

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840044

研究課題名(和文) in situで構造変化を光誘起するモーター蛋白質内組み込み型ヌクレオチドの開発

研究課題名(英文) Development of a built-in type nucleotide which induces a structural change in a motor protein by light irradiation

研究代表者

亀井 敬 (Kamei, Takashi)

北陸大学・薬学部・講師

研究者番号：90450650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、モータータンパク質の構造変化を光可逆的に誘起できるヌクレオチド誘導体の合成を試みた。目的とする化合物は、タンパク質に共有結合する部位、光応答する部位、ヌクレオチド部位から構成されるよう設計した。現段階では、共有結合する部位と光応答部位からなる、いくつかのキメラ化合物の合成は成功しているが、最終化合物を得るには至っていない。これらのユニットとヌクレオチドユニットをカップルさせたの最終化合物の合成、精製手段を検討中である。

研究成果の概要(英文)：I have attempted to synthesize nucleotide derivatives which induce structural changes in a motor protein via photo-irradiations. Target compounds were designed to consist of a covalently binding unit to the protein, a photo-responsive unit and a nucleotide unit. At this stage, I succeeded in synthesizing several chimeric compounds consists of the covalently binding unit and the photo-responsive unit. However, the target compounds have not been obtained. Synthesis and purification methods of the final target nucleotide derivatives coupled with the chimeric units are under investigation.

研究分野：生物物理、複合化学

キーワード：フォトクロミック分子 モータータンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) ATP (adenosine 5'-triphosphate) は加水分解によって、種々のモータータンパク質の駆動エネルギーを供与する分子として広く知られており、生命活動にとって必須である。

(2) モータータンパク質にとどまらず、様々な ATP 加水分解酵素の機能メカニズムを解明するためには、ATP 加水分解の素過程に対応する構造・生化学的な知見が不可欠となっている。

(3) そのために、ATP 結合状態や加水分解の状態を擬似する ATP アナログ (Howard, 2001, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*) や、1 分子観察研究にも用いられる蛍光性 ATP アナログ (Hiratsuka, 1983, *Biochim. Biophys. Acta*; Tokunaga et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*) が開発されてきた。

(4) 他にも、ユニークな ATP アナログとして、紫外光照射することで、保護基を遊離させて、ATP そのものに変化するケージド ATP (Kaplan et al., 1978, *Biochemistry*) が知られている。ただし、このケージド ATP について、保護基の遊離反応においては、可逆性を持っていない。

(5) モータータンパク質をナノアクチュエーターと見立てると、人為的に操作しやすいように、機能を可逆的にコントロールする技術開発はデバイス作製にとって有用なものといえる。

(6) 申請者は光照射によって可逆的構造変化を示すフォトクロミック分子・アゾベンゼンを組み込んだ新規な ATP アナログ “ATP-Azo”を開発し、線形モータータンパク質であるキネシンおよび、回転モータータンパク質である F₁ATPase の運動の可逆的な光制御に成功した (Kamei et al., 2012, *Chem. Commun.*; Sunamura et al., 2014, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*)

(7) 生命機能の制御に光を用いる研究が遺伝子工学的なアプローチ (オプトジェネティクス) (Arian et al., 2009, *Nature*; Wu et al., 2009, *Nature*) と有機合成化学的アプローチ、両面から盛んになってきている。有機合成化学的アプローチにおいては、とくにアゾベンゼンを用いた研究が良く見受けられるようになってきた (Beharry and Woolley, 2001, *Chem. Soc. Rev.*)。しかしながら、生命機能に重要な役割を果たす低分子ヌクレオチドにアゾベンゼンを利用した例はまだ少なかった。

2. 研究の目的

(1) 背景(6)で述べたように、フォトクロミック ATP アナログはモータータンパク質の運動を光でリモート制御する機能をもつため、生体分子を利用した、いわゆるナノバイオデバイスを開発する際の利点となりうる。それだけではなく、酵素の ATP 加水分解反応の解明に対して新たな知見をも提供できれば、その有用性はより高まることになる。

(2) キネシンは、他のリニアモータータンパク質であるミオシンやダイニンに比べて、扱いやすいタンパク質である。また、ダイニンや回転モータータンパク質である F₁ATPase は ATP の加水分解サイトが 3 つあるため、運動機構が複雑である。そのため、これまでに申請者が主に取り扱ってきたキネシンを研究試料とした。

(3) そこで本研究では、次の 2 点、すなわち、(I)ヌクレオチドを保持する、あるいは、保持しないという 2 つの状態を光で誘起することによって、キネシンの運動機能を制御する方法を新たに確立するとともに、(II)キネシンの ATP 加水分解機構において、未解明であるヌクレオチドの放出過程を明らかにすることに寄与できる新規なフォトクロミックヌクレオチドアナログを開発することを目的とした。

(4) なお、本研究で開発予定のフォトクロミックヌクレオチドは、共有結合でモータータンパク質内に組み込むため (Sutoh et al., 1986, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci., Nature*) in situ でヌクレオチドの構造変化を引き起こし、それに対応するキネシンの構造変化を可逆的に誘起することも、特徴的な目的となっている。

3. 研究の方法

(1) 開発目的とするフォトクロミックな性質を有するヌクレオチドアナログの分子設計を行う。新規に合成するフォトクロミックアナログ分子の設計指針としては、タンパク質に共有結合する部位、光応答 (光照射によって可逆的に構造変化する) 部位、ヌクレオチド部位の 3 部位から構成されるようにした。なお、当初においては、タンパク質に共有結合させる部位にはアジド基を用い、光応答させる部位にはアゾベンゼン誘導体を用いることにする。ヌクレオチド部位に関しては、Adenosin-5'-diphosphate や、Adenylyl-imidodiphosphate を予定しており、共有結合ユニットと光応答ユニットのキメラ化合物を合成した後、ヌクレオチド部位とのカップリング反応により合成を進める。

(2)(1)で設計した分子の合成を行い、各種分光測定装置などで、帰属し、物理化学的性質を明らかにする。

(3)新規なフォトクロミックアナログ化合物を用いて、モータータンパク質の運動特性を評価する。モータータンパク質としては、リコンビナントヒトキネシンを大腸菌にて発現させ、His-tagを用いて精製する。また、蛍光微小管作製に必要な tubulin は、豚脳から、高濃度 PIPES バッファーを用いた、2 サイクル重合、脱重合法(Castoldi and Popov, 2003, *Protein Expression Purif.*) によって精製した。

(4)キネシン - 微小管系の運動特性の評価には、アナログ化合物を結合させたキネシンをガラス基板上に吸着させ、レールタンパク質である微小管(蛍光分子で標識)の運動を観察するモータリティーアッセイ法を用いる。

(5)(4)で適用するモータリティーアッセイ法においては、キネシン - 微小管運動系が再構築されたチャンバーに対して、紫外光や可視光を適宜照射し、アナログ分子における光応答部位の構造を変化させながら、顕微鏡下で蛍光微小管の運動を観察し、その特性(速度など)を測定する。

(5)また、同様の光照射条件下において、キネシンの ATP 加水分解活性や微小管との沈降アッセイなどの生化学的測定も行う。研究の進行が良い場合には、フォトクロミックヌクレオチドと結合させたキネシンの結晶化も試みる。

4. 研究成果

(1)方法(1)の設計指針にかなう目的化合物の合成を試みた。まず、タンパク質に共有結合するユニットと光応答性ユニットからなるキメラ化合物の合成から始めた。これら各ユニットのカップリング反応を進め、いくつかの誘導体候補を得ることに成功した(NMR によって帰属)。なお、共有結合ユニットにおいては、当初はアジド基を有する分子を用いた。

(2)(1)のキメラ化合物とヌクレオチドのカップリング反応を行ったが、目的とするフォトクロミックヌクレオチドアナログを得ることはできなかった(質量分析装置において目的ピークが得られなかった)。

(3)上述したキメラ化合物において、合成反応が多段階ステップになり、最終的な収量が極めて低く、また、精製する際、非常に手間がかかることから、新たな分子の設計を行った。

(4)新たなアナログ分子の候補においては、キネシンへの共有結合にアジド基ではなくマレイミド基を用いることとした。この共有結合ユニットと光応答ユニットをもつキメラ化合物を2種類設計して、現在合成を進めている。

(5)今後の予定としては、(4)で得られたキメラ化合物とヌクレオチドのカップリング条件を検討し、最終目的化合物の合成を進めていく。また、得られたフォトクロミックヌクレオチドアナログを用いるためには、キネシン側にも遺伝子改変する必要がある。加水分解活性を保持できるような変異サイトを検討し、アナログ分子におけるマレイミド基を導入できるキネシンを設計する。そのために、新たに連携可能な研究者に協力を仰ぎ、タンパク質側からの実験を進める予定である。

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1件)

深港豪, 亀井敬, 玉置信之
生体分子機械のスマートコントロール：アゾベンゼンの光異性化によるモータータンパク質機能の光制御
光化学(査読なし)
2014年、vol 45(2)、80-83

[学会発表](計2件)

亀井敬, Kumar K. R. Sunil, Perur Nishad, 深港豪, 玉置信之
Smart control of cooperative motility systems, kinesin-microtubule-photochromic molecules, by light
The 15th Ries-Hokudai International Symposium
2014年12月16 - 17日
ガトーキングダム(札幌)
招待講演

亀井敬
Smart Control of Biomolecular Machines by Light
The 9th Japanese-French Frontiers of Science (JFFoS) Symposium
2015年1月22 - 26日
ブライトンホテル(京都)
招待講演

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井敬 (KAMEI Takashi)

北海道大学・電子科学研究所・助教（申請時）
北陸大学・薬学部・講師（2015年5月1日異動）
研究者番号：90450650