

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23750179

研究課題名（和文） 自己集合蛋白質の光制御システムの構築

研究課題名（英文） Construction of a photoregulating system for self-assembly proteins

研究代表者

宇井 美穂子 (UI MIHOKO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：30549580

研究成果の概要（和文）：自己集合蛋白質の一つである黄色ブドウ球菌由来孔形成毒素 Hla に光受容蛋白質 PYP を遺伝子工学的に融合し、物質の膜透過性を光によって制御する生体分子デバイスを二種類構築した。分光学的解析により、いずれも光反応サイクルを保持し、光照射下において Hla を介したイオン透過が阻害されることが示唆された。本研究での成果は、今後の蛋白質を基材とした光応答型ナノ細孔開発へ大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We constructed two types of photo-controlled nano-pore devices based on PYP photoreceptor-fused staphylococcal pore-forming toxin alpha-hemolysin. The both PYP-fused devices had the similar photocycle as wild type PYP and inhibited the transmission efficiency of ions through the sheep red blood cells membrane under light irradiation. These PYP-fused devices will serve molecular basis for nano-pore devices of which activity is easy to be arbitrarily tuned by light irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：光応答性蛋白質、自己集合蛋白質、photoactive yellow protein、alpha-hemolysin、光制御

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、生体の構造形成から生命活動すべてに渡る生命活動に主要な役割を果している。人為的に外部刺激を与えることによって目的とする蛋白質機能を自在に制御することが可能になれば、いわば恒常性が乱れた状態である病気の治療や、生体分子を基盤とした分子デバイスの開発、さらに生命化学研究の更なる発展に大きく寄与することが期待できる。外部刺激として、“光”は高い時空間分解能を有することから特に厳密な制御を必要とする場合には、非常に有用な手段である。また、特に蛋白質などの生体分子を利用したものは生体親和性が高く、臨床への応用への可能性も高くなる。このような観点

から、種々の光受容蛋白質を用いた生体分子への光応答性の付与についていくつか研究例は報告されている。しかし、その分子機構は完全には解明されておらず、未だ合理的な光応答性蛋白質の設計には至っていない。

光受容蛋白質 photoactive yellow protein (PYP)は、紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira halophila* から単離された光受容蛋白質であり、これまでにその分子特性がよく研究され、光吸収によって発色団の異性化、プロトン化に伴う大きな高次構造変化が起こることが報告されている。光応答性モジュールとしての応用がまだ限られている PYP を、その光受容部位として孔形成蛋白質をモデルとした自己集合蛋白質に融合することで、機能性ナ

ノ細孔デバイス開発への貢献と同時に、今後の PYP による蛋白質機能制御系構築において大きな指針を与えられるものと期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、光のシグナルを PYP の高次構造変化を介して目的蛋白質へ伝達する、“光応答型蛋白質 PYP による蛋白質の機能制御系の構築”を目的とした。目的蛋白質としては、実際に薬物送達システムや分析化学への応用が期待されている黄色ブドウ球菌由来の孔形成毒素蛋白質である  $\alpha$ -hemolysin を用いた。この  $\alpha$ -hemolysin に PYP を遺伝子工学的に融合することで、 $\alpha$ -hemolysin が自己集合することによって発現する孔形成能を光によって制御すること、また、その分子機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

二種類の PYP 融合 Hla は、大腸菌発現ベクター構築後、大腸菌株 BL21(DE3)を用いて大量発現させた。菌体可溶性画分を回収し、 $\text{Ni}^{2+}$ キレートアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製、サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製を経て目的蛋白質を得た。蛋白質純度の確認は、SDS-PAGE にて行った。PYP 融合 Hla の活性評価は、綿羊赤血球をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で懸濁し、目的蛋白質(0.7 mg/mL)を 50  $\mu\text{L}$  添加した。その時の  $\text{OD}_{700\text{ nm}}$  の濁度を 25  $^{\circ}\text{C}$  にて、450 nm 照射下あるいは非照射下で測定し、溶血速度を比較した。また、目的蛋白質の光応答性については、照射下および非照射下での紫外可視吸収スペクトルの測定、円偏光二色性スペクトルの測定を行い、合わせて時間変化を解析することで評価した。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて分子形状を詳細に観察した。

## 4. 研究成果

まず、それぞれ N、C 末端に PYP を融合した二種類の PYP 融合 Hla (PYP-N、C-Hla)をデザインし、大腸菌発現系によって大量調製を行った。サイズ排除クロマトグラフィーでの溶出位置から、いずれの蛋白質も野生型 Hla と同様に水溶液中で単量体として存在することが示唆された。PYP-N-Hla の透過型電子顕微鏡による観察では、6.25 mM デオキシコール酸 Na 存在下で野生型 Hla と同様に 7 量体を形成することが確認できた(Fig. 1)。

照射下でのそれぞれの吸収スペクトルを測定したところ、基底状態の PYP に由来する 446 nm 付近の吸光度は低下し、光反応サイクル中で生じる中間体  $\text{PYP}_M$  に由来する 350 nm 付近の吸光度が上昇した。また、その現象は光の ON/OFF を繰り返すと可逆的な変

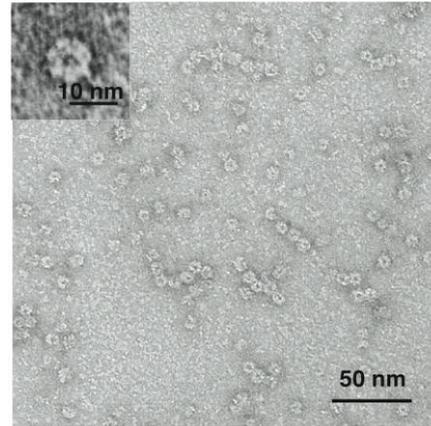


Fig.1 The transmission electron micrograph of PYP-N-Hla.

化を示した。これは、野生型 PYP がもつ光反応サイクルの性質を示しており、このことから、PYP 融合 Hla も野生型 PYP と同様に光反応サイクルを持つことが示唆された。次に、それぞれの蛋白質の溶血活性について 25  $^{\circ}\text{C}$  で比較したところ、特に、PYP-N-Hla では、450 nm の照射下では非照射下と比較して溶血速度が顕著に低下することが明らかと

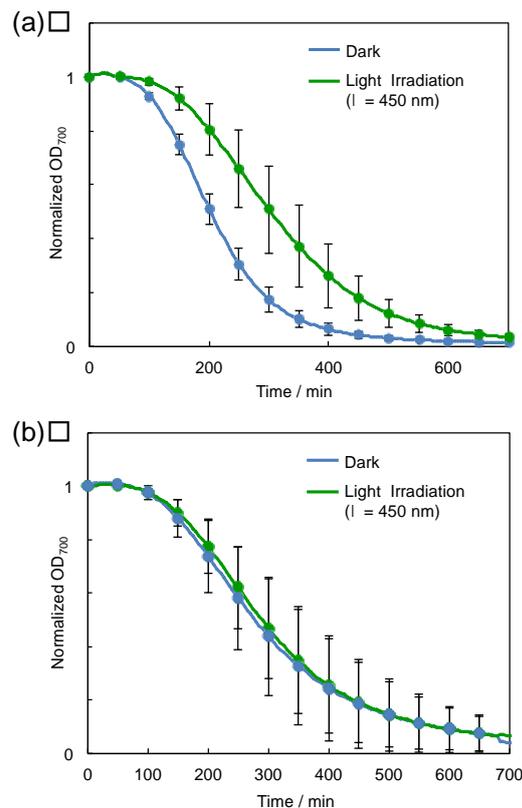


Fig.2 Time course curves of hemolysis of sheep blood cells by (a) PYP-N-Hla and (b) apoPYP-N-Hla in PBS in the dark and under irradiation with visible light.

なった(Fig. 2 (a)). 一方、発色団を持たない PYP-N-Hla では、光照射の有無による溶血活性の差はほとんど認められなかった(Fig. 2(b)). したがって、PYP を融合させることにより Hla の溶血活性に光応答性を付与することに成功した。

さらに、その機構を詳しく解析するため、分子内にジスルフィド結合を有し、酸化体で孔形成能が抑制される改変型 PYP-Hla-SS を用いて検討を行った。還元剤添加後において、光照射下および非照射下で溶血速度を比較したところ、光照射下での活性低下が認められた。つまり、PYP による光制御は、Hla 部位の 7 量体形成後の膜貫通領域形成過程あるいは孔形成後のイオン透過の抑制に影響していることが明らかとなった。以上の結果から、PYP を Hla に融合することにより、光受容部位である PYP ドメインで光を吸収し、その情報を Hla 部位へ伝達することで溶血機能を光でコントロールすることが可能となり、今後の蛋白質を基材とした光応答型ナノ細孔開発へ大きく貢献すると期待される。

#### 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 4 件)

1. Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Mihoko Ui, Shunichi Kawasaki, Nabanita Sadhukhan, Haruki Obara, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, and Kazushi Kinbara, “A Structured Monodisperse PEG for the Effective Suppression of Protein Aggregation”, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **52**, 2430-2434 (2013), DOI: 10.1002/anie.201206563 (査読有).
2. Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, Tsumoto K, Sugiyama A, “Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin”, *Protein Science*, **22**(2), 213-221 (2013), DOI: 10.1002/pro.2203 (査読有).
3. Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Kazushi Kinbara, “Amplification of Light-induced Molecular-Shape Change by Supramolecular Machines”, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, **25**, 655-658 (2012), URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/photopolymer/25/5/25\\_655/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/photopolymer/25/5/25_655/_pdf) (査読無).
4. Ui M, Tanaka Y, Araki Y, Wada T, Takei T, Tsumoto K, Endo S, Kinbara K, “Application of photoactive yellow protein as a photoresponsive module for controlling hemolytic activity of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin”, *chemical communications*, **48**(39), 4737-4739 (2012), DOI: 10.1039/c2cc18118e (査読有).

[学会発表] (計 24 件)

1. 宇井美穂子, 播磨耕祐, 田中良和, 田端和仁, 野地博行, 秋山公男, 武井俊朗, 津本浩平, 金原数, 機能性分子導入による孔形成蛋白質 alpha-hemolysin の機能制御, 日本化学会第 93 回春期年会, 京都, (2013. 3. 22-2013. 3. 25)
2. 新井康広, 宇井美穂子, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 高橋泰人, 金原数, cAMP の可逆制御を目指した光応答性 PDE の創製, 日本化学会第 93 回春期年会, 京都, (2013. 3. 22-2013. 3. 25)
3. 宇井美穂子, 播磨耕祐, 田中良和, 田端和仁, 野地博行, 秋山公男, 金原数, 機能性人工分子が形作るナノ細孔の光制御, 日本生物物理学会 東北支部会 2012, 日本, 仙台, (2012. 12. 21),
4. Y. Arai, M. Ui, H. Takahashi, K. Kinbara, Design of Photoresponsive Phosphodiesterase toward Reversible Control of cAMP, 第 9 回国際高分子会議(The 9th SPSJ International Polymer Conference(IPC2012)), 日本, 神戸, (2012. 12. 11-2012. 12. 14)
5. Yusuke Miyauchi, Mihoko Ui, Makoto Murakami, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Kazushi Kinbara, Development of Engineered Photoactive Yellow Protein as a Photoresponsive module for Controlling Biological Events, 第 9 回国際高分子会議(The 9th SPSJ International Polymer Conference(IPC2012)), 日本, 神戸, (2012. 12. 11-2012. 12. 14)
6. T. Muraoka, K. Adachi, M. Ui, S. Kawasaki, N. Sadhukhan, H. Obara, H. Tochio, M. Shirakawa, K. Kinbara, Discrete Non-Linear PEGs for Protein Manipulation, 第 9 回国際高分子会議(The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012)), 日本, 神戸, (2012. 12. 11-2012. 12. 14)
7. 宮内佑輔, 宇井美穂子, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 金原数, 光応答性モジュールを指向した改変型 PYP の創製, 第 2 回 CSJ 化学フェスタ 2012, 日本, 東京, (2012. 10. 14-2012. 10. 17)
8. Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, Synthesis

- of PEG Derivatives and Their Application in Protein Stabilization, 第 61 回高分子討論会 (61st Symposium on Macromolecules), 日本, 名古屋, (2012. 9. 19-2012. 9. 21)
9. 宇井美穂子, 田中良和, 荒木保幸, 和田健彦, 武井俊朗, 津本浩平, 金原 数, 光応答性分子を用いた孔形成蛋白質 alpha-hemolysin の光制御, 第 6 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 日本, 札幌, (2012. 9. 6-2012. 9. 8)
  10. Yasuhiro Arai, Mihoko Ui, Hiroto Takahashi, Kazushi Kinbara, Design of Photo-responsive Phosphodiesterase toward Reversible Control of cAMP, キャンパスアジアサマースクール, 日本, 仙台, (2012. 8. 21-2012. 8. 22)
  11. Shunichi Kawasaki, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kouta Adachi, Kazushi Kinbara, Development of a structured PEG molecule for protein manipulation, グローバル COE サマースクールシンポジウム (Global COE Summer School Symposium), 日本, 仙台, (2011. 8. 18-2011. 8. 19)
  12. Mihoko Ui, Kousuke Harima, Yoshikazu Tanaka, Toshiaki Takei, Kouhei Tsumoto, Kazushi Kinbara, Construction of photocontrollable nano-pore devices by grafting an engineered transmembrane units, The second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012, 日本, 沖縄, (2012. 7. 4-2012. 7. 6)
  13. Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, Designer PEG-Conjugates for Protein Stabilization, The second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012, 日本, 沖縄, (2012. 7. 4-2012. 7. 6)
  14. 宇井美穂子, 播磨耕祐, 田中良和, 荒木保幸, 和田健彦, 武井俊朗, 津本浩平, 金原数, 光応答性分子を用いた孔形成毒素 alpha-hemolysin の光制御系の構築, 第 22 回バイオ・高分子シンポジウム, 日本, 東京, (2012. 6. 25-2012. 6. 26)
  15. 宇井美穂子, 田中良和, 荒木保幸, 和田健彦, 武井俊朗, 津本浩平, 金原 数, 光受容蛋白質 Photoactive Yellow protein を用いた Staphylococcal alpha-Hemolysin の溶血活性制御, 第 61 回高分子学会年次大会 (61st SPSJ Annual meeting), 日本, 横浜, (2012. 5. 29-2012. 5. 31)
  16. 宇井美穂子, 田中良和, 荒木保幸, 和田健彦, 武井俊朗, 津本浩平, 金原数, 光応答性蛋白質 Photoactive Yellow protein 融合 Staphylococcal alpha-Hemolysin の機能制御, 日本化学会 第 92 回春期年会, 神奈川, (2012. 3. 25-2012. 3. 28)
  17. 播磨耕祐, 宇井美穂子, 田中良和, 石井則行, 金原数, 人工分子を用いた Staphylococcus aureus  $\alpha$ -hemolysin の溶血活性の制御, 日本化学会 第 92 回春期年会, 神奈川, (2012. 3. 25-2012. 3. 28)
  18. 村岡貴博, 安達皓太, 宇井美穂子, 河崎俊一, 朽尾豪人, 白川昌宏, 金原数, 構造化 PEG 分子の合成とその性質 (1) (Synthesis and Characterization of Discrete Non-Linear PEGs (1)), 日本化学会第 92 春季年会 (The 92nd Annual Meeting of the Chemical Society of Japan), 日本, 神奈川, (2012. 3. 25-2012. 3. 28)
  19. 河崎俊一, 村岡貴博, 宇井美穂子, 安達皓太, 金原 数, 構造化 PEG 分子の開発とタンパク質マニピュレーションへの応用, 平成 23 年度化学系学協会東北大会, 日本, 仙台, (2011. 9. 17-2011. 9. 18)
  20. 河崎俊一, 村岡貴博, 宇井美穂子, 安達皓太, 金原数, 構造化 PEG 分子の開発とタンパク質マニピュレーションへの応用, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 日本, つくば, (2011. 9. 12-2011. 9. 14)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等  
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/kinbara/index-j.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 宇井 美穂子 (UI MIHOKO)  
 東北大学・多元物質科学研究所・助教  
 研究者番号: 30549580
  - (2) 研究分担者  
 該当なし
  - (3) 連携研究者  
 該当なし