

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770140

研究課題名(和文)新規フォトクロミックATPアナログによるキネシンモーター機能の可逆的な光制御

研究課題名(英文)Reversible photo-regulation of the motor functions of kinesin by a novel photochromic ATP analog

研究代表者

亀井 敬 (Kamei, Takashi)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：90450650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題にて得られた主な成果は次の2点である。

(1) 光照射によって可逆的に大きく構造変化する分子・アゾベンゼンを組み込んだ新規なアデノシン3リン酸(ATP)の疑似物質、ATP-Azoを合成した。また、このATP-Azoの水溶液中での光応答性を確認した。

(2) ATPをエネルギー源として駆動する生体分子モーター・キネシンに対して、ATP-Azo存在下、かつ、光照射時において、その運動特性について調べた。その結果、異なる波長の光照射を用いた、キネシンの運動の可逆的な光変調を実現した。

研究成果の概要(英文)：We obtained the following two main results in this research.

(1) We synthesized novel adenosine triphosphate (ATP) analogs, ATP-Azos, which were chimeric molecules of ATP and azobenzene compounds exhibiting a reversible and large conformational change by photo-irradiations. In aqueous solutions, photo-responsive properties of the ATP-Azos were revealed with spectroscopic methods.

(2) In the presence of an ATP-Azo, we assessed the motile properties of kinesin, a bio-molecular motor, which derives the mechanical energy from ATP hydrolysis, with or without photo-irradiations. Consequently, we realized reversible photo-modulation of motility of kinesin by irradiations.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：モータータンパク質 ATPアナログ フォトクロミック分子

1. 研究開始当初の背景

(1) アデノシン3リン酸(ATP)は生命活動に必須のエネルギー供与分子であり、生体内で様々なタンパク質(ATPase)と相互作用する。そこで、ATPaseの機能やそのメカニズムを解明するため、種々のATPアナログが開発されている。

(2) 特に、Caged-ATP(Kaplan et al., 1978. *Biochemistry*)は、蛍光アナログのような観察手段としてではなく、ATPaseの機能を光照射によって制御するというユニークな特徴をもつ。この作用機序は光照射後に保護基から遊離されたATPが、標的ATPaseと作用するというものであるが、光照射直後の反応開始制御にのみ有効で、可逆性のないことが大きな欠点ともいえる。

(3) 研究計画当初において、アゾベンゼンの光異性化を利用してタンパク質の機能を制御する研究が見られるようになっていた(Banghart et al., 2004. *Nat. Neurosci.*; Yamada et al., 2007, *J. Biochem.*; Zhang et al., 2010, *Angew. Chem. Int. Ed.*; Hoppmann et al., 2011. *Angew. Chem. Int. Ed.*)。これらの研究におけるアゾベンゼンの利用法の特徴は、アゾベンゼン誘導体と目的タンパク質やペプチドを共有結合させたハイブリッド分子自体の機能を光制御する点にある。申請者は発想を逆転させ、上述したようなハイブリッド化タンパク質ではなく、低分子リガンドとして新規なフォトクロミック基質を創製し、非共有結合を介した基質-タンパク質間の相互作用を光制御する系を新たに確立したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Caged-ATPを超える、あるいは、それとは異なる利用を可能とするような、可逆的にATPaseの機能を光制御できる新規な光応答性ATPアナログを創製することである。

(2) さらに、これらのアナログを用いて、ATP加水分解エネルギーを運動エネルギーに変換するモータータンパク質・キネシンの運動活性の可逆的な光制御を実現する。

(3) タンパク質に手を加えることなく、さらにフォトクロミック基質を用いて、タンパク質-基質相互作用を光で変調させることは、酵素反応の制御が刺激とタンパク分子どちらも非侵襲的である。この点について、独創性、新規性を持った研究を行う。

3. 研究の方法

(1) まず、目的のアナログ分子の合成については、以下のような設計指針で研究を進めた。ATPの構成単位であるリボースや塩基部位などに、光照射によって大きく構造変化する

アゾベンゼン誘導体を結合させたATPアナログ、ATP-Azoの合成法を検討、確立する。その際、リボース部位を修飾したアナログの合成法を優先する。

(2) 次に、合成したATP-Azoの基礎的な物理化学特性や光応答特性をUV・可視分光器やNMRなどの分光学的手法によって調べる。

(3) キネシンの運動特性の評価には、キネシンを吸着させたガラス基板上でレールタンパク質である微小管の運動を観察する、キネシン-微小管系のインビトロモーターリテーアッセイ法を用いる。具体的には、ATP-Azo存在下でその異性化を誘導する波長をもつ光を照射し、運動特性(速度や結合様式)の変調の有無やその条件を蛍光顕微鏡下で観察・検討し、キネシンの運動活性の光制御法を確立する。

4. 研究成果

(1) ATPにおいて、リボースの特定部位(2'位)のみにアゾベンゼン誘導体を組み込む合成法を確立し、新規フォトクロミックATPアナログ、ATP-Azoを得ることに成功した。この分子の帰属は、NMRや質量分析装置によって行った。

(2) ATP-Azoの水溶液中における異性化反応(紫外光照射によるトランス-シス反応と可視光照射によるシス-トランス戻り反応)(図1. 上段)を紫外可視分光測定によって確認した。

(3) ATP-Azo存在下のインビトロモーターリテーアッセイ法によって、ATPを添加しなくても蛍光ラベル微小管が滑走することを確認した。これによって、ATP-Azoもキネシンに対してエネルギー源になることが示された。微小管滑走における最大速度(キネシンの滑走速度)はATPの半分ぐらいであることが明らかになった。

(4) ATP-Azo存在下において、光照射によるキネシン/微小管系の運動特性への影響を評価した。ATP-Azo<1 mM条件で、紫外光照射時(アゾベンゼン部位のシス体リッチ状態)には無照射時(トランス体)よりも微小管の滑走速度が上がった。それに続いて、可視光照射(トランス体リッチ状態)によって、滑走速度がほぼ元の速度に下がった(図1. 中段)。速度変化は最大で30%程度であった。また、ATP-Azo=1 mM条件では、無照射時に微小管が浮遊してガラス基板上に結合せず、紫外光照射時に滑走することが観察された。さらに、可視光照射によって微小管が再び浮遊した。この結果は、光照射によるキネシン/微小管系の結合・解離の制御の実現を示すものである(図1. 下段)。

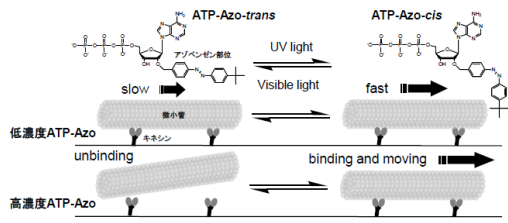


図1 光応答性ATPアナログ(ATP-Azo)によるモータータンパク質・キネシンの運動の可逆的光制御。ATP-AzoにUV、可視光を照射することで、アゾベンゼン部位をそれぞれcis, trans形に誘導できる(図上段)。低濃度ATP-Azo条件下では、光照射によってキネシン上の微小管の滑走速度を(図中段)、高濃度条件下では、キネシンと微小管の結合・解離を光可逆的に制御できることを示した(図下段)。

(5) (4)の結果から当初の目的であった、新規なフォトクロミック ATP アナログによるキネシンのモーター機能を可逆的に光制御することを実現した。

(6) 本研究で開発された ATP-Azo は、従来にはない、全く新しいタイプの ATP アナログであり、ATP 関連タンパク質を扱う生命科学研究者にとって非常に興味深いツールになるとと思われる。

(7) (6)に関連して、実際、発表直後に共同研究の申し出があり、東京工業大学・久堀研究室での研究対象である F₁-ATPase において、その回転運動の光制御に取り組み、短期間で実現し、論文発表した(図2:本図は掲載論文 *BBRC* のアブストラクト図であり、本報告書の主な発表論文1に掲載したものである)。

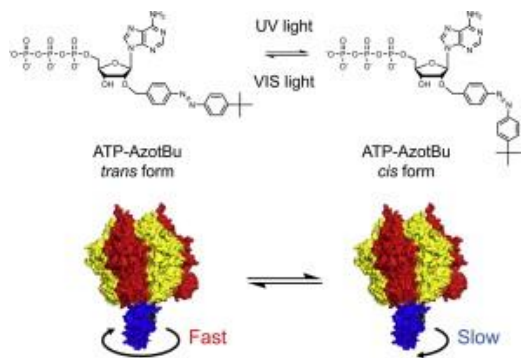


図2

(8) 日本だけでなく、海外の研究室からも引き合いがあった。

(9) 今後の展開については、以下に述べる点を想定している。まず、ATPase 一般について光制御を実現させるとともに、そのメカニズムを解明することは、重要なテーマとして挙げられる。また、より高度な光制御を目指した分子設計なども興味深いテーマとなるだろう。

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砂村 栄一郎、亀井 敬、紺野 宏記、玉

置 信之、久堀 徹、Reversible control of F₁-ATPase rotational motion using a photochromic ATP analog at the single molecule level、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有り、vol 446、2014年、358-363

②Nishad Perur、矢原 真郎、亀井 敬、玉置 信之、A non-nucleoside triphosphate for powering kinesin-microtubule motility with photo-tunable velocity、*Chem. Commun.*、査読有り、vol 49、2013年、9935-9937

③亀井 敬、深港 豪、玉置 信之、A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversible light-controlled motility: controlling velocity and binding manner of a kinesin-microtubule system in an in vitro motility assay、*Chem. Commun.*、査読有り、vol 48、2012年、7625-7627

[学会発表] (計 9 件)

①砂村 栄一郎、亀井 敬、紺野 宏記、玉置 信之、久堀 徹、光応答性 ATP アナログによる F₁-ATPase の活性と回転の制御、第39回日本生体エネルギー研究会討論会、2013年12月18日~20日、静岡県コンベンションセンター

②亀井 敬、玉置 信之、砂村 栄一郎、久堀 徹、フォトクロミック ATP アナログによる線形/回転モーターの運動の光制御、第1回アライアンス若手研究交流会、2013年11月25日~26日、東北大学

③亀井 敬、砂村 栄一郎、久堀 徹、玉置 信之、Driving motor proteins with reversible photo-controlled motilities by a photochromic ATP analogue、The 7th International Symposium on Photochromism、2013年9月23日~26日、ドイツ、フンボルト大学

④亀井 敬、Nishad Perur、Kumar Sunil、深港 豪、玉置 信之、フォトクロミック化合物を用いたキネシン-微小管系の運動の可逆的光制御、第3回分子モーター討論会、2013年7月19日~20日、東京大学

⑤亀井 敬、深港 豪、玉置 信之、Photo-control of Motility of a Kinesin/Microtubule System by Photochromic ATP analogues、電子科学研究所国際シンポジウム「律」、2012年12月13日~12月14日、北海道大学

⑥亀井 敬、深港 豪、玉置 信之、A Photochromic ATP Analogue Driving a Motor Protein with Reversibly Light-Controlled Motility、7th edition of the Phenics International Symposium、2012年11月28日~12月1日、フランス・ナント大学

⑦亀井 敬、新規光応答性 ATP アナログによるモーター蛋白質の運動の可逆的光制御、文部科学省「物質・デバイス領域共同研究拠点」

第2回複雑系数理とその応用に関するシンポジウム、2012年11月13日、北海道大学

⑧亀井 敬、深港 豪、玉置 信之、新規なフォトクロミックATPアナログによるキネシン/微小管系の駆動と光可逆的な運動制御、日本生物物理学会年会、2012年9月22日～9月24日、名古屋大学東山キャンパス

⑨亀井 敬、深港 豪、玉置 信之、光応答性ATPアナログによる生体分子モーター機能の光制御、日本化学会生体機能関連化学部会若手フォーラム、2012年9月5日、北海道大学

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
研究者番号：90450650