

研究終了報告書

「タンパク質内包を基盤とした微小管の光制御による細胞操作」

研究期間: 2020 年 11 月～2023 年 3 月

研究者: 稲葉 央

加速フェーズ期間: 2023 年 4 月～2024 年 3 月

1. 研究のねらい

細胞骨格は細胞の形状・強度・運動・物質輸送・分裂などの生命の根幹に重要な役割を果たす細胞小器官であり、中でも微小管は唯一中空の細胞骨格である。微小管は構造・機能の多様性を有することで、細胞内で様々な役割を発揮している。これまで微小管の多様性は外部表面へのタンパク質の結合や翻訳後修飾によって制御されていると考えられてきた。しかし、クライオ電子顕微鏡の発達により微小管の構造解析が世界的に進められた結果、繊毛・鞭毛中のダブル微小管や、神経軸索内の微小管などの内部には様々な形状のタンパク質が結合していることが明らかとなった。特殊な条件では細胞中の微小管内部に別の細胞骨格であるアクチンが結合するという興味深い報告もなされている。微小管外部はモータータンパク質などの活動の場であるため、これらタンパク質は内部に結合することで微小管の構造や機能を制御している可能性がある。しかし、その重要性に関わらず、内部へのタンパク質の結合が微小管に与える影響は不明な点が多く、細胞への影響も未解明である。それは、微小管内部に積極的にタンパク質を導入する方法が存在しなかったためである。

研究代表者は、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP, CGGGKKHVPGGGSVQIVYK PVDL) を独自に開発し、TP を連結することでタンパク質や金属ナノ粒子などを内包した微小管の構築に成功している。これらナノ構造体が内壁に結合することで微小管の安定性や物性が大きく向上することを実証しており、天然と同様に、ナノ構造体の内包が微小管の構造、機能を改変する有用なアプローチであることを示してきた。そこで本研究では、TP を用いて人工的に微小管内部にペプチドおよびタンパク質を導入し、その微小管内壁への結合を光刺激によって制御することで、細胞の構造や機能を理解、操作する新技術の開拓を目指した。本研究は化学的手法を用いてペプチドおよびタンパク質の微小管への結合を制御し、生命の基本単位である細胞の活動を理解し操るものである。これまで未知であった微小管内部のタンパク質の役割の解明という学術的な意義に加え、適切な場所、タイミングで微小管のダイナミクスを光制御することが可能となり、微小管が関連する様々な疾患の理解、克服のための革新的な基盤技術となる。

加速フェーズでは、これまで確立してきた TP を用いた微小管制御技術をさらに発展させることを目指した。本研究を通じ、*in vitro*における微小管の構造や性質の理解・制御に関する知見が深まり、生命を理解するための一つの手法となるといえる。これまで微小管制御技術は主に小分子を用いて行われており、ペプチド/タンパク質を用いた本手法は微小管の理解・制御における新たな基盤技術となる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、TP 融合ペプチドまたはタンパク質による微小管構造の光制御と細胞応用を目指す



し、下記の 3 テーマを遂行した(図 1)。

研究テーマ 1:「TP 融合四量体タンパク質による微小管超構造体の形成」(論文 1)

四量体タンパク質である Azami-Green (AG) に TP を連結した TP-AG を構築し、微小管への内包による構造変化を試みた。当初は光によって単量体と四量体が切り替わるタンパク質のモデルとして TP-AG を用いたが、TP-AG が微小管に結合することで、様々な微小管からなる超構造体を形成することを発見した。

研究テーマ 2:「TP の光アフィニティラベルによる微小管の光安定化」(論文 2)

光刺激によって共有結合を

形成する光アフィニティラベル化剤であるジアジリンを TP の末端に導入することで、UV 光照射によって微小管と共有結合を形成させ、その構造を安定化することに成功した。この系を HepG2 細胞に適用することで、UV 光照射により細胞死を誘導することに成功した。

研究テーマ 3:「スピロピラン修飾 TP による微小管構造の可逆的な光制御」(論文 3)

光刺激によって可逆的に構造が切り替わるスピロピラン/メロシアンを TP に修飾することで、微小管構造を光可逆的に制御することに成功した。スピロピラン/メロシアンの修飾位置を検討した結果、スピロピラン体でのみ微小管構造を安定化することが可能となり、光の波長を切り替えることで可逆的に微小管の形成/解離を制御することに成功した。将来的に細胞に適用することで、細胞内微小管の光可逆的制御が期待できる。

共同研究

市川宗厳助教(当時奈良先端科学技術大学院大学、JST さきがけ兼任)と共同研究を開始し、論文 1 の重要なデータである電子顕微鏡像が得られた。現在も共同研究を続けている。

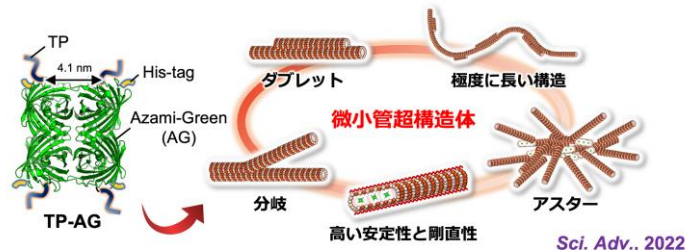
加速フェーズ

加速フェーズでは、これまで得られた知見をもとに下記のテーマを遂行した。

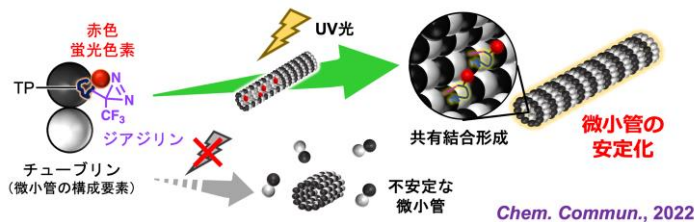
研究テーマ 4:「TP 融合光応答性タンパク質による微小管構造の光制御」

光刺激によりモノマーとテトラマーが切り替わる Dronpa に TP を連結した TP-Dronpa を構築し、微小管外部に結合させることで微小管の集合構造の光制御を行なった。モノマー状態で微小管に結合した際は微小管が分散しており、テトラマー状態では微小管同士を架橋してバンドル構造

テーマ1:「TP融合四量体タンパク質による微小管超構造体の形成」



テーマ2:「TPの光アフィニティラベルによる微小管の光安定化」



テーマ3:「スピロピラン修飾TPによる微小管構造の可逆的な光制御」

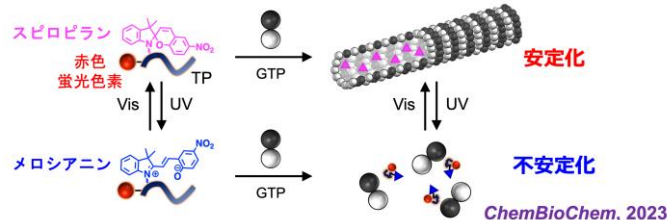


図 1. 本研究のテーマ概要

を形成した。これらの構造は光刺激により可逆的に変化可能であった。

(2) 詳細

研究テーマ 1:「TP 融合四量体タンパク質による微小管超構造体の形成」(論文 1)

通常微小管は一巻きのシングレット構造を形成するが、生体内では微小管が横方向に連なったダブルレットや、分岐、アスター(放射状集合)などの複雑な超構造体が存在し、異なる機能を発揮している。これら微小管超構造体を人工的に構築できればその理解と応用に繋がるものの、外来分子による構築例はなかった。本研究では、四量体を形成して蛍光を生じるタンパク質 Azami-Green (AG) の各サブユニットの C 末端に TP を連結した TP-AG を用いた微小管超構造体の構築を行なった。微小管外部に TP-AG が結合することで表面に TP が露出し、新たなチューブリンが結合、集積することで微小管超構造体の形成が期待できる。

TP-AG をチューブリンと複合化後に GTP アナログにより微小管を構築する方法(“Before” method)および微小管を構築した後に TP-AG を複合化する方法(“After” method)を用いたところ、“Before” method では TP-AG は微小管内部に、“After” method では微小管外部に主に結合することが共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) 観察により明らかとなった。微小管外部への結合は N 末端に導入した His-tag が関与していると考えられる。

微小管形成に伴う濁度上昇を見かけの吸光度として測定したところ、TP-AG 添加により濁度は急激に上昇し、微小管形成が促進されていることが明らかとなった(図 2a)。濁度上昇は微小管を安定化する抗がん剤である Taxol よりも著しく、TP-AG により微小管が強く安定化されたことが示唆された。また、TP を持たない AG や変異導入により AG を単量体化した mAG に TP を融合した TP-mAG では濁度上昇が見られず、AG の四量体構造に TP を融合することが微小管形成に重要であることがわかった。

TP-AG 複合化微小管を電子顕微鏡により解析したところ、ダブルレット構造や分岐構造などの多様な構造が観察された(図

2b)。特に“After” method でその割合が多いことから、微小管外部への TP-AG の結合が重要であるといえる。また、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) 観察により、分岐構造の成長過程を追跡することに成功した(図 2c)。TP-AG の当量などを変えることで、運動性を有するアスター構造(図 2d)や極めて長い微小管の形成が明らかとなり、一種類の外来タンパク質で多様な微小管超構造体を創製するこ

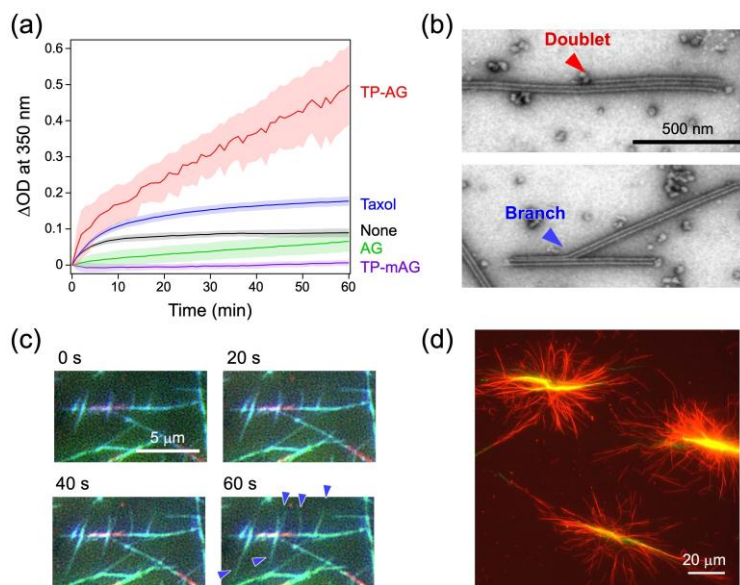


図 2. (a) 濁度測定による微小管安定性評価 (b) TP-AG 複合化微小管の電子顕微鏡像 (c) TIRFM 観察による分岐構造の成長 (d) アスター構造

とに世界ではじめて成功した。

研究テーマ 2:「TP の光アフィニティラベルによる微小管の光安定化」(論文 2)

光アフィニティラベル化剤の一種であるジアジリンは、UV 光照射によりカルベンを生じ、標的タンパク質と共有結合を形成する。ジアジリンを TP の N 末端のアミノ基に導入し、さらに TP の Cys に赤色蛍光色素である TMR を修飾した DA-TP-TMR を合成した。微小管内部に結合する Taxol との競合阻害実験により、DA-TP-TMR が微小管内部に結合すること、および UV 光 (365 nm) 照射により微小管と共有結合を形成することが明らかとなった。

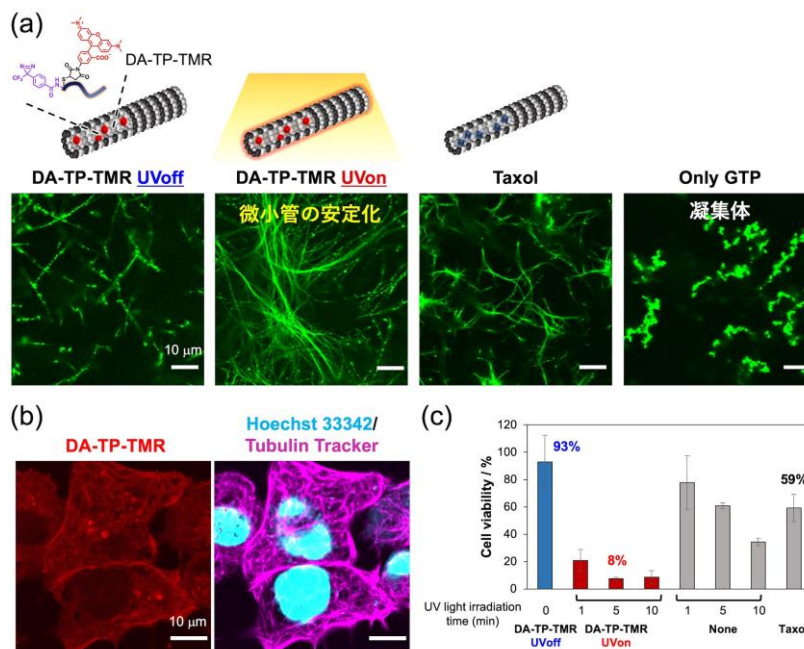


図 3. (a) DA-TP-TMR 内包微小管の CLSM 像 (b) DA-TP-TMR の HepG2 細胞への導入 (c) WST assay による細胞毒性評価

一般的に不安定とされる GTP で重合した微小管を CLSM で観察したところ、GTP のみを添加した際は凝集体が確認されたのに対し、DA-TP-TMR を添加した際は UV 光照射の有無に関わらず Taxol を用いた際と同様に微小管の形成が確認された(図 3a)。特に、UV 光照射時はより長く剛直な微小管が形成されることが明らかとなった。したがって、DA-TP-TMR の結合と UV 光照射による共有結合形成により、微小管の安定化に成功したといえる。

トランスフェクション試薬である ProteoCarry(フナコシ)を用いて DA-TP-TMR を HepG2 細胞に導入したところ、微小管染色剤である Tubulin Tracker との共局在が確認され、DA-TP-TMR が細胞内の微小管に結合することが明らかとなった(図 3b)。さらに、UV 光を 5 分間照射して 15 時間培養を行ったところ、細胞形態に異常が見られた。WST assay により細胞毒性を評価した結果、DA-TP-TMR のみでは細胞生存率に影響を与えないが、そこに UV 光を照射すると大きく細胞生存率が低下することが明らかとなった(図 3c)。その効果は UV 光を照射したときのみよりも大きいことから、DA-TP-TMR が細胞内の微小管に結合し、UV 光照射により共有結合を形成することで微小管構造が安定化されて細胞生存率が低下したと考えられる。このように、光刺激により微小管構造を安定化することに成功し、細胞に適用することで細胞死を光で誘導できることを明らかにした。

研究テーマ 3:「スピロピラン修飾 TP による微小管構造の可逆的な光制御」(論文 3)

スピロピラン(SP)/メロシアン(MC)は異なる波長の光刺激により可逆的に異性化し、構造お

よび極性が大きく変化するため、TP に組み込むことで光異性化によって微小管への結合能が変化し、その構造を可逆的に変化できると考えた。TP の異なる位置に Cys を導入した 4 種類のペプチドを合成し、その N 末端のアミノ基に TMR を導入した。各ペプチドの Cys とブロモアセチル化スピロピランとの反応により、SP を修飾したペプチド(1-SP~4-SP)を合成した(図 4a)。各ペプチドの UV-vis スペクトル測定により、UV 光(365 nm)照射による SP の MC への異性化および可視光(505 nm)照射による MC の SP への異性化を確認した。

光照射により SP 化したペプチド(1-SP~4-SP)および MC 化したペプチド(1-MC~4-MC)が全て微小管に結合することが CLSM により確認された。また、Taxol との競合阻害実験により、1-SP、1-MC、3-MC、4-SP、4-MC は微小

管内部に結合していることが明らかとなった。一方、2-SP、2-MC、3-SP は Taxol とは異なる位置で微小管に結合していることが示唆された。

一般的に不安定な微小管を形成する GTP を用いた微小管の構造への影響を評価した(図 4b)。1-SP、3-MC、4-MC を複合化させた場合は Taxol と同様に長く安定な微小管を形成することが明らかとなった。一方、1-MC、2-SP、2-MC では凝集体が多く見られ、3-SP、4-SP ではそれぞれ MC 体よりも短い微小管が形成された。2-SP および 2-MC は微小管内部に結合しないために安定化効果が見られなかったと考えられる。SP 体と MC 体で最も大きな変化が見られた 1-SP/1-MC を複合化することで、光刺激による可逆的な微小管の構造変化を試みた(図 4c)。1-SP を複合化することで安定化した微小管に UV 光を照射して 1-MC とすると微小管が解離し、その後可視光を照射し再度 1-SP とすると再び微小管が形成することが明らかとなった。したがって、光刺激により可逆的に微小管の構造を制御することに成功した。将来的に細胞内微小管の光可逆的制御による細胞操作が期待できる。

研究テーマ 4(加速フェーズ):「TP 融合光応答性タンパク質による微小管構造の光制御」

異なる波長の光照射によってモノマーとテトラマーが切り替わる Dronpa に TP を融合した TP-

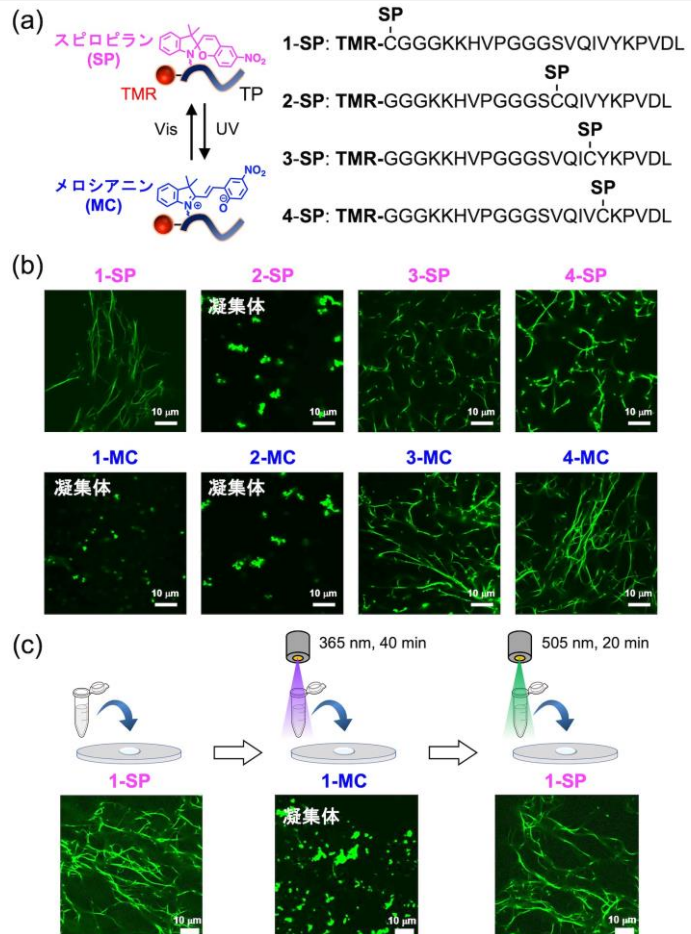


図 4. (a) スピロピラン修飾 TP (1-SP~4-SP) の設計 (b) 各ペプチドを複合化した微小管の CLSM 像 (c) 可逆的な微小管の構造変化

Dronpa を構築し、微小管外部に結合させることで微小管集合構造の光制御を行なった。TP-Dronpa がモノマー、テトラマーにおいて微小管に結合することを CLSM、SDS-PAGE により確認した。一方 TP を持たない Dronpa はほとんど微小管に結合しなかったことから、TP 部分が重要であることがわかった。TP-Dronpa がモノマー状態で微小管に結合した際は微小管が分散しており、テトラマー状態では微小管同士を架橋してバンドル構造を形成した。これら微小管の分散/バンドル構造は光照射により可逆的に切り替わることが示された。このように、微小管の集合構造を光刺激で制御することに成功した。

まとめ

研究テーマ 2, 3 より、研究開始当初とは違う設計ではあるが、光刺激により微小管構造を光で制御することに成功し、研究テーマ 2 に関しては細胞応用も達成した。また、研究テーマ 1 では微小管超構造体の形成を発見し、その詳細な解析を行なった。したがって、当初の計画を達成することに加え、新たな研究分野の開拓につながる成果が得られた。

加速フェーズにおいて、研究テーマ 4 では外部刺激による微小管の集合構造制御を達成した。これらの結果から、本研究の目的である「微小管の光制御による細胞操作」の礎を築いたといえる。

3. 今後の展開

これまでの研究で得られた知見をもとに、微小管構造の可逆的な光制御と細胞応用を試みる。また、上記研究テーマ 1 で得られた知見をもとに、微小管超構造体の作り分けを試みる。(加速フェーズ実施後追記)研究テーマ 4 に相当し、微小管バンドル構造の光制御に成功した。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

研究目的である「微小管構造の光制御と細胞操作への応用」について、上記研究テーマ 2 に示すように達成できた。また、研究テーマ 1 において、自身の設計したタンパク質によって微小管からなる超構造体が形成されることを発見し、その構築原理についての知見が得られた。したがって、領域のテーマの一つである「化学的手法を用いて生命現象を解明・制御・応用する」を達成できたといえ、「科学技術イノベーションにつながる新しい価値の創造」につながる成果が得られた。また、ACT-X 研究期間中に JST 創発的研究支援事業に採択されるなど、ACT-X の事業趣旨である研究者としての個の確立、ステップアップにつなげることができた。

(加速フェーズ実施後追記)微小管構造を制御する新規手法を構築したことから、加速フェーズでの研究を通じて微小管操作技術を一層深めることができた。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

鳥取大学工学部松浦研究室で研究を遂行した。各分野の専門家である角五彰准教授(北海道大学)、市川宗厳助教(当時奈良先端科学技術大学院大学)、岩崎崇准教授(鳥取大学)



などと共同研究を行った。また、領域アドバイザーから適切なアドバイスをいただくことで、定期的に研究方針を見直し、効率的に研究を実施した。研究費は予定通り適切に執行された。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究で得られた成果は、ペプチド・タンパク質を用いて微小管構造を制御する新手法であり、今後は *in vivo* への展開が期待される。また、外来分子によって微小管超構造体を構築することに世界ではじめて成功し、その礎を築いた。今後構築原理の詳細な解析、ナノ材料応用、細胞応用など様々な展開が考えられ、微小管研究の新領域になると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

研究期間累積件数: 10報(加速フェーズ実施後更新)

1. Hiroshi Inaba*, Yurina Sueki, Muneyoshi Ichikawa, Arif Md. Rashedul Kabir, Takashi Iwasaki, Hideki Shigematsu, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Tomoya Tsukazaki, Kazunori Matsuura* “Generation of stable microtubule superstructures by binding of peptide-fused tetrameric proteins to inside and outside” *Science Advances*, 2022, **8**, eabq3817 (**各機関でプレスリリース、日経 web、科学新聞などに掲載**)

微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドを四量体タンパク質 Azami-Green に融合した TP-AG を開発し、その微小管内部と外部への結合を制御することで、微小管の安定化および微小管からなる超構造体の構築に成功した。TP-AG が微小管内部に結合することでその構造が極度に安定化され、微小管外部に結合することでダブルットや分岐など多様な超構造体を形成することが明らかとなった。本研究は外来タンパク質を用いて微小管超構造体を構築したはじめての例となった。

2. Soei Watari, Hiroshi Inaba*, Tomonori Tamura, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Itaru Hamachi, Kazunori Matsuura* “Light-induced stabilization of microtubules by photo-crosslinking of a Tau-derived peptide” *Chemical Communications*, 2022, **58**, 9190–9193 (**Outside Front Cover**)

微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドに光アフィニティラベル化剤であるジアジリンを導入することで、光刺激によって微小管と共有結合を形成させ、微小管の構造を安定化することに成功した。このペプチドの複合化と光照射により、長く剛直で、運動速度が増大した微小管が形成されることが明らかとなった。このペプチドは HepG2 細胞中の微小管に結合することが明らかとなり、光照射により細胞死を誘導することに成功した。

3. Hiroshi Inaba*, Minamo Sakaguchi, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Kazunori Matsuura* “Reversible photocontrol of microtubule stability by spiropyran-conjugated Tau-derived peptides” *ChemBioChem*, 2023, **24**, e202200782 (**ChemBioTalents 2022/23**)

微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドに光異性化分子であるスピロピランを修飾することで、UV 光と可視光の照射の切り替えにより微小管の安定性を光可逆的に制御することに



成功した。スピロピラン修飾ペプチドは微小管構造を安定化するが、UV 光照射により異性化したメロシアン体では微小管安定化の効果はないことが明らかとなった。UV 光と可視光の照射を繰り返すことで、微小管の形成・解離を可逆的かつ繰り返し行うことに成功した。

4. Hiroshi Inaba*, K. Oikawa, K. Ishikawa, Y. Kodama, K. Matsuura, K. Numata* “Binding of Tau-derived peptide-fused GFP to plant microtubules in *Arabidopsis thaliana*” *PLoS ONE*, 2023, **18**, e0286421

これまで微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドを用いた微小管の構造・機能制御を *in vitro* で行ってきたが、*in vivo* における解析はなされていなかった。本研究では、Tau 由来ペプチドを融合した GFP を安定発現するモデル植物(シロイヌナズナ)を構築し、微小管への結合および植物への影響を評価した。TP 融合 GFP は植物の成長を阻害することなく植物内の微小管に結合することが明らかとなった。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・2022 NIKON JOICO AWARD 最優秀 JOICO 賞(2023 年 3 月)
- ・第 16 回 バイオ関連化学シンポジウム講演賞(2022 年 9 月)
- ・日本化学会進歩賞(2022 年 3 月)
- ・高分子研究奨励賞(2022 年 3 月)
- ・Polymer Journal 論文賞-日本ゼオン賞(2021 年 5 月)
- ・上記論文 1 に関する報道

プレスリリース

JST(<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20220908/index.html>)

鳥取大学(<https://www.tottori-u.ac.jp/item/19931.htm>)

奈良先端科学技術大学院大学(<https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2581>)

北海道大学(https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220908_pr.pdf)

記事掲載

日経 web(https://www.nikkei.com/article/DGXZRSP639788_Y2A900C2000000/)

科学新聞(9/16、4 面)

EV-tech.jp(<https://ev-tech.jp/headline/20220914.html>)

CEND.jp(<https://cend.jp/user/headline/20220926.html>)

日経クロステック(<https://xtech.nikkei.com/atcl/nxt/column/18/02122/00061/>)

- ・BCSJ 賞(2023 年 11 月) ※加速フェーズ実施の成果
- ・令和 5 年度 鳥取大学科学研究業績表彰(2024 年 2 月)

