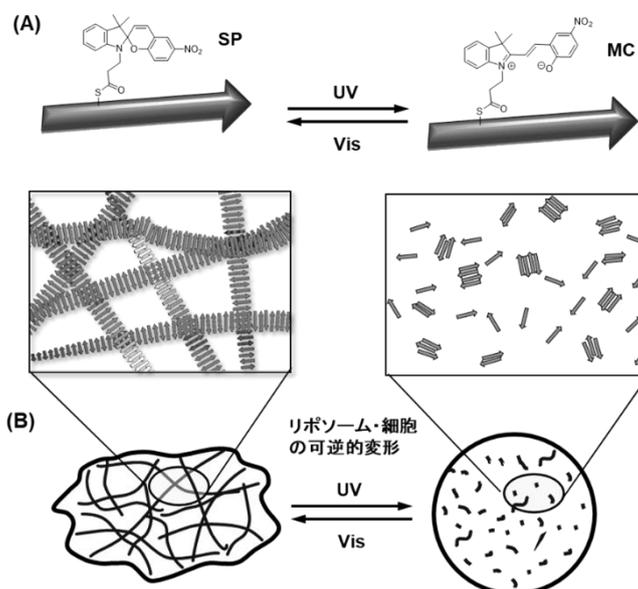


図 2. 本研究の目的

3. 研究の方法

スピロピラン(SP)は無電荷で 4.3D の双極子モーメントを有するが、UV 光により、17.7D の双極子モーメントを有する両性イオンのメロシヤニン(MC)に異性化され、可視光により SP に戻すことができる。この SP の光異性化による物性変化を利用して、これまでに、ペプチドの α -ヘリックスとランダムコイルの構造転移や、合成高分子の凝集-溶解転移の光制御などが知られている (*R. Klajn, Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 148)。本研究では、人工細胞骨格として、ナノファイバー

を形成する β -シート形成ペプチド(FKF^{EF}KFE)の中央のフェニルアラニン(F)をシステイン(C)に変更したペプチド(FKF^ECKFE)を設計し、システインのチオール基にSP/MCを共有結合させた。Fmoc 固相合成した β -sheet 形成ペプチド FKF^ECKFE の Cys 残基にブROMOアセチル化 SP を反応させ FKF^EC^{SP}KFE ペプチドを合成し、逆相 HPLC 精製後、MALDI-TOF-MS で確認した。

4. 研究成果

(1) UV スペクトルにより可逆的なメロシアン(MC)体への光異性化を確認した。CD スペクトルにより、FKF^EC^{SP}KFE ペプチドが 197nm 付近に極大、214nm 付近に極小を持つ典型的な β -sheet 構造を形成していることが確認された(図 3)。FKF^EC^{SP}KFE に 365 nm の UV 光照射を照射し、FKF^EC^{MC}KFE に異性化すると、ランダムコイル構造になることが確認された。これに 580 nm の可視光を照射すると、完全ではないが β -sheet 構造に戻ることが確認された。また、Thioflavin T の蛍光スペクトルにおいて、FKF^EC^{MC}KFE 存在下よりも FKF^EC^{SP}KFE 存在下で蛍光強度が約 3 倍増大した。これらのことから、FKF^EC^{SP}KFE は β -sheet 構造によりナノファイバーを形成するのに対し、FKF^EC^{MC}KFE に異性化するとナノファイバーが脱集合していることが示唆される。さらに、Thioflavin T 染色による共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察および透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、FKF^EC^{SP}KFE はナノファイバー形成したのに対し、UV 光照射後の FKF^EC^{MC}KFE ではナノファイバーが脱集合することが観察された(図 4)。これに可視光照射すると、ナノファイバーが再集合することも観察された。これらの結果から、FKF^EC^{SP/MC}KFE は光異性化により、ナノファイバーの形成・解離を可逆的に制御できることが示された。

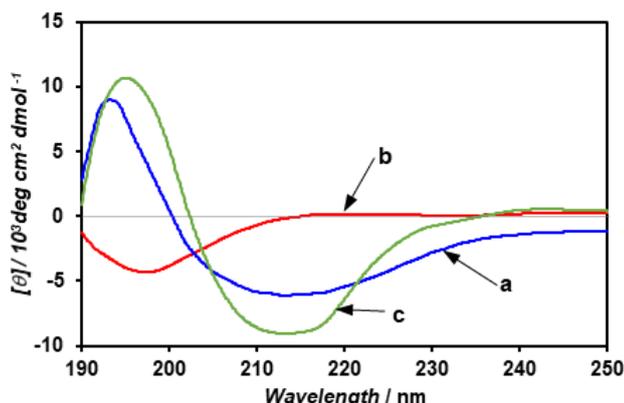


図 3. 10 mM リン酸バッファー (pH, 7.4) 中 100 μ M FKF^EC^{SP}KFE (a), 100 μ M FKF^EC^{MC}KFE (b), and FKF^EC^{MC}KFE から FKF^EC^{SP}KFE に光異性化させ 24h インキュベートしたサンプル(c) の CD スペクトル(25 $^{\circ}$ C)

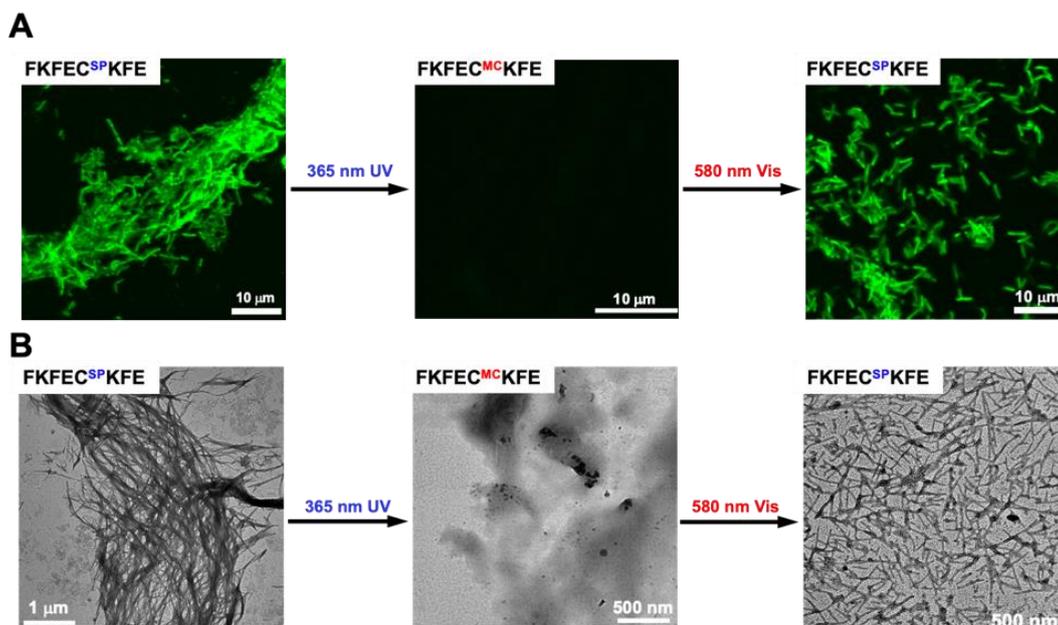


図 4. 10 mM リン酸バッファー (pH, 7.4) 中 100 μ M FKF^EC^{SP}KFE+100 μ M Thioflavin T 溶液の光異性化による CLSM (A)および TEM (B)像

(2) 次に、POPC と Atto 655-DOPE の混合脂質膜とナノファイバー形成しない FKF^EC^{MC}KFE ペプチド水溶液を用いて、静置水和法により FKF^EC^{MC}KFE ペプチドを内包した巨大単層ベシクル(GUV)を調製した。FKF^EC^{MC}KFE ペプチドを内包した GUV は通常の球状であったが、505 nm の可視光照射後、興味深いことに、球状 GUV はワーム状ベシクルへの劇的な形態変化が誘起さ

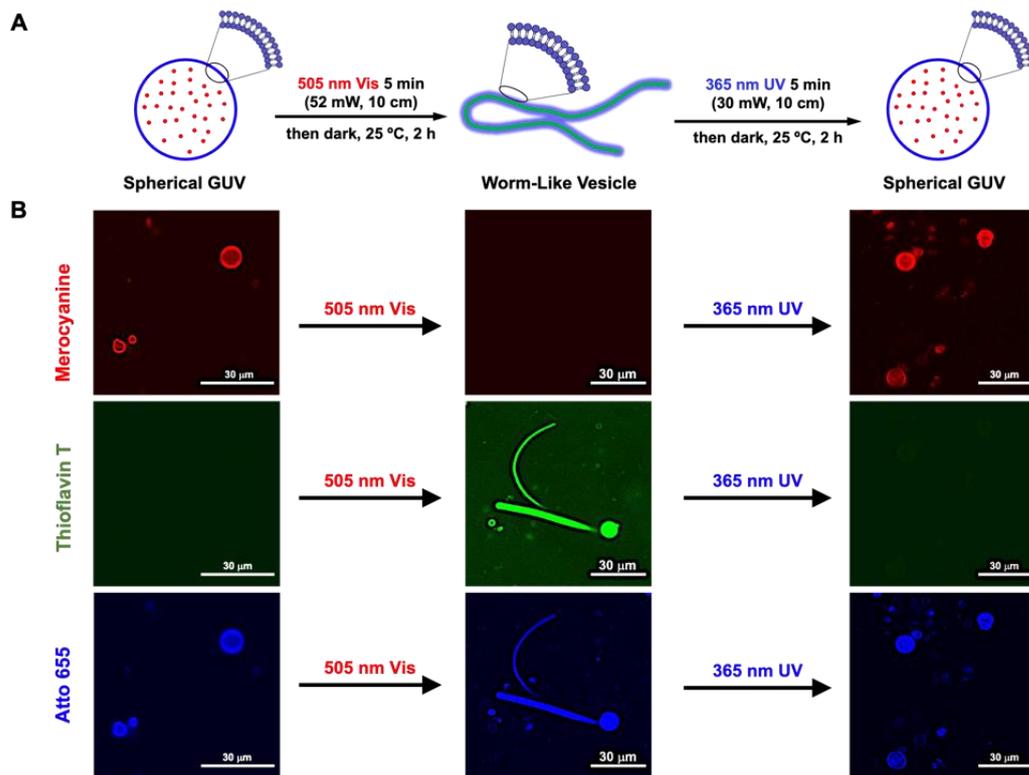


図 5. (A) ペプチドの光異性化による GUV の形態変化の模式図、(B) 10 μM FKFEF^{MC}KFE + 100 μM Thioflavin T を内包した GUV ([Atto 655 DOPE] = 5 μM , [POPC] = 1 mM) の光異性化による形態変化の CLSM 像

れた (図 5)。これは FKFEF^{MC}KFE から FKFEF^{SP}KFE への光異性化により GUV 内部でペプチドナノファイバーが形成されることで、GUV の脂質二重膜とペプチドナノファイバーの相互作用により膜の外側への押し出しを促進し、ワーム状ベシクルを形成することが考えられる。さらに、ワーム状ベシクルに 365 nm の UV 光を照射すると、元の球状 GUV へと戻ることが確認された (図 5)。以上の結果から、GUV 中での FKFEF^{SP/MC}KFE ペプチドの光異性化により、GUV の可逆的で劇的な形態変化が誘起されたことを見出した。本研究成果は、Y. Liang, S. Ogawa, H. Inaba, K. Matsuura, *Front. Mol. Biosci.*, **2023**, *10*, 1137885 にオープンアクセス論文として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Liang Yingbing, Ogawa Shigesaburo, Inaba Hiroshi, Matsuura Kazunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Dramatic morphological changes in liposomes induced by peptide nanofibers reversibly polymerized and depolymerized by the photoisomerization of spiropyran	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1137885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1137885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Kazunori, Inaba Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Photoresponsive peptide materials: Spatiotemporal control of self-assembly and biological functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics Reviews	6. 最初と最後の頁 41303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0179171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光により可逆的に重合・脱重合するペプチドナノファイバーの創製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦和則, 古川寛人, 八田健志, 稲葉央
2. 発表標題 ペプチドから走光性材料やウイルスレプリカを創る
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 15.0（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingbing Liang, Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura
2. 発表標題 Reversible Peptide Nanofibers Formed and Dissociated by Light
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光により可逆的に集合・脱集合するペプチドナノファイバーの創製
3. 学会等名 2022年 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梁応冰, 小河重三郎, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光異性化により可逆的に集合・脱集合するペプチドナノファイバーによるリポソーム変形
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 松浦和則
2. 発表標題 自己集合性ペプチドによる 分子サイバネティクス材料の創製
3. 学会等名 分子サイバネティクス×超越分子システム合同シンポジウム2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦和則・八田健司・稲葉央
2. 発表標題 光誘起ペプチド繊維成長システムによる走光性材料の創製
3. 学会等名 2021年 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunori Matsuura
2. 発表標題 Control of nanomaterials by molecular designed peptides
3. 学会等名 International Workshop on Molecular Cybernetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梁応冰, 小河重三郎, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光異性化により可逆的に重合・脱重合するペプチドナノファイバーに誘起されたリボソームの劇的な変形
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦和則, 梁応冰, 稲葉央
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの光異性化によるリボソームの劇的な形態変化
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光応答性ペプチドナノファイバーによるリボソームの劇的な形態変化
3. 学会等名 第34回生体機能関連化学部会若手の会サマースクール
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光応答性人工細胞骨格によるジャイアントリボソーム の可逆的かつ劇的な変形
3. 学会等名 第33回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光応答性ペプチドナノファイバーによるリボソームの劇的な形態変化
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 光応答性ペプチドナノファイバーによるリボソームの劇的かつ可逆的な形態変化
3. 学会等名 第13回 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yingbing Liang, Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura
2. 発表標題 Dramatic Changes in Liposome Morphology by Light-Control of Peptide Nanofibers Modified with Spiropyran
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梁応冰, 稲葉央, 松浦和則
2. 発表標題 スピロピラン修飾ペプチドナノファイバーの光異性化によるリボソームの劇的な形態変化
3. 学会等名 2023年日本化学会中国四国支部大会 山口大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦和則, 梁応冰, 稲葉央
2. 発表標題 光応答性人工細胞骨格を創る!
3. 学会等名 第23回生命化学研究会～生命化学の未来を探る～
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yingbing Liang, Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura
2. 発表標題 Creation of Photoresponsive Artificial Cytoskeleton based on Peptide Nanofibers
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Satoshi Murata (Ed) (Chapter 4.9 pp.167-173を松浦が執筆担当)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 296
3. 書名 Molecular Robotics: An Introduction	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
ドイツ	Technische Universität Darmstadt		