

タンパク質ナノチューブ「微小管」の中にタンパク質
を導入することに初めて成功
～タンパク質の裏打ちによって微小管が安定化！～

ポイント

- ・タンパク質ナノチューブである微小管の内部に結合するペプチドを用いて、微小管の中に緑色蛍光タンパク質 GFP を導入することに成功した。
- ・GFP が内部に結合することで微小管が大幅に剛直かつ安定となり、モータータンパク質を固定した基板上での運動速度が増加した。
- ・本手法により様々なタンパク質を微小管に内包することが可能となり、微小管の性質を改変した「人工微小管」としての材料応用や、微小管を標的とした抗がん剤開発などの細胞機能制御につながると期待される。

概要

鳥取大学工学部化学バイオ系学科の稲葉央助教、松浦和則教授らの研究グループは、同大学農学部岩崎崇准教授、北海道大学大学院理学研究院の角五彰准教授、佐田和己教授らの研究グループとの共同研究により、細胞骨格の一種であるタンパク質ナノチューブ状集合体「微小管」の中に緑色蛍光タンパク質 GFP を導入することに世界で初めて成功しました（図1）。

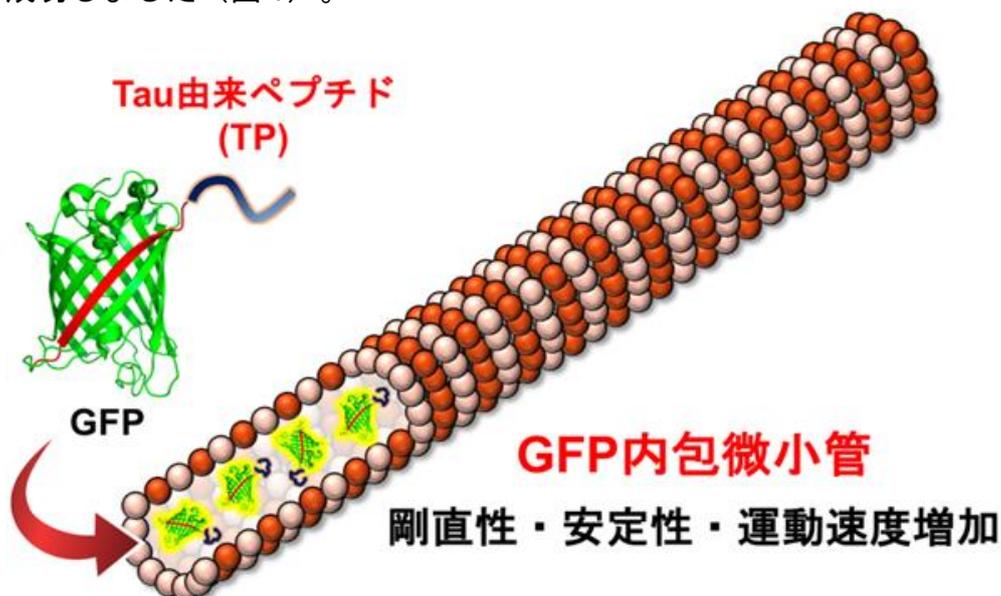


図1. 本研究の概念図。

GFP に Tau 由来ペプチド(TP)を連結することで、微小管への内包に成功した。
GFP が内部に結合した微小管は、その剛直性や安定性、運動速度が大きく増加した。

これまでに、本研究グループは微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP*1 の開発に成功しています。本研究では、TP を GFP に連結することで微小管内部への GFP の導入を達成しました。興味深いことに、GFP が内部に結合した微小管は剛直で安定なチューブ構造を形成し、モータータンパク質*2 を固定した基板上における運動速度の増加が見られました。これは、あたかも「裏打ち」のようにタンパク質が内部に結合して安定化する天然の微小管を人工的に再現したといえます。本研究は微小管内部にタンパク質を導入した初めての例であり、微小管を理解し、その構造や機能を変える全く新しい手法になると期待されます。

本研究成果は、日本学術振興会 科学研究費助成事業（17K14517、19K15699）、公益財団法人稲盛財団、コニカミノルタ科学技術振興財団の支援により得られたもので、2019年6月26日に英国王立化学会が発行する「Chemical Communications」オンライン版に掲載されました。

研究背景

生体内に存在する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内径約 15 nm、長さ数 μm ～数十 μm のチューブ状集合体です。微小管は可逆的に形成・解離を繰り返すことや、モータータンパク質の運動の足場として機能するなど、合成分子では再現が困難なユニークな特性を持ちます。微小管を利用した分子デバイスや分子ロボットの開発が盛んに行われていますが、これまで微小管自体の構造や機能を制御することは極めて困難でした。一方で、生体内では必要に応じて微小管の剛直性や安定性が変化します。特に、鞭毛や繊毛中の微小管は、内部にタンパク質が「裏打ち」する形で安定化されていることが近年明らかとなってきました。微小管の内部にタンパク質を人工的に導入できれば、生体内のように微小管の構造や機能を中から変えるこれまでにない手法になると期待されます。本研究グループは、独自に開発した微小管内部に結合するペプチドを用いることで、緑色蛍光タンパク質 GFP を内包した微小管の構築に世界で初めて成功し、GFP の裏打ちにより微小管の剛直性や安定性、運動速度が増加することを見出しました。

研究内容

まず、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP と GFP を連結した TP-GFP を作製しました。GFP の N 末端から 11 番目の β ストランド (GFP11) と TP をつなげた TP-GFP11 ペプチドを合成し、残りの GFP (GFP1-10) と再構成することで TP-GFP を構築しました (図 2a)。TP-GFP と赤色蛍光色素でラベルしたチューブリンを複合化し、GTP アナログである GMPCPP *3 を添加することで TP-GFP 内包微小管を作製しました (図 2b)。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察したところ、TP-GFP が微小管に結合することが明らかとなりました。GFP やチューブリンに結合する抗体を用いたアッセイにより、TP-GFP が微小管内部に結合していることが確認されました。

TP-GFP が内部に結合した微小管を蛍光顕微鏡で解析したところ、未結合の微小管と比べて①全長が 1.7 倍増加、②剛直性 (硬さ) の指標となる持続長が 4.0 倍増加、③運動速度が 1.2 倍増加、という特徴を持つことが明らかとなりました (図 3)。また、TP-GFP により微小管の形成が大幅に促進され、微小管の解離を促す低温条件下でもある程度微小管の構造が保持されていることが明らかとなりました。この微小管の形成促進・解離阻害は、微小管を安定化して機能する抗がん剤タキソール*4 と同等の効果でした。TP-GFP11 ペプチドのみではそのような効果は見られなかったことから、TP と微小管が両方微小管内壁に結合することで、微小管の構造を強く安定化していることがわかりました。

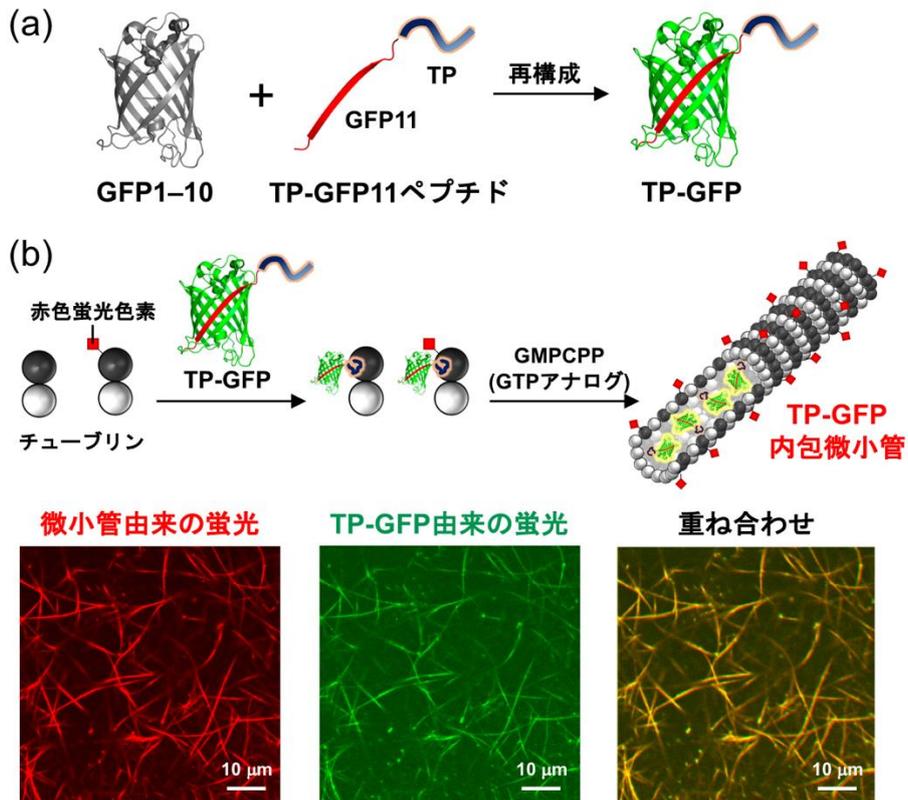


図 2. (a) GFP の再構成を利用した TP-GFP の構築。(b) TP-GFP の微小管への内包と共焦点レーザー蛍光顕微鏡像。各蛍光の局在が一致していることから、TP-GFP が微小管に結合していることがわかる。

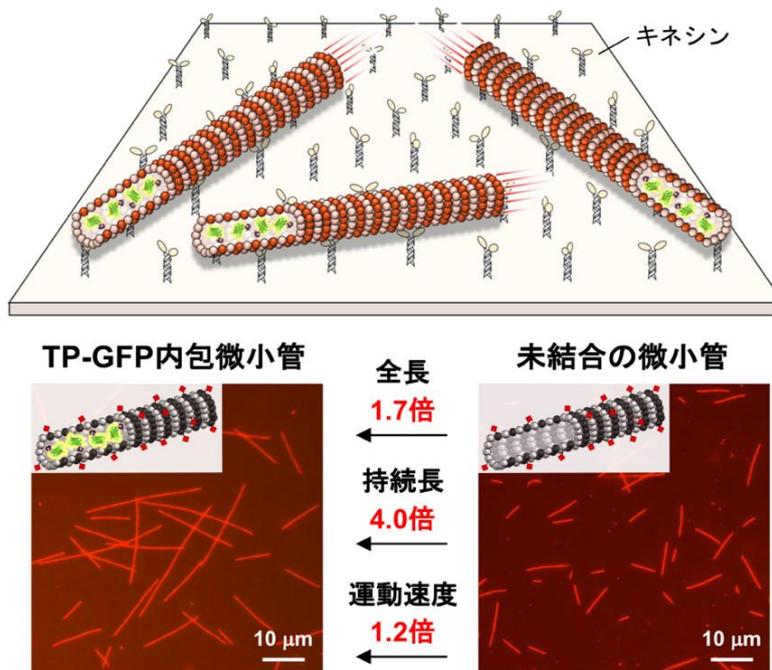


図 3. TP-GFP 内包微小管と未結合の微小管の比較。TP-GFP の微小管内部への結合により、全長の増加、剛直性の指標となる持続長の増加、キネシンによって駆動される微小管の運動速度の増加が見られた。

今後の展開

本研究では、ペプチドを用いて微小管内部にタンパク質を導入することに成功し、タンパク質が裏打ちする形で微小管を大きく安定化することを見出しました。本手法は今後様々なタンパク質の内包に応用可能だと考えられ、微小管を標的とした抗がん剤開発などの細胞機能制御や、構造が安定化された「人工微小管」として分子デバイスや分子ロボット作製のための新たなツールとしての利用が期待されます。

用語の解説

1) 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 (CGGGKKHVPGGGSVQIVYKPVLD)。微小管関連タンパク質の一種である Tau から設計され、微小管内部に相当するチューブリンのポケットに結合する。今回はこの配列を GFP に連結することで微小管への GFP の内包を行った。

2) モータータンパク質

アデノシン三リン酸 (ATP) の加水分解により生じる化学エネルギーを運動に変換するタンパク質の総称。細胞内における物質輸送や細胞分裂などに重要な役割を果たしている。微小管上を動くキネシンやダイニンなどが知られている。キネシンを固定した基板上では微小管が一方向に運動することが知られており、今回は GFP 内包微小管の運動速度を解析した。

3) GMPCPP

GTP アナログの一種であり、GTP と異なり加水分解速度が極めて遅い。微小管は末端の GTP が分解されて GDP になると解離が始まるため、GMPCPP は安定な微小管を形成するために汎用される。

4) タキソール

抗がん剤の一種であり、TP の結合部位と同じ微小管内部のポケットに強く結合する。タキソールの結合により微小管は極めて安定化され、解離が抑制されることで細胞が正常に分裂できず抗がん活性を示す。

論文情報

タイトル : Stabilization of Microtubules by Encapsulation of GFP Using Tau-Derived Peptide

著者名 : Hiroshi Inaba,* Takahisa Yamamoto, Takashi Iwasaki, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, and Kazunori Matsuura*

掲載誌 : Chemical Communications (DOI: 10.1039/C9CC04345D)

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/cc/c9cc04345d/unauth#!divAbstract>

以上

(本件に関する問合せ先)

【お問い合わせ先】

鳥取大学 学術研究院工学系部門

助教 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

北海道大学 大学院理学研究院化学部門

准教授 角五彰 E-mail: kakugo@sci.hokudai.ac.jp, Tel: 011-706-3474

教授 佐田和己 E-mail: sadatcm@sci.hokudai.ac.jp, Tel: 011-706-3473