

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18H02042
 研究課題名(和文) 光異性化反応によるモータータンパク質の駆動の試み

 研究課題名(英文) Driving motor proteins by photoisomerization reactions

 研究代表者
 玉置 信之 (TAMAOKI, NOBUYUKI)

 北海道大学・電子科学研究所・教授

 研究者番号：00344218
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパク質を駆動する光応答性高エネルギー化合物の構造-活性相関を明らかにし、キネシンとミオシンを識別して駆動する化合物を発見した。細胞周期の過程で染色体を配列させるモータータンパク質に対する光応答性阻害剤を合成し、細胞内で染色体の配列を光スイッチすることに成功した。ダイニンに対して働く光応答性阻害剤を合成し、クラミドモナスの鞭毛を使った運動を光制御することに成功した。さらにプロトンポンプのレチナルをアゾベンゼン誘導体に置き換えることに成功し、フォトサイクルや光誘起プロトン移動を確認した。また、タンパク質との対比として光エネルギーを連続的な仕事に変換する完全人工分子系の創成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キネシンとミオシンに対して選択的に活性を示す光応答性高エネルギー化合物を発見したことは、モータータンパク質がその種類による基質認識様式の違いを示唆し、モータータンパク質の運動の分子メカニズムに関する基礎研究における重要な知見となる。モータータンパク質CENP-Eやダイニンに対して働く光応答性阻害剤によってタンパク質の運動機能のみならず細胞周期や生物の運動を光制御できたことは、細胞の働きを望みの場所、望みのタイミングでスイッチしうることを意味するので、今後、副作用のない抗がん剤などへと応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：We clarified the structure-activity relationship of photoresponsive high-energy compounds that drive motor proteins, and discovered compounds that distinguish and drive kinesin and myosin. We have synthesized a photoresponsive inhibitor to a motor protein that arranges chromosomes in the process of the cell cycle, and succeeded in photoswitching the arrangement of chromosomes in the cell. We synthesized a photoresponsive inhibitor that acts on dynein and succeeded in photocontrolling the movement of Chlamydomonas using flagella. Furthermore, we succeeded in replacing the retinal of the proton pump with an azobenzene derivative, and confirmed the photocycle and photoinduced proton transfer. We also succeeded in creating a completely artificial molecular system that converts light energy into continuous work in contrast to proteins.

研究分野：機能分子化学

キーワード：アゾベンゼン モータータンパク質 光異性化反応 フォトクロミズム キネシン ミオシン ダイニン 微小管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界はモータータンパク質やプロトンポンプに見られるように、ATPの化学エネルギーや光のエネルギーを仕事やプロトン濃度勾配といった別の形のエネルギーに変える分子の仕組みを達成している。その分子機構に関しては、タンパク質分子を対象にしたX線結晶構造解析やフォトサイクルの分光学的研究によって大きく進展しているものの、ATPやレチナールといった基質分子の構造のうちどのような構造が機械特性に必須であるのかといった点に関してはまだ十分解明されていない。また、自然界の分子機械を材料として利用しようと思うと、人の手で運動機能を制御する仕組みが必要であった。

2. 研究の目的

モータータンパク質やプロトンポンプに対して基質もしくは阻害剤として働く光異性化分子を合成し、未だ人工の分子系では達成されていない、「光異性化反応を初期過程とする光エネルギーの仕事への連続的な変換」の達成を目指す。また、これら光応答性の基質や阻害剤によってより人為的に自然界の分子機械を制御する方法を提供する。

3. 研究の方法

本研究では、AzoTPの三リン酸部位を非加水分解性としたAzoTPアナログを合成し、そのトランス-シス光異性化反応の繰り返しによるAzoTPアナログの活性ポケットでの入れ替えで、モータータンパク質、キネシンやミオシンやダイニンが駆動されるかを調べる。

また、細胞内で染色体の運搬を担っているCENP-Eに対して働く光応答性阻害剤を合成し、タンパク質の運動だけでなく、細胞周期のようなよりマクロな事象を光制御できることを確かめる。

更に、完全人工分子機械としてキラル光分子スイッチと液晶の組み合わせにより、光エネルギーの仕事への連続変換の可能性を調べる。

。

4. 研究成果

(1) 光応答性高エネルギー化合物の分子構造とモータータンパク質キネシン、ミオシンに対する親和性の関係

AzoTPおよびその誘導体を合成し、キネシン-1-微小管およびミオシン-II-アクチンを用いたモーターリティアッセイ系で、活性および光応答性を調べた結果、2つのメチル基をベンゼン環に導入したジメチルAzoTPは、ミオシン-II-アクチンには高い活性を示すもののキネシン-1-微小管にはほとんど活性を示さないことがわかった。すなわち、ATPはすべてのモータータンパク質の良好な基質であるが、AzoTP誘導体の中には、一部のモータータンパク質にだけ働くものがあることがわかった。さらに、ガラス基板上にキネシン-1とミオシン-IIの両者を吸着させて、微小管とアクチンの運動を観察するコンポジット型モーターリティアッセイ系を構築して、アクチンの滑走のみが光可逆的に起こることを確認した。また、AzoTPまたはジメチルAzoTPの三リン酸部位を非加水分解性にした化合物を合成して、それらの化合物が、モータータンパク質に対してそれぞれ非選択的または選択的に働く光応答性阻害剤として機能することを確認した。すなわち、キネシン-1がミオシン-IIよりもより厳密に基質としての光応答性高エネルギー化合物を認識していることが明らかになった。

一方で、AzoTPの非加水分解性誘導体をキネシン-1-微小管またはミオシン-II-アク

チンまたはダイニン - 微小管を含むクラミドモナス脱膜モデルに添加して、光異性化反応によって上記モータータンパク質系が駆動できるかを調べた結果、いかなる条件(濃度や光照射波長や強度)においても光異性化反応のみによってモータータンパク質が駆動されることはなかった。

(2) モータータンパク質 CENP-E に対する光応答性阻害剤の合成と細胞分裂の光スイッチ

細胞分裂には、そのタイミングによっていくつかのモータータンパク質がその役割を担っているが、今回はいわゆる M 期において染色体の赤道面への運搬を司っているモータータンパク質 CENP-E の機能を可逆的に阻害する光応答性阻害剤の開発を目指した。

既報の CENP-E 阻害剤 (GSK923295) の分子構造から、図 1 に示す化合物 1 を分子設計し、合成した。

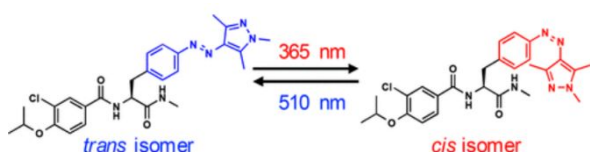


図 1 合成した光応答性CENP-E阻害剤 1 の分子構造とトランス シス光異性化反応

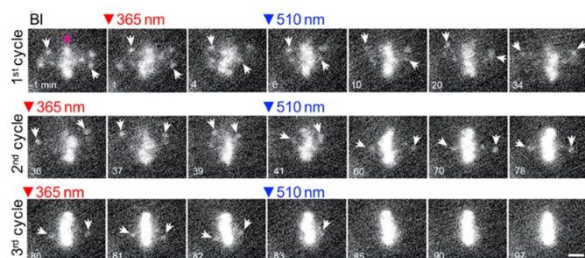


図 2 1をLLC-PK細胞に投与したときの光照射による染色体移動の方向のスイッチ。

1 の阻害効果は、紫外線照射後と可視光照射後では IC_{50} 値で約 10 倍の違いがあることがわかった。また、 $1 \mu\text{M}$ 程度においては、光照射条件でほぼ ON-OFF に近い割合で細胞死に導くことができることがわかった。図 2 には、1 を添加した細胞内で光の波長による染色体移動の方向のスイッチの様子を示す。紫外線照射によって阻害効果が消失し、本来の赤道面への移動が誘起され、可視光照射によって CENP-E による染色体の赤道面への移動が阻害されると同時に微小管の成長に伴う極方向への移動が起こっていることがわかる。

以上の結果より、化合物 1 が CENP-E の ATP の加水分解反応に対する酵素活性を阻害する阻害剤として働き、またその阻害活性が光照射の波長によって変化することを明らかにした。 $10 \mu\text{M}$ の濃度では、ATP 加水分解活性を約 70% 光でスイッチできることがわかった。また、本化合物の CENP-E の染色体移動の働きを光スイッチさせることで、HeLa 細胞の細胞死を誘起させる状態と誘起させない状態を取らせることがわかった。さらに、1 を添加した細胞の染色体移動をライブセルイメージングの手法で観察し、染色体移動の方向を望みのタイミングで光スイッチできることを示した。

(3) アゾベンゼン誘導体をクロモファーとするプロトンポンプ構築の試み

図 8 にアルデヒドを含有する 3 種類のアゾベンゼン誘導体の構造を示す。アゾベンゼン誘導体とオプシンとの複合体の水溶液の吸収スペクトルは、可視域に特徴的な吸収を示し、レチナルと同様にアゾベンゼン誘導体がクロモファーとしてタンパク質に結合していることがわかった。また、水溶液中でのレーザーフラッシュフォトリシス実験より、オプシンとアゾベンゼン誘導体の複合体は、アゾベンゼン誘導体単独に比べて非常に長寿命の中間体を経てもとの状態に戻ることがわかった。また、ITO 電極を用いた複合体膜の光誘起電位変化の実験より、光照射直後に膜と電極の間でプロトン移動を示唆するシグナルが観察された。一方で、複合体をベシクルまたは大腸菌の膜部分に埋め込んだ試料を使った膜の外側での pH 測定の結果、光照射によって pH 変化がないことがわかった。以上の結果より、プロテオオプシンまたはバクテリオオプシンと Az I または Az II の複合体は、光照射によって 3 種の長寿命中間体を経てもとに戻るフォトサイクルを示し、かつその光反応に伴ってプロトンを移動するものの、膜の内側と外側の間で一方向に連続的にプロトンを移動するプロトンポンプ特性は示さないことがわかった。プロトンポンプ機能にとって重要な役割を果たしているアミノ酸を置き換えた変異体を使った実験より、本来初期状態でプロトンをシッフベースに供給しているアスパラギン酸が光照射後にプロトンを供給する役割を担っていることなどが判明した。これらの結果をもとに、アゾベンゼン色素部が光照射後に細胞外側からプロトンを受けて、もとの方向(細胞外側)にそのままプロトンを戻す光反応のスキームを提案した。

(4) 人工分子系による光エネルギーの仕事への連続直接変換

光応答性キラリ添加剤と液晶性化合物の混合物をガラス基板上に薄膜状にコーティングすると、液晶のテクスチャーが紫外線または青色光の照射によって光定常状態に達するまで、それぞれ右回りまたは左回りに回転することがわかってきた (R. Thomas, et al., *Chem. Eur.J.*, 2012, 18, 12337)。今回、薄膜の厚みを 50 マイクロメートルと以前より厚くし、かつ青色光の強度を 30mW cm^{-2} とより高強度にしたところ、紫外線照射時にはフィンガープリント様の液晶テクスチャーが右回りで回転するのに対して、青色光照射時には、液晶テクスチャーの様子が大きく変化し、テクスチャーの回転が全く起こらないことがわかった。液晶薄膜の上に数百ミクロン程度のガラス薄片を乗せると紫外線照射時にはガラス薄片が右回りに回転するが、青色光照射時にはガラス薄片は動かなかった。すなわち、紫外線照射と青色光照射を交互に繰り返すと、ガラス薄片は右回りに回転し続けた。光応答性キラリ添加剤を S 体から R 体に変えると回転は左回りとなった。これらの結果を図 15 に示す。本現象は、光の波長をスイッチする必要があるものの、光エネルギーをマクロな物体の一方向への累積的な回転運動に変換していると言える。また、光応答性キラリ添加剤のキラリティーによって回転方向が決まることから分子レベルの機構で起こっていることがわかる。青色光照射時に発生するテクスチャーは、その形状等からフォーカルコニックテクスチャーと同定された。すなわち、光応答性添加剤の光異性化の方向がトランス シスであるか、シス トランスであるかによって、生じる液晶のテクスチャーがフィンガープリントテクスチャーからフォーカルコニックテクスチャーに変化するという新しい現象が起こっていることがわかった。それに伴って液晶薄膜上のガラス片の回転の可否が生じた。本研究により、アゾベンゼン誘導体のトランス - シス光異性化反応という行ったり来たりの反応を特定の液晶場で起こすことにより、一方向のマクロな回転運動に変換できることを示した。本作用は、ピストン運動を回転運動に変換するエンジンのクランクシャフトの作用と同

種的作用を分子レベルの機構で実現したと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mafy Noushaba Nusrat, Matsuo Kazuya, Hiruma Shota, Uehara Ryota, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Photoswitchable CENP-E Inhibitor Enabling the Dynamic Control of Chromosome Movement and Mitotic Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b12782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amrutha Ammathnadu S., Sunil Kumar K. R., Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Azobenzene Based Photoswitches Facilitating Reversible Regulation of Kinesin and Myosin Motor Systems for Nanotechnological Applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 337 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.201900037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Islam Md. Jahirul, Matsuo Kazuya, Menezes Halley M., Takahashi Masayuki, Nakagawa Hidehiko, Kakugo Akira, Sada Kazuki, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Substrate selectivity and its mechanistic insight of the photo-responsive non-nucleoside triphosphate for myosin and kinesin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 53 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB02714E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haque Shariful, Kikukawa Takashi, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Photoisomerization of azobenzene units drives the photochemical reaction cycles of proteorhodopsin and bacteriorhodopsin analogues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 6312 ~ 6327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0OB01486A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mafy Noushaba Nusrat, Kim Yuna, Thomas Reji, Akasaka Takehito, Tamaoki Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular Crankshaft Effect Converting Piston-like Molecular Motion to Continuous Rotation of Macro Objects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 15097 ~ 15102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.9b03706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 ISLAM, Md. Jahirul; MATSUO, Kazuya; MENEZES, Halley M.; TAMAOKI, Nobuyuki
2. 発表標題 Selective and reversible photoregulation of myosin motility in kinesin-myosin composite motility assay using myosin selective Azo-triphosphate
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noushaba Nusrat Mafy, Kazuya Matsuo, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 Dynamic Photocontrol of CENP-E and Chromosome Movements During Cell Division
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾和哉、Noushaba Nusrat Mafy・比留間 翔太・上原 亮太・玉置 信之
2. 発表標題 分裂期モータータンパク質CENP-Eを光制御する阻害剤の開発
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shariful Haque, Takashi Kikukawa, Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 Driving the photoreaction of proteorhodopsin by azo derivatives
3. 学会等名 第100回日本化学会春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 Precise photo-regulation of molecular motions
3. 学会等名 Telluride Conference on “Molecular Rotors, Motors, and Switches (招待講演) (国際学会)”
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 Optical manipulation of motor proteins using newly synthesized photochromic compounds
3. 学会等名 KJF International Conference on Organic Materials for Electronics and Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------