

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：32690

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870030

研究課題名（和文） 光応答性カルモジュリンを用いたミオシンVの光制御

研究課題名（英文） Photo-control of myosin V using photo-responsive calmodulin

研究代表者

宍戸 英樹 (SHISHIDO HIDEKI)

創価大学・工学部・助教

研究者番号：30580120

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体機能蛋白質であるカルモジュリンを巧妙な仕組みをもつ天然の分子機械として捉え、その分子機構に人工的な仕組みとして光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック分子を導入し、光刺激によってカルモジュリン標的蛋白質である分子モーター・ミオシンVの機能を制御することを試みた。その結果、ミオシンVのATP加水分解活性を光制御することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to photo-control myosin V as calmodulin target protein using photoresponsive calmodulin, which is modified with photochromic molecule. As a result, we successfully photo-controlled ATPase activity of myosin V.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2011年度	1,140,000	342,000	1,482,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,260,000	678,000	2,938,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：分子モーター、バイオテクノロジー、光スイッチ、生体分子

1. 研究開始当初の背景

(1) フォトクロミック分子は光の作用で可逆的に大きく構造変化を起こす分子で、表示材料、調光材料、光記憶材料、光スイッチ素子として利用されている光応答性ナノデバイスである。アゾベンゼン誘導体はフォトクロミック分子の代表的な化合物であり、右図のように紫外線・可視光線の照射で *cis-trans* の異性化に伴う構造変化を極めて早い応答で可逆的に起こすことが知られている。このフォトクロミック分子を工業的に応用する研究は活発に行われているが、生体機能分子へ

の応用例は少ない。

(2) 生体内には極めて巧妙な仕組みを持ち、高いエネルギー変換効率で作動する ATP 駆動型の生体機能分子や細胞情報伝達を担う制御系の生体機能分子が存在している。生体機能分子のいくつかにおいては、機械的な仕組みでエネルギーや情報が伝達されていることが知られており、このような生体機能分子を“生体分子機械”と捉える新しい概念が生まれた。これらの生体分子機械の機械的な仕組みに人工的な制御機構を導入することがで

できれば、ナノマシンとして利用できることが期待できる。

(3) カルモジュリン (CaM) は多くの細胞内制御機構において重要な役割を担うカルシウムイオン(Ca^{2+})結合蛋白質として大変よく知られている生体分子機械である。CaM は四つの EF ハンドをもち、この EF ハンドに Ca^{2+} が結合すると、CaM の構造が機械的に変化し、ミオシン軽鎖リン酸化酵素や分子モーターなどに代表される多くの生体機能分子の制御ペプチド鎖に巻き付き、その機能的蛋白質を活性化させ、次の反応に進めるようにする。このように CaM は細胞内の一連の情報伝達機構において、 Ca^{2+} 濃度の情報を酵素活性という情報に変換する役割を担っている。これまでの研究によって、CaM の構造や制御機構は分子レベルでよく調べられており、また極めて安定な構造をもっていることから、フォトクロミック分子を用いた光制御の研究に最も適した生体分子機械であると考えられる。本研究代表者は過去の研究において、CaM にフォトクロミック分子であるアゾベンゼン誘導体を導入することで、CaM と制御ペプチド鎖との結合を紫外線・可視光線照射によって光制御することに成功している。

(4) ミオシンは分子レベルでの機械的な仕組みや構造変化が解明されている生体分子機械あり、ATP 加水分解のエネルギーを筋収縮やその他の細胞質分裂、小胞輸送、情報伝達などの細胞運動中の直接的な力に変換している。ミオシンはその機能・作用別に多くの種類が存在しており、その中で近年活発に研究されているのがミオシン V である。ミオシン V は細胞内小器官をアクチンフィラメントに沿って輸送しており、CaM との結合・解離によって制御されている活性制御機構をもっている。この制御機構は、CaM がミオシン V の制御ペプチド鎖に結合すると、そのペプチド鎖が構造変化を起こしてミオシン V の活性部位まで伝わり、最終的にミオシン V の大きな構造変化を誘導するという極めて機械的な仕組みである。

2. 研究の目的

(1) 本研究では過去に開発に成功した光応答性 CaM を用いて、CaM ターゲット酵素であるミオシン V の機能を光制御することを試みた。ミオシン V は制御機構や生理機能がよく調べられていることから、光応答性 CaM のターゲット蛋白質として最適な生体分子機械であると考えられる。またミオシン V は

細胞内小器官の輸送機能をもっていることから、本研究が光制御型バイオナノロボット開発の基盤になることが期待される。

(2) 本研究の独創的なアイデアは、巧妙な機械的仕組みをもつミオシン V に本来存在しない人工的な制御機構を備えた制御蛋白質を導入して、非接触である光刺激によってその運動活性を制御させることである。またフォトクロミック分子を導入した CaM の光応答性制御蛋白質としての有用性を示すことは、この光応答性 CaM がミオシン V 以外のターゲット蛋白質の機能も光制御することが可能であることが期待される。その他にも、遺伝子操作の方法と組み合わせることにより、本来 CaM が結合しない生体分子機械にも応用することが可能であると考えられる。また本研究によって実際に生体機能分子の生理機能を光制御することは、光応答性 CaM が人工的なナノデバイスとして自然科学の研究分野のみならず医療産業や酵素を使った醗酵工業分野への応用も可能であることを思わせる。

3. 研究の方法

(1) ミオシン V の調製

運動活性をもつ HMM 型のミオシン V と、制御機構をもつ尾部のみの遺伝子をコードした cDNA を使用し、昆虫細胞と大腸菌を用いてミオシン V の HMM 型と尾部を申請者が確立した方法にしたがってそれぞれ発現・培養した。培養後、HMM 型と尾部に連結されているタグを利用し、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いてミオシン V の HMM 型と尾部をそれぞれ精製した。精製の純度は SDS-PAGE を用いて確認した。

(2) ミオシン V への光応答性 CaM の導入

培養・精製したミオシン V には内在性のネイティブな CaM が結合している。このネイティブな CaM を光応答性 CaM に置換した。ミオシン V に結合している CaM は Ca^{2+} 濃度が 10mM 以上の高い Ca^{2+} 条件のときに CaM の構造が変化し、その結果ミオシン V の制御ペプチドに結合できなくなり、溶液中に遊離する性質をもっている。したがってミオシン V に対して過剰の光応答性 CaM を溶液中に存在させている条件下で、一定時間高い Ca^{2+} 条件にし、EGTA によって再び低 Ca^{2+} 条件にすると、内在性のネイティブな CaM と外来の光応答性 CaM を入れ替えることが可能である。置換の確認はアクチンとの共沈実験によって

示した。ミオシン V はアクチンフィラメントと混合させると重合するので、超遠心によってミオシン V のみをアクチンと共に沈殿させることができる。この沈殿を SDS-PAGE することによって、溶液中の CaM とミオシン V に結合している CaM の濃度をそれぞれ示すことが可能なので、光応答性 CaM 特有のバンドの濃度から置換効率を算出し、光応答性 CaM の導入を確認した。

(3) 光応答性 CaM を導入したミオシン V の ATPase 活性の光制御実験

ミオシン V の ATPase 活性は Ca^{2+} 依存的に制御されていることが知られており、高 Ca^{2+} 条件 (10mM 以上) のときにはミオシン V の構造が全体的に伸びきった活性化状態になり、低 Ca^{2+} 条件 (1mM 以下) のときには小さく折り畳まれた不活性化状態になる。この構造変化を伴う活性制御のカギとなるのが、CaM の Ca^{2+} 依存的なミオシン V の制御ペプチドへの結合・解離である。本研究では、既に開発に成功しているアゾベンゼン誘導体の PAM [N-(4-phenylazophenyl) maleimide] (下図) を導入して調製した光応答性 CaM を用いて紫外線・可視光線照射することによって CaM の制御ペプチドへの結合・解離を光制御し、その結果ミオシン V の ATPase 活性を光制御した。紫外線・可視光線照射は確立した方法にしたがって行った。また ATPase 活性に関しては、ミオシン V の活性測定で一般的に行われている ATP 再生系の方法にしたがって行った。

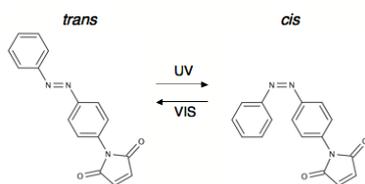


図 N-(4-phenylazophenyl) maleimide

(4) ケージド CaM によるミオシン V の光制御

フォトクロミック分子以外の化合物を利用した光応答性カルモジュリンを作製し、これを用いることによってミオシン V の活性を光制御することを試みる。カルシウムイオン結合部位を保護する化合物としては、システイン残基に特異的に結合し、紫外線照射によって

解離することができるケージド化合物である DMNBB (4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide) を用いた。DMNBB をフォトクロミック分子の修飾と同様の方法で化学修飾し、ミオシン V の CaM と置換した。DMNBB の解離には 355nm のパルスレーザーを用い、レーザー照射によってミオシン V の ATPase 活性が活性化させた。

(5) CaM ダイマーによるミオシン V の光制御

二価架橋性のアゾベンゼン誘導体である ABDM (4,4'-azobenzene-dimaleimide) を用いて CaM を架橋し、CaM ダイマーを調製した。調製は CaM と ABDM を 25°C で反応させ、未反応の ABDM や単量体の CaM は HPLC 精製によって除いた。CaM-ABDM ダイマーを前述の方法でミオシン V に導入し、同様に ATPase 活性の光制御実験を行った。また副産物の実験としてキネシンモノマーに CaM ターゲットペプチドである M13 ペプチドを連結させた K355-M13 の運動活性を、CaM ダイマーを用いて Ca^{2+} 濃度依存的に制御した。

4. 研究成果

(1) 運動活性をもつミオシン V の HMM 型と制御機構をもつ尾部を、それぞれ分子生物学的手法を用いて発現・培養させ、精製を行った。調製したミオシン V は十分な活性を保っていた。

(2) 調製したミオシン V には内在性の野生型 CaM が 6 個結合している。この野生型 CaM をフォトクロミック分子が導入されている光応答性 CaM に置換した。今回は 13 種類の光応答性 CaM を調製し、用いた。置換の確認はアクチンとの共沈実験によって行い、光応答性 CaM の導入に成功することができた。置換効率は Ca^{2+} 条件のときに 6 個中 4 個の CaM が、EGTA 条件の時には 6 個中 1~2 個の CaM が置換されたことが示された。

(3) 光応答性 CaM で置換したミオシン V に紫外線・可視光線照射をすることによって、ミオシン V の ATPase 活性の光制御を試みた。その結果多くの CaM 変異体で、ミオシン V の ATPase 活性を僅かではあるが光制御することができた。その中である傾向性がみられた。CaM は Ca^{2+} が CaM に結合することによって

活性化型になり、ミオシンVを活性化させることが知られている。CaMのCa²⁺結合部位は4箇所あり、今回はその内の1箇所、2箇所、または3箇所にそれぞれフォトクロミック分子を導入したフォトクロミック分子導入型CaM変異体を用いた。その結果、1箇所または2箇所のCa²⁺結合部位にフォトクロミック分子を導入したCaM変異体を用いた場合、ミオシンVのATPase活性は野生型と比較して僅かしか減少しなかった。一方、3箇所のCa²⁺結合部位にフォトクロミック分子を導入したCaM変異体を用いた場合、ミオシンVのATPase活性は劇的に減少した。これらの結果より、ミオシンVのATPase活性は、CaMのCa²⁺結合部位を3箇所以上化合物などで保護することによって制御できるのではないかと考えた。

(4)上記の仮説に基づき、より大きな光制御を期待してケージド化合物で修飾したCaged CaMを調製し光制御実験を行った。その結果、レーザー光照射前はミオシンVの活性が低いですが、レーザー光照射すると活性が増加するというこれまでよりも大きな光制御をすることができた。

(5)次にさらに大きい可逆的な光制御を目指して、CaMを二価架橋性アゾベゼン誘導体であるABDMで架橋しCaMダイマーを調製した。これによってフォトクロミック分子のみの光異性をより大きな変化へと変換することができ、これまでよりも大きな光制御が起きるのではないかと考えた。しかしこのCaMダイマーを用いたミオシンVの活性の光制御は大きいものではなかった。副産物的な結果ではあるが、このCaMダイマーを用いてモノマーの運動活性のないキネシンにCaMターゲットペプチドを連結させたところ、このキネシンの運動活性がCa²⁺濃度依存的に制御された。これに光制御機能を導入すれば、光制御機能をもつ分子シャトルを作成することが可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Hideki Shishido and Shinsaku Maruta,

Engineering of a novel Ca²⁺-regulated kinesin molecular motor using a calmodulin dimer linker, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、印刷中

② Hideki Shishido, Hideo Seo and Shinsaku Maruta, PHOTOCONTROL OF MOTOR PROTEINS USING PHOTO-RESPONSIBLE CALMODULIN DIMER, *Biophysical Journal*, 査読無、Vol.102, 2012, 371a
DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.2025

③ Hideki Shishido, Mitsuo Ikebe and Shinsaku Maruta, PHOTOCONTROL OF MYOSIN V ATPASE ACTIVITY USING CALMODULIN MODIFIED WITH PHOTOCROMIC COMPOUND, *Biophysical Journal*, 査読無、Vol.100, 2011, 487a
DOI: 10.1016/j.bpj.2010.12.2854

[学会発表] (計4件)

① Hideki Shishido, Hideo Seo and Shinsaku Maruta, Photocontrol of motor proteins using photo-responsive calmodulin dimer, *Biophysical Society*, 2012年2月27日、San Diego Convention Center (CA, USA)

② Hideki Shishido, Shinsaku Maruta, Photocontrol of Myosin V activity using Photo-responsive Calmodulin, 日本生物物理学会 2011年9月18日、兵庫県立大学 (兵庫県)

③ Hideki Shishido, Mitsuo Ikebe and Shinsaku Maruta, Photocontrol of Myosin V ATPase activity using Calmodulin modified with Photochromic compound, *Biophysical Society*, 2011年3月8日、Baltimore Convention Center (MD, USA)

④ Hideki Shishido, Shinsaku Maruta, Photocontrol of Myosin V ATPase using Calmodulin modified with Azobenzene derivative 日本生物物理学会 2010年9月20日、東北大学 (宮城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宍戸 英樹 (SHISHIDO HIDEKI)

創価大学・工学部・助教

研究者番号: 30580120