

令和7年1月24日

ペプチド融合タンパク質により構築した微小管「超」構造体の光制御に初めて成功
～光刺激を用いた分子ロボットの操作などのナノ材料への応用に期待～

【ポイント】

- ・チューブ状細胞骨格である微小管^{*1}に結合するペプチドを融合した光応答性タンパク質を開発した。
- ・このタンパク質は異なる波長の光刺激により四量体と単量体が可逆的に切り替わり、これにより微小管の集積と解離を光によりコントロールした。
- ・このタンパク質により集積させた微小管は、束状の構造や微小管の側面で2つに連なったダブルレット構造、アスター（放射状）構造など、多様な超構造体が形成することが明らかとなった。
- ・微小管自体への化学修飾は必要とせず、微小管の分散状態と集積状態を光で制御できる技術となり、分子ロボットなどのナノ材料の開発や、細胞内微小管の集合構造制御による細胞操作など様々な応用が期待される。

【概要】

鳥取大学学術研究院工学系部門の稲葉央准教授、松浦和則教授、大学院生の渡宗英さんらの研究グループは、復旦大学生命科学学院の市川宗厳テニュアトラックプロフェッサーの研究グループ、京都大学大学院理学研究科の角五彰教授の研究グループらとの共同研究により、独自に開発したペプチドを融合した光応答性タンパク質を用いることで、細胞骨格の一種であるタンパク質ナノチューブ「微小管」の多様な超構造体を光刺激により制御することに成功しました（図1）。細胞内において微小管は束状になった構造、繊毛や鞭毛^{*2}中に見られるダブルレット型構造やアスター状構造など多様な超構造体を形成しています。しかし、これらの超構造体を人工的に構築し、外部刺激により形成・解離をコントロールすることは困難でした。本研究では、当研究グループが以前開発した微小管に結合する Tau 由来ペプチド（TP）^{*3}を光応答性四量体蛍光タンパク質 Dronpa^{*4}に連結することで、微小管外部への結合による微小管の束化、ダブルレット化などの超構造体の形成とその光制御を達成しました。本成果により、微小管からなる分子ロボットなどの精密な制御や、細胞内の微小管構造の人工的な制御によるさらなる細胞機能の理解につながる可能性があります。本成果は2025年1月23日（日本時間）にアメリカ化学会発行の学術誌「JACS Au」に掲載されました。

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費（JP23K04931、JP24H01721、研究代表者：稲葉央）、科学技術振興機構（JST）ACT-X（JPMJAX2012、研究代表者：稲葉央）、創発的研究支援事業（JPMJFR2034、研究代表者：稲葉央）、さきがけ（JPMJPR20E1、研究代表者：市川宗厳）などによる支援を受けて行われました。

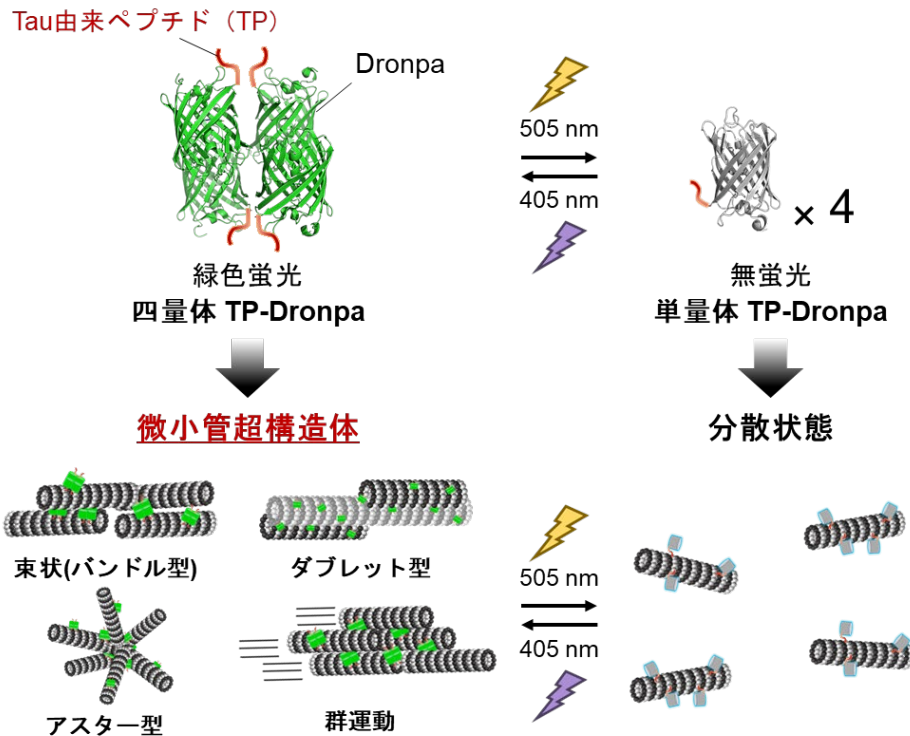


図 1. 本研究の概念図。TP を融合した Dronpa (TP-Dronpa) により微小管超構造体の形成・解離の光制御に成功した。

【研究背景】

細胞骨格の一種である微小管は、チューブリンタンパク質から構成される一般的に内径約 15 nm、長さ数 μm ～数十 μm のチューブ状集合体です(図 2a)。微小管は細胞内において細胞の形状制御などに関わっており、中でも神経細胞内では微小管が束状に集合することで、神経伝達経路の構築を行っています。また、繊毛や鞭毛では、シングレット微小管(A 小管)の外側にもう一層(B 小管)連結したダブレット微小管や、微小管形成中心^{*5} から微小管が伸びるアスター構造など、様々な超構造体が構築されそれぞれの役割を果たしています(図 2b)。一方で微小管とモータータンパク質を利用した分子ロボットやアクティブマターなどのナノ材料の開発が盛んに行われています。これらの微小管超構造体を人工的に構築し、さらにこれらの構造の形成・解離を制御できれば、新規ナノ材料としての応用や、細胞内微小管の人工的な制御による細胞操作が期待できます。以前、当研究グループは微小に結合する Tau 由来ペプチド(TP)に四量体蛍光タンパク質 Azami-Green を連結することで、人工的に様々な微小管超構造体を構築することに成功しました(Sci. Adv., 2022, 8, eabq3817)。そこで本研究では、より高度に微小管超構造体を操るため、TP を光応答性四量体タンパク質である Dronpa に連結することで、様々な微小管超構造体の形成・解離の光制御に成功しました(図 1)。

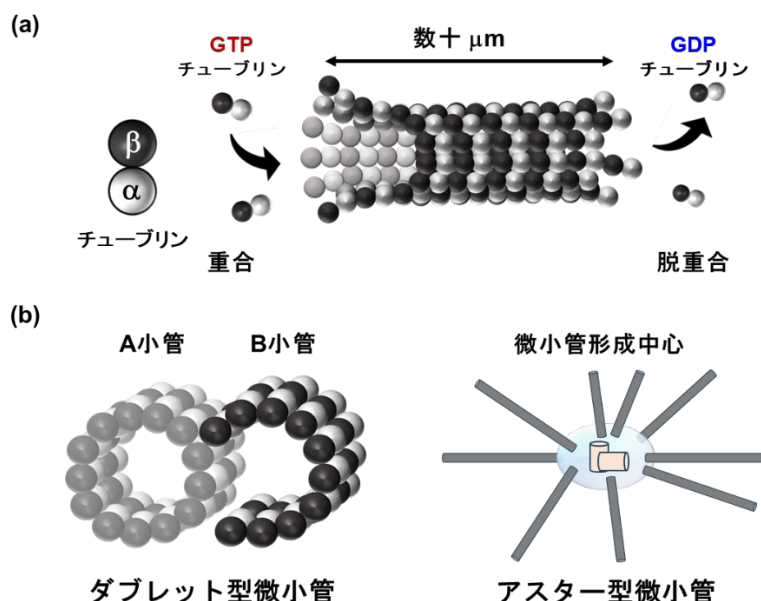


図 2. (a) 微小管の概略と模式図 (b) 天然に存在する微小管超構造体であるダブレット型微小管の構造。完全な環の A 小管と不完全な環の B 小管からなる。アスター型微小管は微小管形成中心から微小管が伸びて形成される。

【研究内容】

光応答性四量体蛍光タンパク質である Dronpa は通常四量体を形成し緑色蛍光を示しますが、500 nm 程度の光を照射することで単量体状態になり蛍光が消失します。一方で単量体状態の Dronpa に 400 nm 程度の光を照射すると四量体状態に戻り、この四量体と単量体の変化は光照射により可逆的に行うことが可能です。TP を Dronpa の C 末端に連結した TP-Dronpa を作製し、まず微小管のどこに結合するか評価しました。TP はチューブリンと複合化してから微小管を構築すると微小管内部に相当するチューブリンのポケットに、微小管を構築してから加えると微小管外部に結合することが明らかとなっています。微小管を構築してから TP-Dronpa を複合化することで、TP-Dronpa の微小管への結合が共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) により確認されました。一方で、Subtilisin という酵素により C 末端を切断したチューブリンを用いて微小管を作製し TP-Dronpa と混合すると、TP-Dronpa の微小管への結合は大きく減少しました。この結果から、TP-Dronpa は微小管外部に位置するチューブリンの C 末端領域に結合することが分かりました。

四量体状態の TP-Dronpa が結合した微小管をネガティブ染色電子顕微鏡⁶で観察したところ、通常は見られない複数の微小管が束状になった集合体 (バンドル) が観察されました (図 3)。また、一部はシングレット微小管の外側にもう一層連結したダブレット微小管が観察されました。一方で単量体状態の TP-Dronpa が結合した微小管は一本一本が分散した通常の状態の微小管が形成していることが分かりました。四量体の TP-Dronpa が微小管同士を架橋しバンドル状の微小管が形成し、また微小管外部に結合した TP-Dronpa の TP 部分に新たにチューブリンが結合し微小管が重合することでダブレット微小管が形成したと考えられます。また単量体の TP-Dronpa が結合した微小管は分散した構造であったことから、TP-Dronpa の四量体と単量体を光照射により制御することでこれら微小管超構造体の形成・解離をコントロールできる可能性が示唆されました。

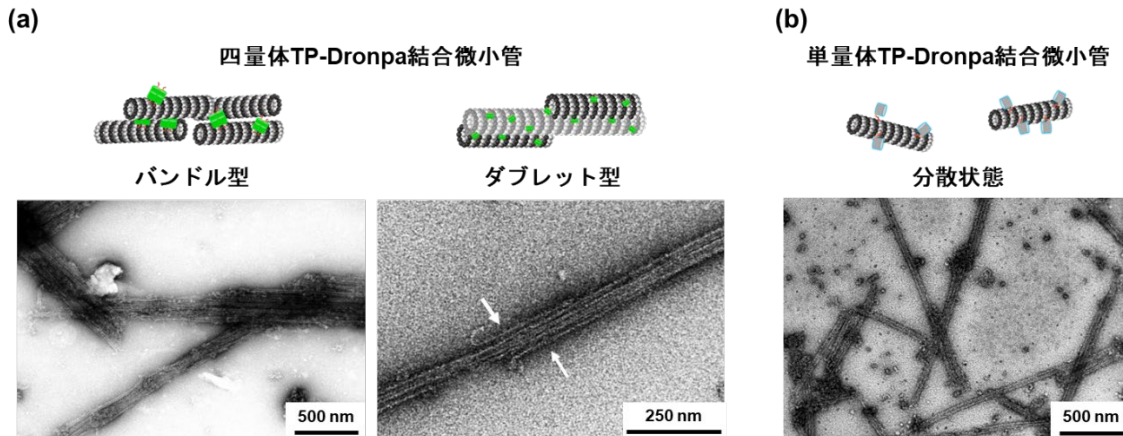


図 3. TP-Dronpa が結合した微小管のネガティブ染色電子顕微鏡像。(a) 四量体 TP-Dronpa が微小管に結合した場合には束状の微小管超構造体ができ、特に一部ではシングレット微小管の外側にもう一層連結したダブルレット微小管が観察された(右 白矢印)。(b) 一方で単量体の TP-Dronpa が結合した場合には通常と同様の微小管が形成していた。

続いて、微小管上を運動するモータータンパク質であるキネシンをガラス基板上にコーティングすることで、TP-Dronpa が結合した微小管の運動を観察しました。すると四量体の TP-Dronpa が結合した微小管はバンドル状からアスター状に変化し、分散するように運動しました(図 4)。これはキネシンの運動によりバンドル化した微小管が解離してアスター状に変化したと考えられます。一方で単量体の TP-Dronpa が結合した微小管は通常の微小管と同様に一本一本が個別に運動する様子が観察されました。

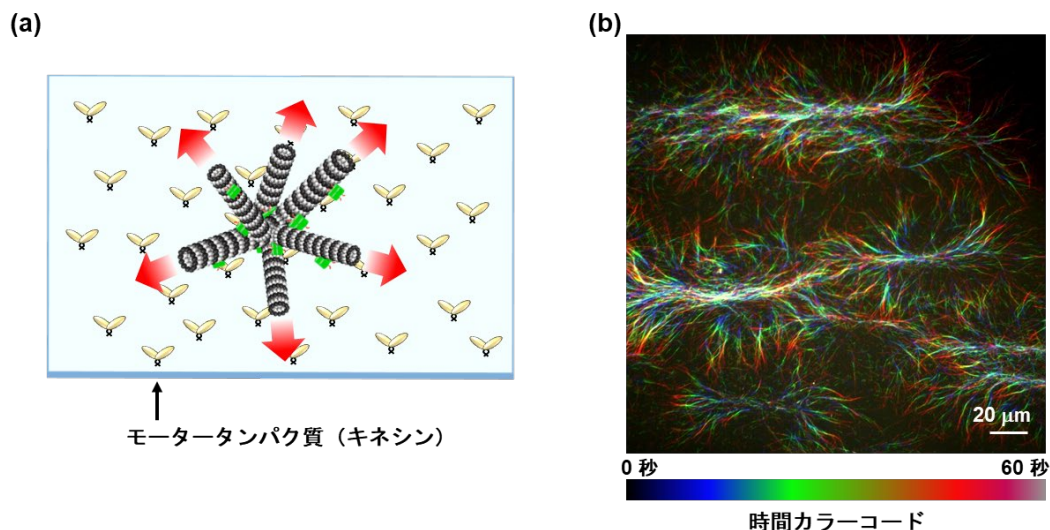


図 4. (a) TP-Dronpa が結合したアスター型微小管。(b) 蛍光顕微鏡にて撮影した動画を加工し、時間ごとに異なる色をつけて重ね合わせたもの。中心から外側に微小管が運動している様子が確認された。

加えて、光照射により微小管の集積・解離の制御を行いました。四量体の TP-Dronpa が結合した微小管に対して、505 nm の光を照射することで微小管に結合した TP-Dronpa を単量体に変えました。するとバンドル状に集積していた微小管は分散し、一本一本の微小管に解離することが分かりました(図 5a)。一方で、単量体の TP-Dronpa が結合した微小管に対して 405 nm の光を照射し、微小管に結合した TP-Dronpa を四量体に変えると、分散していた微小管は束状に集積することが分かりました(図 5b)。これらの結果から、光刺激により微小管に結合した TP-Dronpa の四量体と単量体を変えることで、微小管の集積・解離を変化できることが分かりました。

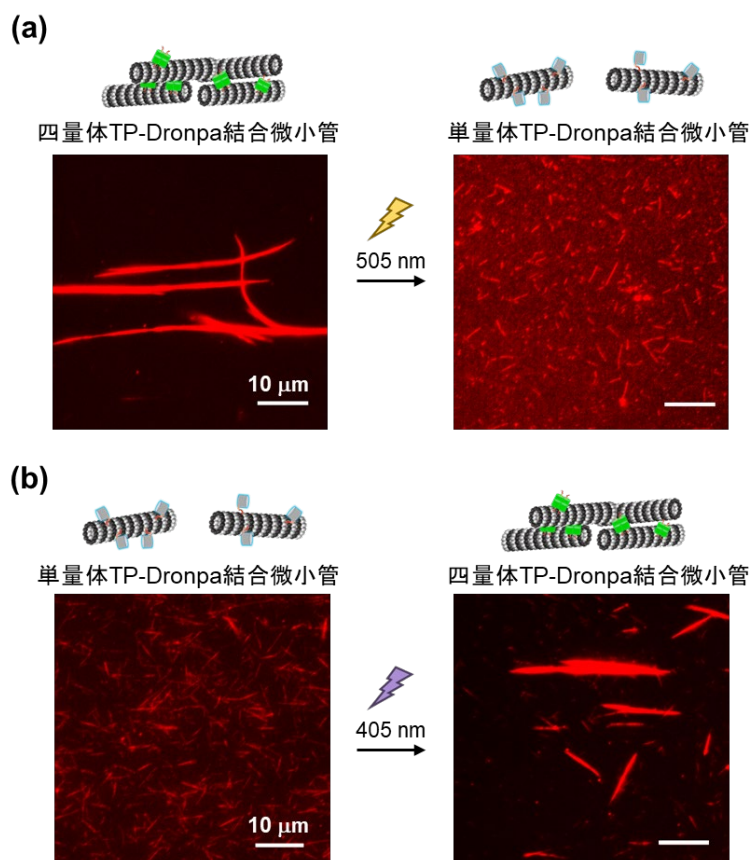


図 5. (a) 四量体の TP-Dronpa が結合した微小管に対して 505 nm の光を照射し単量体に変化させると、束状に集積していた微小管は一本一本に分散し解離した。(b) 単量体の TP-Dronpa が結合した微小管に対して 405 nm の光を照射し四量体に変化させると、分散していた微小管が束状に集積する様子が観察された。

最後に、光照射により運動する微小管の集合構造制御を行いました。単量体の TP-Dronpa が結合した微小管の運動途中に 405 nm の光を照射することで TP-Dronpa の四量体化を誘起しました。すると一本一本が分散した状態で運動していた微小管がバンドル状に集合し、集合した状態で群れをなして運動する様子が観察されました(図 6)。このように光応答性四量体タンパク質に Tau 由来ペプチドを連結することで、光刺激により微小管の集合構造を自在にコントロールできることが明らかになりました。

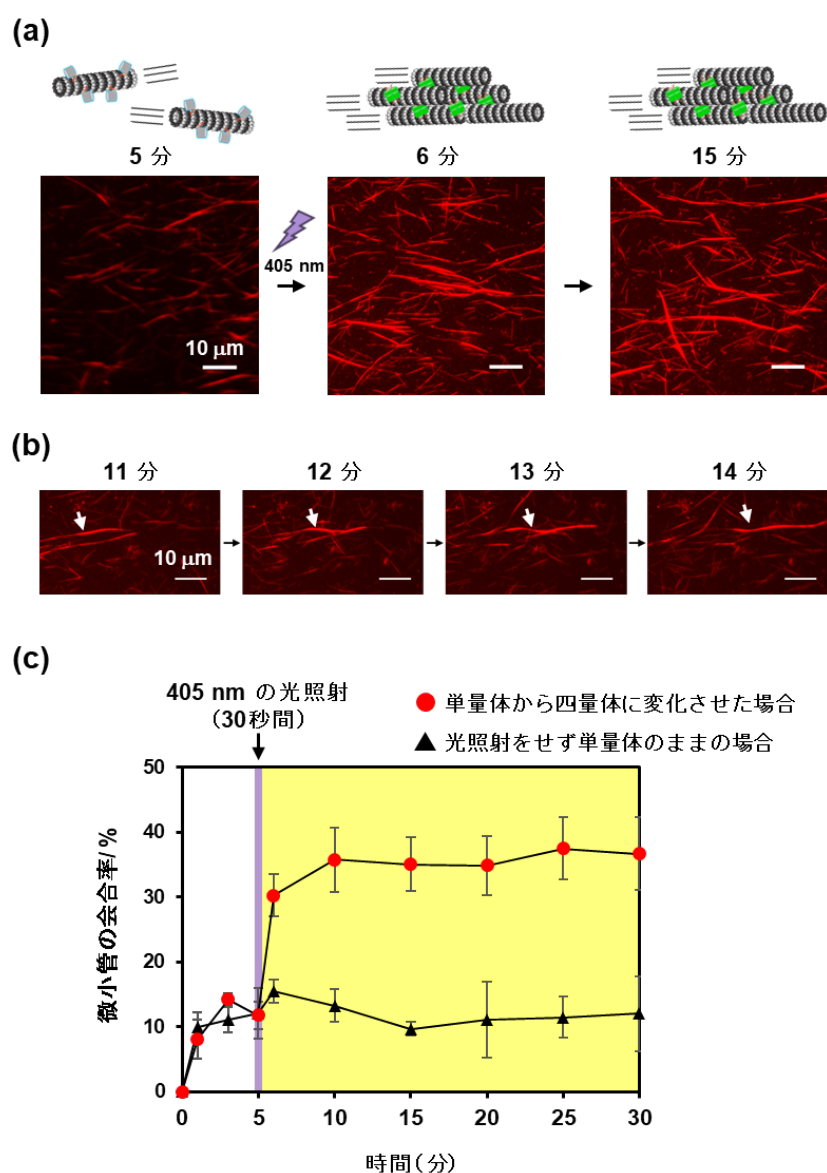


図 6. (a) 単量体の TP-Dronpa が結合した微小管を 5 分間運動させたのち、405nm の光を 30 秒間照射した。光照射後、徐々に微小管が集積していく様子が観察された。(b) 2 つの微小管が会合していく様子。(c) 微小管の会合率。405 nm の光を照射し単量体 TP-Dronpa を四量体に変化させた場合には、微小管の会合率が上昇している。

【今後の展開】

本研究は、微小管への修飾を必要とせずにその集合構造を光照射により制御した初めての例であり、分子ロボットなどのナノマテリアルの高度なコントロールが期待できます。また光照射により微小管超構造体を形成させることで、これまで未解明であった微小管超構造体の形成過程の追跡につながる可能性があります。さらに、TP-Dronpa を細胞内に導入することで、細胞内の微小管超構造体を人工的に制御できると期待できます。微小管超構造体は鞭毛や繊毛の形成、神経細胞における軸索形成など様々な細胞機能に重要な役割を担っているため、これらの形成メカニズムや物性の制御に大きく寄与

すると考えられます。

【用語解説】

*1 微小管

チューブリンタンパク質から構成される、一般的に内径約 15 nm、長さ数 μm ～数十 μm のチューブ状集合体。細胞の形態維持や変化、細胞分裂、軸索の形成、鞭毛や繊毛の運動などの多様な細胞機能に重要な役割を果たす。

*2 繊毛・鞭毛

真核生物の細胞から突出している微細な毛のような構造。波打ち運動をすることで、精子などの運動を可能とする。内部の中央に中心対微小管があり、周辺微小管(ダブルレットなどの多重微小管)がそれらを取り囲むように並んでいる。

*3 Tau 由来ペプチド(TP)

本研究グループによって開発された、微小管内部に結合するペプチド(CG G G K K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L)(Chem. Eur. J., 2018, 24, 14958)。微小管関連タンパク質の一種である Tau から設計され、チューブリンと複合化してから微小管を構築すると微小管内部に相当するチューブリンのポケットに、微小管を構築してから加えると微小管外部に結合する。

*4 Dronpa

アナキッカサングから単離・改変された蛍光タンパク質(A. Miyawaki et al., Science, 2004, 306, 1370; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2008, 105, 9227)。500 nm の光を当てると四量体が単量体に変化し蛍光が消え、400 nm の光を当てると再び四量体に戻り蛍光を発するフोटクロミックな性質を持つ。忍者のようにドロンと消えてパツと現れることからドロンパと名付けられた。TP-Dronpa は C 末端に TP を導入しており、四量体の TP-Dronpa は 4 つの TP を有する。

*5 微小管形成中心

動物細胞における細胞小器官の 1 つ。細胞内では微小管形成中心から微小管が伸長してアスター型構造を形成し、紡錘体形成などに関与する。

*6 ネガティブ染色電子顕微鏡

試料そのものではなく、その背景を染色して電子顕微鏡で観察する手法。染色剤としてタンパク質よりも強く電子線を散乱させる重金属溶液が用いられる。

【論文情報】

タイトル: Optical Control of Microtubule Accumulation and Dispersion by Tau-Derived Peptide-Fused Photoresponsive Protein

著者名: Soei Watari, Hiroshi Inaba,* Qianru H. Lv, Muneyoshi Ichikawa,* Takashi

Iwasaki, Bingxun Wang, Hisashi Tadakuma, Akira Kakugo, Kazunori Matsuura*

*共責任著者

掲載誌: JACS Au

DOI: 10.1021/jacsau.4c01017

【内容に関する問い合わせ先】

鳥取大学 学術研究院工学系部門

准教授 稲葉央

E-mail: hinaba@tottori-u.ac.jp, Tel: 0857-31-5331

教授 松浦和則

E-mail: ma2ra-k@tottori-u.ac.jp, Tel: 0857-31-5262

【報道に関する問い合わせ先】

鳥取大学 総務企画課 広報企画係

E-mail: ge-kouhou@ml.adm.tottori-u.ac.jp, Tel: 0857-31-5006