

フォトクロミック分子を利用した 有糸分裂キネシン Eg5 の光制御に関する研究

Photo control of mitotic kinesin Eg5 using photochromic molecule

11D5602 石川久美子

指導教員 丸田晋策

SYNOPSIS

Kinesin is a molecular motor that moves along microtubules by hydrolyzing ATP. The kinesin Eg5 is a microtubule plus-end directed homotetrameric molecular motor that is essential for the formation of a bipolar spindle during eukaryotic cell division. All member of kinesin superfamily contain a structurally conserved loop L5 near the nucleotide binding site. The length and the amino acids composition of the L5 vary among kinesin superfamily members. The loop is believed to be one of the functional region for the energy transduction. Interestingly, Eg5 have a longest L5 with 18 residues and several drug inhibitors of the mitotic kinesin Eg5 bind to this loop. The elongated L5 is very important region for the inhibitor binding. S-trityl-L-cysteine and monastrol are potent Eg5 specific inhibitors. I focused on the L5 and the inhibitor for the purpose of artificial control of Eg5. In this study, we synthesized new thiol-reactive photochromic (IATAB, IASP) to be incorporated into L5 and photochromic STLC analogues (BTBA, ACTAB) in order to control Eg5 ATPase and motility activities. I prepared five Eg5 mutants E116C, E118C, Y125C, W127C and D130C which have single cysteine in L5. The W127C and D130C modified with photochromic molecules showed the alternation of ATPase activity and inhibitory effect by STLC upon ultraviolet and visible light irradiation. Photo-isomerization of the photochromic Eg5 inhibitors showed different inhibitory effect on ATPase and motility of microtubules. *Trans*-BTBA and *trans*-ACTAB inhibited Eg5 ATPase stronger than *cis*-BTBA and *cis*-ACTAB. It was demonstrated that artificial control of molecular motor kinesin can be achieved by external stimulus using photochromic Eg5 specific inhibitors and the chemical modification at functional key region with photochromic molecules.

Keywords: photochromic molecule, mitotic kinesin, Eg5, photo control, inhibitor, STLC, azobenzene, spiropyran

1. 緒言

キネシンは、ATPを加水分解しながら微小管上を移動するモータータンパク質で、有糸分裂、減数分裂、そして細胞小器官、タンパク質複合体、RNAの輸送などの重要な生理的役割を担っている。近年、キネシンの構造とエネルギー変換機構の研究から、その機械的な仕組みが分子レベルで明らかになった。まるで機械と同じように働くキネシンは、ナノデバイスとして人工的な応用が試みられるようになってきた。

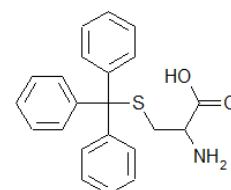
有糸分裂キネシン Eg5 は、キネシン 5 ファミリーに属し、ホモ四量体の構造をとる、真核生物の細胞分裂時に双極紡錘体の形成に必須のキネシンである。細胞分裂の際、Eg5 は双極紡錘体内の逆平行に並んだ微小管を架橋し、それらをスライドさせることによって細胞分裂を促す(1, 2)。

Eg5 には、大きな特徴が 2 つあり、1 つは、ヌクレオチド結合部位の近くにキネシンファミリーの中で最も長い 18 アミノ酸からなるループ L5 を有していることである(3)。もう 1 つは、Eg5 特異的阻害剤が多数存在することである。Eg5 特異的阻害剤は、Eg5 の長い L5、そして $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ によって形成される阻害剤結合ポケットに結合し、Eg5 の活性を阻害することが知られている。L5 は、阻害剤の結合部位であ

り、またヌクレオチドの結合やネックリンカーのドッキングに関与していると考えられている、Eg5 の機能の重要な部位である。

この 2 つの特徴を利用することにより、Eg5 の効率的な人工的制御が可能であると考えられる。生体分子の人工的な制御法として、外部刺激である光照射によって制御可能なフォトクロミック分子が有用である。フォトクロミック分子は、異なる波長の光照射によって、構造および特性を変化させる化合物で、これまでに従来型キネシンの活性(4)や、受容体(5)やイオンチャネル(6)の機能、そしてペプチドの構造の光制御などにも利用されている。

機能部位である L5 を利用した Eg5 の光制御を行うために、L5 自体にフォトクロミック分子を修飾した。光照射によって L5 に修飾したフォトクロミック分子の構造、特性を変化させ、L5 の環境を変化させることによって、Eg5 の活性および阻害剤の効果をも光制御した。L5 上のフォトクロミック分子修飾部位、そして修飾するフォトクロミック分子の種類によって、異なる光制御の結果が得られた。 図 1 Eg5 阻害剤 STLC の構造式



阻害剤を利用した Eg5 の光制御では、既存の Eg5 阻害剤 S-トリチル-L-シスチン(STLC)の構造を基に、フォトクロミック分子を組み込んだ光制御型 STLC アナログを合成し、阻害効果の光制御を試みた。

monastrol は最初に特徴づけされた Eg5 特異的阻害剤である。その後、さまざまな阻害剤が発見され、monastrol よりも Eg5 との親和性が高い阻害剤 STLC が発見された(図 1)(7)。これら Eg5 特異的阻害剤は、それぞれ異なる構造をしているにも関わらず、その多くが L5 から成る阻害剤結合ポケットに結合する。そのため、フォトクロミック分子を導入した光制御型 STLC アナログも、同様に L5 から成る阻害剤結合ポケットに入る得ると考えられる。照射によって、光異性化した光制御型 STLC アナログを Eg5 に加えることにより、Eg5 の活性と微小管-キネシン間の滑り速度を光制御できることを明らかにした。

2. L5 を利用した Eg5 の光制御

2.1 フォトクロミック分子を修飾するための変異体の調製

フォトクロミック分子をタンパク質に修飾するために、チオール基反応性フォトクロミック分子をアミノ酸シスチンのチオール基と結合させる方法を用いた。Eg5 はもともと L5 以外の位置に 4 つのシスチンを有しているため、これら 4 つのシスチンを他のアミノ酸に置換し(25 番目のシスチンをバリン, 43 番目のシスチンをセリン, 87 番目のシスチンをアラニン, 99 番目のシスチンをアラニン), cysteine-light の Eg5 を調製した。

この cysteine-light Eg5 を基に、L5 にのみ単一のシスチンを有した 5 種類の変異体 (E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C) を調製し、*Escherichia coli* BL21(DE3) で発現させた(図 2)。

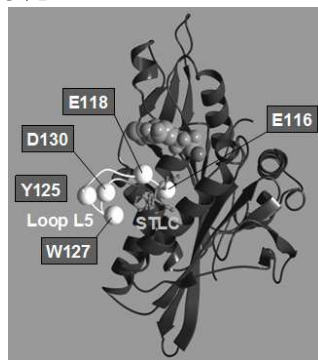


図 2 L5 上のシスチン置換部位のアミノ酸残基 (E116, E118, Y125, W127, D130)

2.2 変異体の特徴付け

L5 のアミノ酸変異が、活性および阻害剤 STLC による阻害効果に及ぼす影響を調べるために、wild type Eg5(WT)と cysteine-light, そして調製した 5 種類の変異体の活性と STLC による阻害効果を比較した。E118C は WT と比べて約 1.7 倍高い活性を示したが、残りの変異体は WT と同程度の活性を示した。

次に、各変異体に阻害剤 STLC の濃度を増やして加え、STLC による阻害効果を調べた。WT, cysteine-light, E118C, Y125C は 1 μ M の STLC によって 50% 以下

まで活性が阻害されたのに対し、E116C, W127C, D130C は、著しく STLC による阻害効果が減少した(図 3)。50 μ M STLC によって、WT, cysteine-light, Y125C の活性は完全に阻害されたが、E118C は約 11% の活性を保ち、E116C, W127C, D130C では約 50% の阻害効果が見られた。L5 のアミノ酸変異により、ATPase 活性および STLC の阻害効果に明らかな違いが観察された。過去における L5 が Eg5 の活性および阻害効果に関与しているという報告同様(8)、本研究で調製した変異体の結果からも、L5 が Eg5 の機能部位であることが示された。

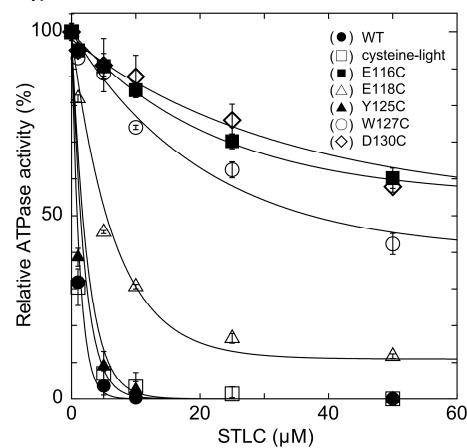


図 3 阻害剤 STLC による阻害効果

0.1 μ M Eg5 WT, cysteine-light, E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C の活性を 3 μ M の微小管, 0-50 μ M STLC 存在下で測定した。

2.3 チオール基反応性のフォトクロミック分子のデザインと合成

L5 に存在するシスチンに修飾用のフォトクロミック分子としてアゾベンゼンとスピロピランを用いた。アゾベンゼンは紫外線照射で *cis* 体に、可視光線照射で *trans* 体に光異性化する。*cis* 体は *trans* 体より親水性を示す。スピロピランは、紫外線照射によって、電荷を持たない疎水性のスピロピラン型(SP)から電荷分離し双性イオンを持った、親水性のメロシアン型(MC)へと光異性化する。今回用いたチオール基反応性のフォトクロミック分子は、これら 2 種類のフォトクロミック分子の誘導体 PAM, IATAB, IASP の 3 種類である(図 4)。

sigma-aldrich で販売されているアゾベンゼン 4-PhenylazomaleinaniI(PAM)に加え(図 4 A), 新規チオール基反応性フォトクロミック分子として、4-(N-(2-iodoacetyl)amino)-4'-(N-(2-(N-(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azobenzene [IATAB] と 3,3-dimethyl-1-(2-(2-iodoacetoxy)ethyl)-3H-1,2-dihydroindole-2-spiro-2'-(2H)-6'-nitrochromene [IASP] を合成した。IATAB は阻害剤 STLC のトリチル基部分とアゾベンゼンを結合させ、さらにチオール基反応性にするためにモノヨード酢酸を結合させた化合物である(図 4 B)。照射によるアゾベンゼンの光異性化に伴い、トリチル基部位と阻害剤結合ポケットの距離

が変化し、効率的な光制御が可能であると考えた。IASPは異なる種類のフォトクロミック分子スピロピランにモノヨード酢酸を結合させたものである(図4C)。異なるフォトクロミック分子を用いることによって、異なる光制御効果が期待できる。いずれも紫外線(366 nm),可視光線照射で光異性化することを確認した。

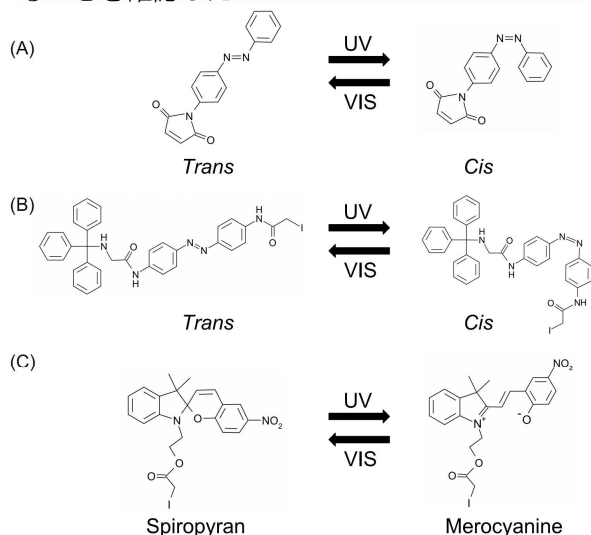


図4 チオール基反応性フォトクロミック分子の構造式 (A) PAM, (B) IATAB, (C) IASP

2.4 フォトクロミック分子をL5に修飾することによるEg5の活性光制御

3種類のチオール基反応性フォトクロミック分子を、5種類のEg5変異体とそれぞれ反応させた。各変異体に約1:1の割合でフォトクロミック分子が修飾される条件を、修飾効率の濃度および時間依存性を調べて決定した。

PAMを修飾したD130Cと、IASPを修飾したW127CおよびD130Cで活性の可逆的な光制御が観察できた。IASP-D130Cが、最も効率的な光制御を示し、SP-IASP-D130CはMC-IASP-D130Cと比べて30%低い活性を示した(図5A)。IATABでは、いずれの変異体も光制御には至らなかった。IATABはL5に直接修飾するのではなく、L5近傍に修飾すれば、照射によって、トリチル基の阻害剤結合ポケットとの相互作用を変化させることができるのではないかと考えられる。

また、可逆的な光制御が観察できた変異体の V_{max} と K_{MT} を求めたところ、表1に示すように、IASP-W127CとPAM-D130Cは照射によって V_{max} と K_{MT} の両方が影響を受けていることが明らかになった。そして、興味深いことに、IASP-D130Cは K_{MT} のみに変化が観察され、MC-IASP-D130CはSP-IASP-D130Cと比べて約4倍高い K_{MT} を示した。これらの結果から、L5にフォトクロミック分子を修飾することにより、Eg5の微小管との親和性、そしてATP最大加水分解速度も光制御できることが明らかになった。

表1 Eg5 ATPase活性の V_{max} と K_{MT}

| Mutants | V_{max} (S^{-1}) | K_{MT} (μM) |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| W127C | 6.87±0.54 | 1.63±0.32 |
| SP-IASP-W127C | 3.58±0.33 | 3.31±0.87 |
| MC-IASP-W127C | 4.64±0.31 | 2.64±0.41 |
| D130C | 7.20±0.34 | 1.59±0.55 |
| trans-PAM-D130C | 4.05±0.29 | 2.82±0.46 |
| cis-PAM-D130C | 2.55±0.47 | 1.01±0.26 |
| SP-IASP-D130C | 1.89±0.27 | 4.32±0.59 |
| MC-IASP-D130C | 1.71±0.17 | 0.95±0.37 |

2.5 フォトクロミック分子をL5に修飾することによる阻害効果の光制御

L5にフォトクロミック分子を修飾したEg5に、阻害剤STLCを加え、照射によって、阻害効果に変化が見られるのか調べた。IASP-W127C, IASP-D130Cにおいて、STLCによる阻害効果の可逆的な光制御が観察できた。特に、IASP-D130Cは照射によって、阻害効果に大きな差が見られ、SP-IASP-D130CにおけるSTLCの阻害定数(K_i)は22.2 μM であったのに対し、MC-IASP-D130Cの K_i は302.9 μM であった(図5B)。L5へのフォトクロミック分子修飾と、阻害剤STLCの阻害効果を組み合わせることにより、ON/OFFのような機械的な制御が可能となった。

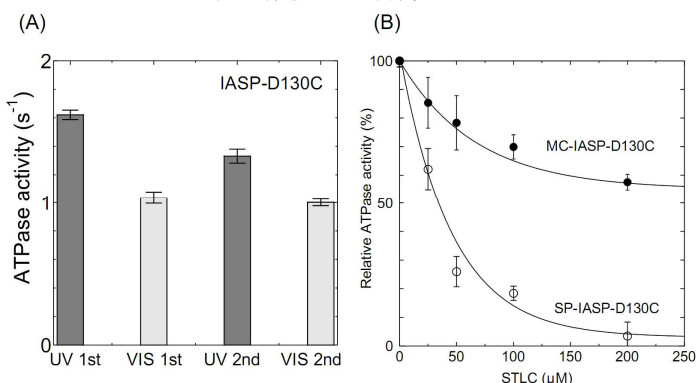


図5 IASP-D130Cの光制御 (A)ATPase活性の光制御(B)STLC阻害効果の光制御

3. 阻害剤を利用したEg5阻害効果の光制御

3.1 光制御型Eg5阻害剤のデザインと合成

Eg5の特徴の1つである特異的阻害剤を利用した光制御を行うために、Eg5特異的阻害剤であるSTLCの構造を基に、フォトクロミック分子を導入した光制御型Eg5阻害剤を合成した。1つ目は、STLCのトリチル基部位をフォトクロミック分子アゾベンゼンの両端に結合させた4,4'-bis(*N*-(2-(triphenylmethylamino)acetyl)amino)azobenzene [BTBA]である(図6A)。紫外線照射によって、アゾベンゼンをcis体にすることによって、両端のトリチル基が近接し合い、Eg5の阻害剤結合ポケットに結合しにくくなる考えた。2つ目は、STLCのトリチル基部位とシステイン部位をアゾベンゼンで

架橋した 4-(N-(2-(N-acetylcysteine-S-yl) acetyl) amino)-4'-(N-(2-(N-(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azobenzene [ACTAB]である(図 6B). シス테인部位は N-アセチル-L-シス테인を使用した. アゾベンゼンが *cis* 体, *trans* 体のどちらかの時に, より阻害剤結合ポケットに入り込みやすくなり, 強い阻害効果を示すのではないかと考えた.

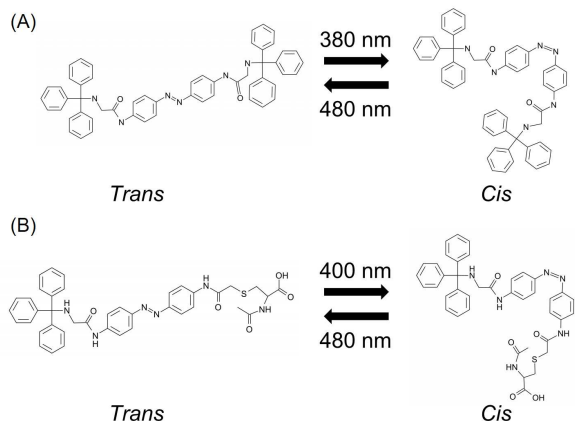


図 6 光制御型阻害剤の構造式 (A) BTBA, (B) ACTAB

3.2 光制御型阻害剤による Eg5 阻害効果の光制御

光異性化した BTBA と ACTAB を Eg5 に加えたところ, いずれも可逆的に光制御ができ, アゾベンゼンが *trans* 体のとき, *cis* 体のときよりも, Eg5 の活性をより大きく阻害した. ACTAB は Eg5 との親和性も高く, *cis*-ACTAB の 50% 阻害濃度(IC₅₀)は 9.1 μM, *trans*-ACTAB の IC₅₀ は 5.2 μM であり, 既存の Eg5 阻害剤 monastrol の IC₅₀ = 17 μM と比較しても Eg5 阻害剤として十分な親和性であると考えられる(図 7). さらに, 光異性化する波長を検討したところ, BTBA は 380 nm の紫外線照射で *cis* 体に, 480 nm の可視光線照射で *trans* 体に光異性化し, ACTAB は 400 nm の可視光線照射で *cis* 体に, 480 nm の可視光線照射で *trans* 体に光異性化することが確認できた. 可視光線のみで光制御が可能な ACTAB は細胞への応用が期待できる.

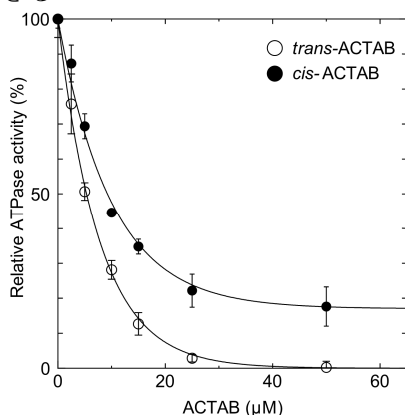


図 7 ACTAB による Eg5 の ATPase 活性の光制御 0.1 μM Eg5 の活性を 3 μM の微小管, 0-50 μM ACTAB 存在下で測定した.

3.3 光制御型阻害剤による Eg5-微小管滑り運動の光制御

顕微鏡下で, キネシン上の微小管滑り運動を観察する方法(*in vitro* motility assay)を用いて, 光制御型阻害剤存在下での微小管-キネシン間の滑り速度を観察した. 光異性化させた *trans*-ACTAB もしくは *cis*-ACTAB を, キネシンと微小管を貼り付けたスライドガラスとカバーガラスで作製したフローセルに流し入れ, 滑り速度の変化を測定した. 図 8 に示すように, *trans*-ACTAB 存在下のときに, 滑り速度の減少が観察された. これらの結果から, 光制御型阻害剤は, Eg5 の活性だけでなく, 微小管滑り運動の制御も可能であることが明らかになった.

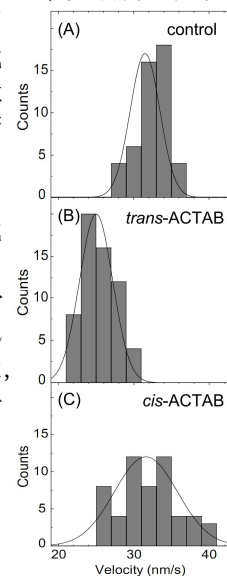


図 8 微小管滑り運動 (A)control, (B)*trans*-ACTAB, (C)*cis*-ACTAB

4. 総括

Eg5 の人工的制御法として, 機能部位にフォトクロミック分子を修飾する方法と, 外部因子である光制御型阻害剤を用いる方法を示した. フォトクロミック分子を Eg5 の L5 に修飾することにより, Eg5 の活性および STLC による阻害効果を光制御できることを示した. フォトクロミック分子導入部位により, 光制御の効率が大きく異なり, W127C と D130C の結果から, Eg5 の人工的制御の仕掛け部位として L5 の C 末が適しているのではないかと考えられる.

また, 光制御型阻害剤により, 光照射によって Eg5 の阻害効果と微小管-キネシン間の滑り速度を光制御できることを示した. 外部因子である阻害剤を利用した光制御は遺伝子操作などが不要であり, タンパク質は native なものが使用できることが利点である. また, 可視光線領域の光でのみ光制御可能な ACTAB は, 紫外線による生体分子損傷の心配がないため, 今後, *in vivo* でのナノデバイスとしての利用だけでなく, 細胞内への応用, さらに, Eg5 阻害剤は新たな抗がん剤としても注目されているため, 光制御型 Eg5 阻害剤の開発は, 光照射によって効果が制御可能な, 副作用の少ない抗がん剤としての応用が期待できる.

5. 参考文献

1. Sawin *et al.* (1992) *Nature*, **359**:540-543.
2. Cole *et al.* (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 22913-6
3. Turner *et al.* (2001) *J Biol Chem.* 276(27):25496-502.
4. Yamada *et al.* (2007) *J Biochem.* 142(6):691-8.
5. Bartels *et al.* (1971) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(8):1820-3.
6. Banghart *et al.* (2004) *Nat Neurosci.* 7(12):1381-6.
7. Skoufias *et al.* (2006) *J Biol Chem.* 281(26):17559-69.
8. Kim *et al.* (2010) *J Biol Chem.* 285(24):18650-61.