

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410166

研究課題名(和文) 光応答性分子のモジュール化と蛋白質の光制御系構築

研究課題名(英文) Development of a photoresponsive module for protein photoregulation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：外部刺激として光は高時空間分解能にて制御可能である上、非侵襲的な側面を持つことから生体分子制御において有効な手段となる。本研究では、反応性官能基を導入することで光受容蛋白質PYPを由来とする光応答性モジュールを開発した。改変型PYPは蛋白質のモデル分子となる親水性高分子と定量的に反応し、粘性を有するPYP-高分子複合体を形成した。複合体中において改変型PYPは光反応性を保持していることが明らかとなり、光照射に伴う粘度の可逆的な低下が認められた。したがって、光応答性モジュールPYPによる蛋白質制御への足掛りとなるコンセプトを提示すると共に、光応答性材料への応用の可能性を示唆することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Light has been considered as an effective tool to regulate biomolecules due to its high spatiotemporal resolution and noninvasive properties. In this study, we developed photoresponsive modules based on photoreceptor PYP by providing an unnatural amino acid bearing a chemically reactive group instead of methionine. The engineered PYP was coupled with the hydrophilic copolymer, resulting in generation of photoresponsive protein-polymer conjugates. The viscosity of the resulting conjugate was reversibly decreased by blue light irradiation. This material would possibly be applicable for construction of photoresponsive biomaterials and also broaden the potential of engineered PYP as a photoresponsive module for optical regulation of molecules.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：光制御 光受容蛋白質 PYP

1. 研究開始当初の背景

生体内ではたらく生体分子の機能発現は、場所、時間、程度が厳密に制御されることで生命体の恒常性が維持されている。生体分子を自在に制御することは、いわば恒常性が乱れた状態である病気の治療や、複雑な生命システムの解明を含めた生物学的研究の基盤技術に繋がる。特に、最近では、オプトジェネティクスをはじめ光を使った新しい技術が盛んに研究されており、光を使って生体内で働く機能性蛋白質を操作することによって細胞活動を計測、あるいは人為的に操作しようとする試みがなされている。外部刺激として、光は高時空間分解能にてコントロールが可能である上、波長によっては非侵襲的な側面を併せ持つことから、生体への応用において有効な手段の一つと成り得る。

蛋白質の光制御に関しては、フォトクロミック化合物を目的蛋白質に対して部位特異的に修飾し、光照射に伴う化合物の化学変化を介して機能制御を実現した例が数多く報告されている。しかし、光照射に伴うフォトクロミック化合物の動きの範囲は蛋白質と比べると限定的であり、最も効率良く影響を与え得る修飾部位を特定するには網羅的な解析が必要となる場合も多い。一方、光受容蛋白質は、フォトクロミック化合物と比較すると動きの程度は広範囲に及ぶものの、導入に関しては遺伝子工学的手法を用いるのが一般的である。そのため、場合によっては蛋白質発現量の極端な減少や目的蛋白質がもつ本来の機能への悪影響を生じさせる可能性も否定できない。光受容蛋白質は、光エネルギーを構造変化やそれに伴う分子特性変化へとシグナル変換させるトランスデューサーとして高い機能性を有しており、化学修飾が自在なモジュールとして発展させることは非常に意義深い。

2. 研究の目的

光受容蛋白質の中でも、紅色光合成細菌由来 photoactive yellow protein (PYP) は、分子量 14 kDa 程度と比較的小さいサイズの水溶性球状蛋白質であることから、化学反応を介した目的分子との連結において汎用性が高いと考えられる。また、PYP は 450 nm 付近の可視光を吸収することによって発色団の光異性化に伴う広範囲な高次構造の変化が起こることが報告されており、トランスデューサーとしての機能も多いに期待できる。これまでに、我々は目的蛋白質である孔形成毒素 α -hemolysin の光制御を目的に PYP を遺伝子工学的に融合し、その機能を光によってコントロールすることに成功している。しかし、PYP の化学修飾に関しては、分子内に持つ一つのシステイン残基が発色団の結合に使われているため、システイン残基を介した特異的化学反应、例えばマレイミド基やプロモアセトアミド基との化学反応を利用することは難しい。そこで、本研究では PYP をモジュ

ール化するにあたって反応性を付与するため、Huisgen 反応に着目した。この反応は、アルキンとアジドをもつ分子同士を銅触媒下で付加環化反応させることによってトリアゾール環を形成する反応である。最大の利点は、水中かつ温和な反応条件でも進行し、高収率・高選択性・高速反応性をもつ点である。PYP にアルキニル基あるいはアジド基を導入することができれば、それぞれに対応する官能基を持った分子に特異的に結合させることが可能となる。

本研究では、光を外部刺激として用いた分子内シグナル伝達について焦点を当て、PYP の光受容部位としてのモジュール化とそれを用いた分子制御系の構築を目指した。機能制御の対象分子としては目標を蛋白質に据えた上で、まずはモデル高分子化合物との反応効率、光反応性、および光応答挙動についての基盤情報を集めることとした。

3. 研究の方法

アルキニル基導入型 PYP に関しては、メチオニン要求性大腸菌株 B834(DE3) を用いてメチオニン類縁体 L-homopropargylglycine (L-Hpg) を含んだ M9 最少培地中 28 条件下にて一晩培養し、発現を行った。p-クマル酸無水物を用いて再構築後、 Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにて精製した。得られた蛋白質の分子量および純度に関しては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびエレクトロスプレーイオン化法による質量分析 (ESI-TOF-MS) にて確認した。親水性高分子については、N,N-Dimethylacrylamide (DMA) および glycidyl methacrylate (GMA) の共重合体を合成し、エポキシドの開環反応によるアジド化を行った後、モジュール化 PYP との反応に用いた。反応効率の相対比較では、全反射測定法を用いた日本分光のフーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR 4100 によるスペクトル測定にてピーク強度を基盤に評価した。PYP 関連試料の光反応性に関しては、日本分光の円二色性分散計 J-820 を用いてスペクトル測定とピーク波長における経時変化測定を行った。また、得られた蛋白質-高分子複合体の物性評価に関しては、水晶振動子微小重量測定法 (QCM-D 法) を用いた。光照射の光源には、朝日分光の光照射装置 LAX-102 を用いてバンドパスフィルターと組み合わせることで $450 \pm 10 \text{ nm}$ の光を用いた。

4. 研究成果

PYP のモジュール化に向けて分子内に存在する 5 つのメチオニン残基のうち N 末端以外の 4 つの残基のアラニン置換を行った。大腸菌発現ベクターを構築後、メチオニン要求性大腸菌株 B834(DE3) を用いた大量培養を行い大腸菌可溶性画分から収率およそ 5 mg/l L culture で得られた。質量分析の結果、N 末端にのみ L-Hpg が組み込まれた PYP 改変体

(Hpg1-PYP)であることが確認出来た。紫外可視吸収スペクトル測定の結果、Hpg1-PYP は 350 nm 付近に大きな吸収帯を持ち、450 nm 付近にも僅かながら吸収帯を持つことが明らかとなった。446 nm の吸光度について光照射後の経時変化を観察したところ光照射に伴って増大し、かつ時間とともに減衰する様子が観察された。これについては可逆性が確認出来ず、光反応サイクルも認められなかった。吸収スペクトルでは 350 nm の吸光度が主体であることから Hpg1-PYP の大部分の分子は unfold して発色団が溶媒に露出した状態であること、またわずかに光応答性を有した分子においても可逆性を有しておらず野生型 PYP とは大きく異なる特性を持つことが明らかとなった。

次に、分子内に存在する 5 つのメチオニン残基を全て L-Hpg に置き替えた PYP 改変体 (Hpg5-PYP) を調製した。L-Hpg を添加した M9 最少培地にて大腸菌 B834(DE3)株を用いた大量培養を行い、再構築後、Hpg5-PYP を収率およそ 10 mg/ 1L culture で得た。紫外可視吸収スペクトルおよび円偏光二色性スペクトル測定にて解析した結果、Hpg5-PYP は野生型 PYP に類似した光応答性を示す一方で、光反応中間体の寿命は野生型と比較して 16 倍程度長いことが明らかとなった。また、Hpg 残基の反応性について評価したところ、5 つのアルキニル基のうち 2~3 つがアジド基に対する良好な反応性を有していることが示唆された。

そこで、次に蛋白質制御へ向けた足掛りとしてアジド基を有する親水性高分子をモデル分子として合成した。Hpg5-PYP が有するアルキニル基に対しておよそ 100 当量のアジド基を有した親水性高分子を加え、一価の銅イオンおよびアスコルビン酸存在下で 25 にて一晚反応させたところ、Hpg5-PYP はすべて親水性高分子と反応し、PYP-高分子複合体が形成された。得られた複合体の分光学的解析の結果、Hpg5-PYP はアジド基と反応した複合体中であっても、発色団を分子内部に保持した野生型と近い構造を有しており、光反応中間体の寿命は 1.6 倍程度長くなっていったものの光反応サイクルを持つことが明らかとなった。

Hpg5-PYP に対して添加する親水性高分子の当量を下げたところ、未反応のアジド基の残存率の低下とともに PYP-高分子複合体の粘度が増大し、最終的にはゲル状物質が得られた。得られた複合体はいずれも黄色を呈しており、PYP の立体構造がある程度保たれていることが推察された。PYP-高分子複合体のうち、粘性液体として得られた試料について光照射、非照射下において水晶子微小重量測定法(QCM-D 法)を用いた粘弾性測定を行った。その結果、光照射に伴い PYP-高分子複合体の粘度は低下することが明らかとなり、また暗条件下に置くことで粘度が回復するという可逆性も観察された。これに対して、

Hpg5-PYP と親水性高分子とを共有結合を介せず単に混和した状態の混合試料に関しては、光照射に伴う粘度変化は認められなかった。したがって、PYP の光照射に伴う高次構造変化の情報は高分子との共有結合を介することで、分子全体の物性変化へと伝搬されたことを示す。

今回の結果は、PYP の光応答性モジュールとしての目的分子への導入において基盤となるコンセプトを提示するとともに、PYP-高分子複合体が明確な光応答性を有したことから光応答性材料としての応用の可能性を示唆するものとなった。

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. Sadhukhan N., Muraoka T., Ui M., Nagatoishi S., Tsumoto K., Kinbara K., "Protein stabilization by an amphiphilic short monodisperse oligo(ethylene glycol)", *Chem. Commun.*, 査読有, 2015, Vol.51, No.40, pp.8457-8460, DOI: 10.1039/c4cc10301g.
2. Ui M., Harima K., Takei T., Tsumoto K., Tabata K.V., Noji H., Endo S., Akiyama K., Muraoka T., Kinbara K., "Grafting synthetic transmembrane units to the engineered low-toxicity -hemolysin to restore its hemolytic activity", *Molecular bioSystems.*, 査読有, Vol.10, No.12, 2014, pp.3199-3206, DOI: 10.1039/c4mb00405a.
3. Muraoka, T., Sadhukhan, N., Ui, M., Kawasaki, S., Flazemi, E., Adachi, K., Kinbara, K., "Thermal-aggregation suppression of proteins by a structured PEG analogue: Importance of denaturation temperature for effective aggregation suppression", *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 査読有, Vol. 86, 2014, pp.41-48, DOI: 10.1016/j.bej.2014.03.001.

[学会発表](計 30 件)

1. Mihoko Ui, Yasuhiro Arai, Makoto Murakami, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Hiroto Takahashi, Kazushi Kinbara, "Application of photoactive yellow protein as a photoresponsive module for controlling enzymatic activity", THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015, アメリカ合衆国, ハワイ州ホノルル, (2015.12.15-2015.12.20)
2. Tatsuya Maejima, Mihoko Ui, Yasuyuki

- Araki, Kazushi Kinbara, Takehiko Wada, "Development of Photoresponsive Functional Material Utilizing the Engineered Photoactive Yellow Protein", Chemistry Summer School 2015, 日本, 仙台市, (2015.8.26-2015.8.29)
3. Shouta Maruyama, Mihoko Ui, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara, "Construction of PEG-incorporated Synthetic Protein", Chemistry Summer School 2015, 日本, 仙台市, (2015.8.26-2015.8.29)
 4. 前島辰哉, 宇井美穂子, 荒木保幸, 和田健彦, 金原数, 「光応答性タンパク質の特性を利用した機能性材料の創製」, 日本化学会 第 95 春季年会, 日本, 船橋市, (2015.3.26-2015.3.29)
 5. 丸山翔太, 宇井美穂子, 村岡貴博, 高橋泰人, 金原数, 「PEG 導入型人工タンパク質の構築」, 日本化学会 第 95 春季年会, 日本, 船橋市, (2015.3.26-2015.3.29)
 6. K. Kinbara, T. Muraoka, K. Adachi, M. Ui, S. Kawasaki, N. Sadhukhan, H. Obara, M. Laguerre, H. Tochio, M. Shirakawa, "Engineering of Mono-Disperse Oligoethylene Glycols for Protein Manipulation", ASIAN CHEMICAL BIOLOGY CONFERENCE 3(ACBC2014), シンガポール共和国, シンガポール, (2014.12.15-2014.12.17)
 7. 前島辰哉, 宇井美穂子, 宮内佑輔, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 金原数, 「光応答性タンパク質を用いた新規機能性材料の創製」, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014 日本化学会秋季事業, 日本, 東京都, (2014.10.14-2014.10.16)
 8. 丸山翔太, 宇井美穂子, 三浦紗理, 村岡貴博, 高橋泰人, 金原数, 「機能性分子導入型タンパク質の構築」, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014 日本化学会秋季事業, 日本, 東京都, (2014.10.14-2014.10.16)
 9. 宇井美穂子, 新井康広, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 高橋泰人, 金原数, 「生体機能制御を指向した光応答性タンパク質の構築と細胞性粘菌を用いた評価」, 第 4 回 日本細胞性粘菌学会年会, 日本, 仙台市, (2014.10.11-2014.10.12)
 10. 宇井美穂子, 「光受容蛋白質を基盤とした機能性分子の開発」, 多元研生物物理合同セミナー, 日本, 仙台, (2014.7.2)
 11. 宇井美穂子, 新井康広, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 高橋泰人, 金原数, 「光応答性 PYP 融合酵素を用いた cAMP 濃度制御システムの構築」, 平成 25 年度アライアンス成果報告会, 日本, 豊中市, (2014.5.30)
 12. Mihoko Ui, Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara, "The amphiphilic PEG additives for suppression of protein aggregation", 10th International Conference on Protein Stabilisation (ProtStab2014), Italy, Stresa (Lake Maggiore), (2014.5.7-2014.5.9)
 13. Kazushi Kinbara, Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Mihoko Ui, Shunichi Kawasaki, Nabanita Sadhukhan, Haruki Obara, "Stabilization of proteins by a structured oligoethylene glycol analogues with non-linear geometry", 10th International Conference on Protein Stabilisation (ProtStab2014), Italy, Stresa (Lake Maggiore), (2014.5.7-2014.5.9)
 14. 宇井美穂子, 新井康広, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 高橋泰人, 金原数, 「光応答性 phosphodiesterase の構築と生体機能光制御への応用」, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 日本, 名古屋市, (2014.3.27-2014.3.30)
 15. 三浦紗理, 村岡貴博, 宇井美穂子, 高橋泰人, 金原数, 「機能性分子を組み込んだハイブリッドタンパク質の構築とその活性評価」, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 日本, 名古屋市, (2014.3.27-2014.3.30)
 16. 宮内佑輔, 宇井美穂子, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 金原数, 「改変型光応答性タンパク質モジュールを利用したソフトマテリアルの創製」, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 日本, 名古屋市, (2014.3.27-2014.3.30)
 17. Adam M. Wawro, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, "Non-linear amphiphilic discrete oligo(ethylene glycol)s: synthesis and protein modification", 12th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, New Zealand, Auckland, (2013.12.9-2013.12.13)
 18. Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, "Monodisperse Amphiphilic PEG Macromonomer Refolds Protein Effectively", XVI National Conference On Surfactants, Emulsions and Biocolloids (NATCOSEB), India, Chennai, (2013.11.28-2013.11.30)
 19. Kazushi Kinbara, Mihoko Ui, Kousuke Harima, Sumire Endo, Kimio Akiyama, Yoshikazu Tanaka, "Design of Engineered -Hemolysins for Regulation of Hemolytic Activity by External Stimuli", Tenth

- International Conference on Flow Dynamics, 日本, 仙台市, (2013.11.25-2013.11.27)
20. Saori Miura, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, "Development of a Photoresponsive Hybrid Protein", 平成 25 年度化学系学協会東北大会及び日本化学会東北支部 70 周年記念国際会, 日本, 仙台市, (2013.9.30)
21. Sadhukhan Nabanita, Muraoka Takahiro, Mihoko Ui, Kinbara Kazushi, "Functionalized PEGs As An Effective Protein Manipulator", International Symposium for 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 日本, 仙台市, (2013.9.28-2013.9.30)
22. Mihoko Ui, Yasuhiro Arai, Makoto Murakami, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Hiroto Takahashi, Kazushi Kinbara, "Construction of a photocontrol system of cAMP level based on the photoresponsive phosphodiesterase", 平成 25 年度化学系学協会東北大会及び日本化学会東北支部 70 周年記念国際会議, 日本, 仙台市, (2013.9.28-2013.9.30)
23. 宇井美穂子, 新井康広, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 高橋泰人, 金原数, 「光応答性蛋白質を用いた cAMP 濃度制御システムの構築」, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 日本, 名古屋市, (2013.9.27-2013.9.29)
24. 宮内佑輔, 宇井美穂子, 村上慎, 荒木保幸, 和田健彦, 金原数, 「光応答性バイオマテリアルへの応用を指向したモジュール化 PYP の創製」, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 日本, 名古屋市, (2013.9.27-2013.9.29)
25. Mihoko Ui, "A photocontrollable nanopore-device based on chemically Hybridized pore-forming toxin -hemolysin", Faraday Discussion 166: Self-assembly of biopolymers, England, Bristol, (2013.9.16-2013.9.18)
26. M. Ui, K. Harima, Y. Tanaka, K. Tabata, H. Noji, T. Takei, K. Tsumoto, K. Kinbara, "A photocontrollable nanopore-device based on chemically Hybridized pore-forming toxin alpha-hemolysin", Faraday Discussion 166: Self Assembly of Biopolymers, イギリス, ブリストル, (2013.9.16-2013.9.18)
27. Saori Miura, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kazushi Kinbara, "Development of a Photoresponsive Hybrid Protein", 東北大学化学系サマースクール, 日本, 仙台市, (2013.8.29-2013.8.30)
28. Yusuke Miyauchi, Mihoko Ui, Makoto Murakami, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, Kazushi Kinbara, "Creation of a Photoresponsive module based on the engineered PYP", Tohoku University Campus Asia Summer School 2013, 日本, 仙台市, (2013.8.29-2013.8.30)
29. 村岡貴博, 安達皓太, 宇井美穂子, 河崎俊一, Nabanita Sadhukhan, 小原春樹, 朽尾豪人, 白川昌宏, 金原数, 「構造化 PEG 分子の開発とタンパク質操作への応用」, 第 24 回 万有仙台シンポジウム, 生命現象の理解と制御を目指す有機合成化学, 日本, 仙台市, (2013.6.29)
30. Mihoko Ui, Kousuke HARIMA, Yoshikazu TANAKA, Kazuhito TABATA, Hiroyuki Noji, Toshiaki TAKEI, Kouhei TSUMOTO, Kazushi KINBARA, "Constructing nano-pore devices based on pore-forming toxin -hemolysin by replacing its transmembrane region with chemical compounds", NIH-Tohoku University-JSPS 国際シンポジウム, 日本, 仙台市, (2013.5.9-2013.5.10)

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

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