

フotok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

2014 年 3 月

石川 久美子

目次

第一章 序論

1.1 はじめに	7
1.1.1 研究の目的	7
1.1.2 本論文の構成	8
1.2 キネシン	8
1.3 有糸分裂キネシン Eg5	9
1.3.1 Eg5	9
1.3.2 Eg5 阻害剤	11
1.3.3 ループ L5	12
1.4 細胞骨格	13
1.4.1 微小管	13
1.4.2 微小管阻害剤	13
1.5 フォトクロミズム	14
1.5.1 フォトクロミック分子	14
1.5.2 フォトクロミック分子の応用	15
1.6 第一章のまとめ	17
付図・付表	

第二章 L5 変異によるキネシン Eg5 の生化学的性質への影響

2.1 本章の要旨	48
2.2 緒言	48
2.3 実験材料と方法	49
2.3.1 試薬	49
2.3.2 Eg5 モータードメイン wild-type の調製法	50
2.3.3 Eg5 cysteine-light の調製法	50
2.3.4 Eg5 変異体の調製法	51
2.3.5 Eg5 の発現, 精製法	52
2.3.6 微小管調製法	54
2.3.7 ATPase 活性測定法	54
2.4 結果と考察	55
2.4.1 Eg5 wild-type, cysteine-light および変異体の調製	55
2.4.2 Eg5 の ATPase 活性測定	55
2.5 第二章のまとめ	57
付図・付表	

第三章 キネシン Eg5 の機能性ループ L5 へのフォトクロミック分子修飾と光制御	
3.1 本章の要旨	72
3.2 緒言	72
3.3 実験材料と方法	74
3.3.1 試薬	74
3.3.2 キネシン Eg5 wild-type の調製法	74
3.3.3 ATPase 活性測定法	74
3.3.4 チオール基反応性フォトクロミック分子の合成法	74
3.3.5 チオール基反応性フォトクロミック分子の光学的特徴づけ	75
3.3.6 チオール基反応性フォトクロミック分子の L5 への修飾	76
3.3.7 L5 へ修飾したチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化	77
3.3.8 阻害定数算出法	77
3.4 結果と考察	77
3.4.1 チオール基反応性フォトクロミック分子の特徴	77
3.4.2 Eg5 変異体へのチオール基反応性フォトクロミック分子の修飾	78
3.4.3 L5 へ修飾したチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化	79
3.4.4 フォトクロミック分子修飾による Eg5 変異体の活性変化	79
3.4.5 フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の活性光制御	80
3.4.6 フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の STLC による阻害効果の光制御	81
3.5 第三章のまとめ	83
付図・付表	
第四章 光制御型阻害剤による Eg5 の光制御	
4.1 本章の要旨	107
4.2 緒言	107
4.3 実験材料と方法	109
4.3.1 試薬	109
4.3.2 キネシン Eg5 wild-type の調製法	109
4.3.3 光制御型阻害剤の合成	109
4.3.4 光制御型阻害剤の光異性化	110
4.3.5 光制御型阻害剤の阻害効果測定法	111
4.3.6 蛍光標識微小管調製法	112
4.3.7 微小管-キネシン間の滑り速度測定 (<i>In vitro</i> motility assay)	113
4.3.8 統計分析	113
4.4 結果と考察	113
4.4.1 光制御型 Eg5 阻害剤の設計と合成	113
4.4.2 光制御型 Eg5 阻害剤の特徴	114
4.4.3 BTBA による阻害効果の光制御	115

4.4.4 ACTAB による阻害効果の光制御	・ ・ ・ ・ ・ 116
4.4.5 光制御型阻害剤による Eg5-微小管滑り運動の光制御	・ ・ ・ ・ ・ 117
4.5 第四章のまとめ	・ ・ ・ ・ ・ 118
付図・付表	
第五章 総括と展望	
5.1 総括	・ ・ ・ ・ ・ 139
5.2 展望	・ ・ ・ ・ ・ 141
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 143
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 153

略語

ATP	adenosine-5-triphosphate
ADP	adenosine-5'-diphosphate
GTP	guanosine-5'-triphosphate
GDP	guanosine-5'-diphosphate
DNA	deoxyribo nucleic acid
cDNA	complementary DNA
WT	wild-type
Da	Dalton
MT	microtubule
STLC	S-trityl-L-cysteine
DTT	dithiothreitol
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propane sulfonic acid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)9-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
EGTA	<i>O,O'</i> -Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
PCR	polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
PAM	<i>N</i> -(4-phenylazophenyl) maleimide
IATAB	4-(<i>N</i> -(2-iodoacetyl)amino)-4'-(<i>N</i> -(2-(<i>N</i> -(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azobenzene
IASP	3,3-dimethyl-1-(2-(2-iodoacetoxy)ethyl)-3 <i>H</i> -1,2-dihydroindole-2-spiro-2'-(2 <i>H</i>)-6'-nitrochromene
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
THF	tetrahydrofuran
BTBA	4,4'-bis(<i>N</i> -(2-(triphenylmethylamino)acetyl)amino)azobenzene
ACTAB	4-(<i>N</i> -(2-(<i>N</i> -acetylcystein- <i>S</i> -yl)acetyl)amino)-4'-(<i>N</i> -(2-(<i>N</i> -(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azobenzene

第一章

序論

1.1 はじめに

1.1.1 研究の目的

我々の生体内には、まるで機械と同じように働くタンパク質が多数存在し、これらのタンパク質は生体分子機械と呼ばれている。生体分子機械の大きさは、数ナノメートルにもかかわらず、巧妙な仕組みによって、私たちの生命活動にとって重要な働きをしている。これら生体分子機械の機械的な仕組みは、分子生物学的研究や結晶構造解析により明らかになってきており、外部刺激に応答して機械的な働きをする生体分子機械は、人工的な外部刺激によって、その機能や仕組みを人工的に制御できることを示唆している。筆者が研究対象としたキネシンも、ATP加水分解の化学エネルギーを運動エネルギーへと変換するエネルギー変換分子機械である。現在、生体分子機械を工学的素子として利用しようとする研究が行われている(van den Heuvel and Dekker, 2007)。しかし、現段階での生体分子機械の制御を目的とした研究では、酵素活性の増減で制御されるにとどまっており(Yamada et al., 2007)、生体分子機械の活性状態(ON)、不活性状態(OFF)といったスイッチ機構のような制御の確立には至っていない。そこで本研究では、ON/OFFが制御可能な生体分子機械の開発を目的とし、研究を行った。ON/OFFが制御可能な素子として、本研究では阻害剤によりOFF状態が作れる有糸分裂キネシンEg5に注目した。Eg5は、生体内での生理的役割、また機能や構造がすでに明らかになっており、特徴的な構造として非常に長いループL5を有していることが知られている。また、Eg5には特異的阻害剤が多数存在することが分かっており、その多くが、L5を一部とす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。Eg5のOFF状態を作るのに必要なL5と阻害剤に制御スイッチを導入する事により、Eg5を効率よく制御できるのではないかと考えた。そこで、L5そして阻害剤に光応答性スイッチであるフォトクロミック分子を導入し、外部からの光刺激によってEg5の機能を効率良く制御することを試みた。

1.1.2 本論文の構成

本論文は、五つの章から構成されている。本章では、まず生体分子機械の1つであるキネシンについて紹介する。その中でも有糸分裂キネシン Eg5 について詳しく述べ、次に、キネシンが細胞内を移動する際のレールとなる細胞骨格である微小管について紹介する。最後に、光応答性スイッチとして生体分子の光制御に利用されているフォトクロミック分子について述べる。実際に、フォトクロミック分子を利用した生体分子の光制御の応用例についても述べる。

第二章では、有糸分裂キネシンの機能部位であるループ L5 のアミノ酸置換が、Eg5 の ATPase 活性および阻害剤 S-trityl-L-cysteine (STLC) による阻害効果に与えた影響について述べた。

第三章では、L5 を利用した Eg5 の光制御を試みた。第二章で調製した L5 にのみ単一のシステインを有する Eg5 変異体に、チオール基反応性フォトクロミック分子を修飾し、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光制御した。

第四章では、阻害剤を利用した Eg5 の光制御を試みた。既存の Eg5 阻害剤 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行った。

最後に第五章では本論文の結論をまとめ、Eg5 の特徴を利用した人工的制御の有用性を示し、今後の展望を述べた。

1.2 キネシン

キネシンは、1985 年に Vale らによって、イカの神経軸索から最初に発見された (Vale et al., 1985c; Brady, 1985)。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 の輸送などの多くの重要な細胞機能を担っている (Hirokawa et al., 2010; 図 1-1 B, 1-2)。ヘッドと呼ばれる 340 程度のアミノ酸からなるモータードメイン、そしてストーク、テイルの 3 つの部位で構成され、モータードメインには、ヌクレオチド結合部位および微小管結合部位が存在する (Hirokawa, 1998; Endow, 1999;

Mandelkow and Mandelkow, 2002; Kavallaris et al., 2012) (図 1-1 A). エネルギー変換部位であるモータードメインに存在するヌクレオチド結合部位に、エネルギー源となる ATP が結合し、結合した ATP を ADP とリン酸に加水分解することにより得た化学エネルギーを、生体内を移動するための運動エネルギーへと変換する仕組みを有したキネシンは、図 1-3 に示すようなエネルギー変換分子機械として捉えることができる。

キネシンスーパーファミリーは、他のモータータンパク質であるミオシンや G タンパク質といくつか構造的特徴を共有しており、ヌクレオチドのβリン酸基と反応する P ループや、リン酸感受性があり、ATP の加水分解中に構造が劇的に変わる領域であるスイッチ I , II がそれに相当する(Kikkawa et al., 2001; Kull and Endow, 2002; Marx et al., 2005).

キネシンは、これまでにモータードメインの系統解析によって 15 のサブファミリーに分類されており(Lawrence et al., 2004; Miki et al., 2005; Hirokawa et al., 2009) (図 1-4 A), これらのファミリーは、モータードメインの位置に応じて大きく 3 つに分類することができる。N-キネシンはN末端領域に、C-キネシンはC末端領域、M-キネシンは中央に、それぞれモータードメインを有している(図 1-4B). N-キネシンの多くは、微小管のプラス端方向への運動性を持ち、反対に C-キネシンは微小管のマイナス端方向への運動性を持っている。現在、配列相同性によって、66 種類の真核生物において、70 種類以上のキネシン-5 ファミリーに属するキネシンが存在することが分かっている。その後、2004 年に Lawrence らによって、キネシン-5 ファミリーは、紡錘体微小管局在するキネシンとして分類された(Lawrence et al., 2004).

1.3 有糸分裂キネシン Eg5

1.3.1 Eg5

Eg5 はキネシン-5 ファミリーに属する N-キネシンである。現在の構造モデルで、Eg5 は 2 つの逆平行になった 2 量体によって形成されたホモ四量体タンパク質であることが示されている(Kashina et al., 1997) (図 1-5). Eg5 は有糸分裂の際の双極紡錘体形成に必須のキネシンであり、ホモ四量

体構造によって、逆平衡に並んだ微小管を架橋し、微小管のプラス端方向に動く力を利用して、架橋した微小管をスライドさせ、双極紡錘体形成を行う(図 1-6)。また、Eg5 には、大きな特徴が 2 つ存在し、その 1 つは、ヌクレオチド結合部位近傍に、キネシンファミリーの中で最も長いループ L5 を有していることである。そして、2 つめの特徴は、Eg5 には多数の特異的阻害剤が存在することである。これら Eg5 特異的阻害剤は異なる構造をしているにもかかわらず、その多くは、Eg5 の特徴である最長の L5 を含む阻害剤結合ポケットに結合し、Eg5 の ATP 加水分解サイクルを阻害する事が分かっている。Eg5 の 2 つの特徴を、図 1-3 で示したキネシンの模式図に当てはめると、Eg5 は、制御スイッチとして鍵と鍵穴を有したエネルギー変換分子機械ととらえることができる(図 1-7)。つまり、Eg5 には、ATP の加水分解サイクルを制御するための鍵が存在し、その鍵を鍵穴に差し込むことによって、ATP の加水分解サイクルを停止させることができる仕組みが存在するという考えられる。2 つの特徴の具体的な説明は次項で述べる。

Eg5 を阻害すると、中心体の分離や双極紡錘体の形成が妨げられ、単極紡錘体の形成が誘導されるため、細胞が正常に有糸分裂できなくなることが分かっている(Kapoor et al., 2000) (図 1-8)。このような有糸分裂の停止は、有糸分裂チェックポイントの活性化につながり、その後細胞死を引き起こす(Blangy et al., 1995; Masuda et al., 2003; Sarli and Giannis, 2006)。Eg5 は、増殖性の組織で過剰発現しており、精巣、胸腺、扁桃腺、骨髄で発現が確認されているが、非増殖性の組織や成人の中樞神経系には発現していないことが分かっている(Ferhat et al., 1998) (表 1-1)。また、白血病、乳癌、肺癌、膵臓癌増といった増殖性の組織でも発現が確認されている(Hegde et al., 2003; Liu et al., 2010)。以上のことから、Eg5 の阻害は、非増殖性の組織には影響せず、増殖性の組織のみの細胞死を引き起こすことができるとして、新たな抗がん剤の標的として注目されている。

現在使用されている抗がん剤は、キネシンのレールである微小管を標的としたものである。しかし、微小管は、細胞分裂や、シナプス小胞、細胞形状の維持、そして細胞内輸送など、多くの細胞内機能に関与している(Desai and Mitchison, 1997; Joshi, 1998; Lane and Allan, 1998)。したがって、微小管を阻害し、それらの機能を中断させると、有毒な副作用につながる。実際に、現在使用されている微小管を標的とした抗がん剤は、脱毛や神経系の副作用を引き起こすことが分かっ

いる。

そのため、非増殖性の組織および成人の中枢神経系には発現しない Eg5 を標的とした抗がん剤は、微小管を標的とした抗がん剤のような神経系の副作用は起こさないと考えられ、非常に注目されており、現在までに数多くの Eg5 を阻害剤が開発されている(Sakowicz et al., 2004; Jackson et al., 2007; El-Nassan, 2013) (図 1-9 - 1-18)。これら阻害剤のいくつかは、現在、抗がん剤としての有用性を調べるため第 I、第 II 相臨床試験が行われている(表 1-2)。

1.3.2 Eg5 阻害剤

monastrol は、1999 年に Mayer らによって発見された最初の Eg5 阻害剤である(Mayer et al., 1999) (図 1-19A)。Mayer らが開発したスクリーニング方法を用いて、微小管に影響せず有糸分裂タンパク質を標的とする細胞透過性小分子の同定が行われ、16320 個の小分子ライブラリの中から発見された。

1999 年の発見以降、多くの研究がなされ、monastrol は ATP と競合せずに、微小管非存在下、存在下の両方で Eg5 ATPase 活性を阻害することが分かった(Maliga et al., 2002)。さらに、2006 年には、monastrol が Eg5 に結合した状態の結晶構造が報告され、monastrol が Eg5 のループ L5 と α -ヘリックス 2、そして α -ヘリックス 3 から成る疎水性ポケットに結合することが明らかになった (Maliga et al., 2006a) (図 1-19A)。monastrol がポケットに結合すると、L5 は構造変化を起こし、monastrol を包み込むような構造をとる。そして、ADP の解離を遅くし、結果的に ATP の加水分解を阻害する(Maliga et al., 2006a; Maliga et al., 2006b; Jiang et al., 2006)。さらに、その後の研究により、monastrol が多くの細胞株に対して強力な抗腫瘍活性を示すことも分かっている(Russowsky et al., 2006)。monastrol 以外にも多くの Eg5 阻害剤が発見され、現在までに、38 種類以上の Eg5 阻害剤の第 I、第 II 相臨床試験が行われ(Rath and Kozielski, 2012)、Eg5 阻害剤は単剤療法として有効であることが示されている(表 1-2)。

本研究では、Eg5 阻害剤の 1 つである S-trityl-L-cysteine(STLC) に注目して研究を進めた。STLC は、安価で強力な Eg5 特異的阻害剤である(図 1-19B)。STLC は、1970 年代に生体内でマ

ウス白血病の強力な抗腫瘍薬として発見された(Zee-Cheng et al., 1970; Kessel et al., 1976). その後, 1992年に抗有糸分裂剤であることが報告されたが, 当時具体的な標的物質が何であるのかまでは分からなかった(Paull et al., 1992). 2004年になって, STLCが細胞分裂のM期において, キネシンEg5の機能を阻害することによって, 中心体の分離と双極紡錘体形成の阻止につながるということが明らかになった(DeBonis et al., 2004). monastrol同様, 微小管非存在下, 存在下の両方でEg5 ATPase活性を阻害し, さらに, monastrolよりも強力なEg5阻害剤であることが分かった(IC50 = 微小管非存在下 1 μ M, 微小管存在下 140 nM) (Skoufias et al., 2006). また, STLCがEg5に結合した状態の結晶構造が報告され, monastrolと同じループL5と, α -ヘリックス2,そして α -ヘリックス3から成るヌクレオチド結合部位近傍の疎水性ポケットに結合することが明らかになった(Brier et al., 2004) (図 1-19B).

1.3.3 ループ L5

キネシンには, 他のモータータンパク質にはないループ L5 と呼ばれる特徴的な構造が存在する. L5の長さは, キネシンスーパーファミリー間で大きく異なり, キネシン-1(10 アミノ酸)や CENP-E は短く(7 アミノ酸), キネシン-5 ファミリーに属するEg5が最も長い(18 アミノ酸)L5を有している(Turner et al., 2001) (図 1-20). L5の具体的な機能は明らかにされていないが, Eg5のL5におけるいくつかの研究によって, L5はキネシンのATP加水分解サイクルを制御する働きがあるのではないかと考えられている(Kaan et al., 2005). この仮説を促す研究結果として, 具体的には, L5がPループやスイッチ I 近傍に存在すること(Turner et al., 2001), さらに, L5の点変異がキネシンのATPや微小管に対する親和性に影響を与えるということが挙げられる(Tcherniuk et al., 2010; Behnke-Parks et al., 2011).

1.4 細胞骨格

1.4.1 微小管

微小管は細胞骨格の1つで、モータータンパク質であるキネシンやダイニンが細胞内を移動する際のレールとなる。微小管は、 α および β チューブリンから構成されるチューブリンヘテロ二量体を基本単位として構成されている。チューブリンはGTP結合タンパク質で、GTPが結合したチューブリンは重合し、中空円筒の壁を形成する。チューブリンが重合して構成された微小管の外径は約25 nmで、細胞形状の維持や細胞内輸送、有糸分裂など生体内において重要な役割を担っている(Nogales, 2001) (図 1-21)。微小管には方向性があり、チューブリン二量体が付加しやすい側をプラス端、解離しやすい側をマイナス端と呼ぶ。微小管はモータータンパク質のレールの役割も担っているが、従来型キネシンは微小管上をマイナス端からプラス端に移動し(Vale et al., 1985a; Vale et al., 1985b)、反対にダイニンは微小管上をプラス端からマイナス端に移動する(Paschal and Vallee, 1987; Sale and Satir, 1977; Vale and Toyoshima, 1988)ことが知られている。

1.4.2 微小管阻害剤

微小管は細胞の増殖に必須の細胞骨格であるため、微小管阻害剤は抗がん剤として利用されている。微小管阻害剤はその性質から、チューブリンが重合して微小管になる過程を阻害するビンカアルカロイド系の化合物と、微小管の脱重合を阻害して極度に微小管を安定化させるタキサン系の化合物に大別できる。

ビンカアルカロイドは、ニチニチソウの抽出物から半合成され、1979年にフランスで開発された。ビンカアルカロイドはカタランチンとビンドリリン部分(図 1-22)からなる二量体分子で、 β チューブリンに結合する。ビンカアルカロイドは、微小管の脱重合を引き起こす不安定化剤として分類され、有糸分裂の進行を阻害し、最終的にはアポトーシスを誘導する(Perez, 2009)。

タキサン系の化合物の1つであるパクリタキセルはセイヨウイチイから分離された天然物質である (Wani et al., 1971) (図 1-23). 1994年に半合成法が実用化され, 安定した供給が可能となった. パクリタキセルは β チューブリンに結合し, 微小管を安定化して, 細胞分裂を細胞周期のG2/M期で停止させ, 最終的にはアポトーシスを誘導する(Jordan, 2002; Jordan and Wilson, 2004; Rowinsky, 2005). 単剤として, または他の化学療法と組み合わせて用いることによって固形腫瘍に対して顕著な活性を示すことが分かっている. パクリタキセルは, 点滴静脈注射によって投与され, 乳癌や非小細胞肺癌の治療において使用が承認されている(Bristol-Myers Squibb Company, 2007; Sanofi-Aventis, 2007). 主な副作用として脱毛, 末梢神経障害, 発熱, 関節痛, 筋肉痛, 悪心・嘔吐などが挙げられる. このように, 微小管は, がん細胞だけでなく神経細胞などの正常細胞でも重要な機能を担っているため, 微小管阻害剤を抗がん剤として使用する際には, 多くの副作用が起こってしまう.

1.5 フォトクロミズム

1.5.1 フォトクロミック分子

フォトクロミック分子は, 光照射によって分子構造と性質が変化する化合物である. フォトクロミック分子の魅力的な特徴は, 反応時間の短さ, 可逆性, 外部刺激により変化する能力などが挙げられる. フォトクロミック分子は様々な分野で応用されており, すでに CD-R などの光記憶装置, サンガラスなどの調光レンズ, また紫外線チェッカーなどに利用され, 商用されている(Irie, 2000; Levitus and Aramendia 1999). フォトクロミック分子にはいくつか種類があり, アゾベンゼン, スピロピラン, フルギド, ジアリアルエテンがよく知られている(図 1-24).

本研究では, アゾベンゼンとスピロピランを用いた. アゾベンゼンはもともと染料として注目されていたが, 1937年にHartleyによって, 光異性化することが明らかにされ(Hartley, 1937), 以後, 光制御スイッチとして様々な研究に使用されている. アゾベンゼンには2種類の異性体(*cis*, *trans*)があり, 紫外線照射で *trans* 体から *cis* 体へ, 440nm 付近の可視光線照射で *cis* 体から *trans* 体への光

異性化する。アゾベンゼンは、アゾ基(-N=N-)によって連結された2つの芳香環をもった化合物で、*cis*体と*trans*体では、芳香環部分がそれぞれ異なる空間的配置を示し、図1-24Cに示すように異なる物理的および化学的特性を示す(Rau, 1990)。この構造変化に伴い、*trans*体は*cis*体よりも親水性を示す。アゾベンゼンの主な長所は、合成が容易であることである。短所は、芳香族に結合した置換基の性質によって、光照射しなくても、熱によって*cis*体から*trans*体に戻ってしまうことである。

スピロピランは、1952年にFisherとHirshbergによって発見されたフォトクロミック分子で、通常無色のスピロピラン型であるが、紫外線照射で紫色のメロシアニン型に異性化する(Fischer and Hirshberg, 1952) (図1-24A)。電荷を持たない疎水性のスピロピラン型から電荷分離し双性イオンを持った、親水性のメロシアニン型へと光異性化するため、光制御スイッチとして用いた際、アゾベンゼンよりもさらに大きな変化をもたらすと考えられる。また、アゾベンゼンと同様、熱によってメロシアニン型からより安定なスピロピラン型に戻る。

1.5.2 フォトクロミック分子の応用

外部刺激である光によって制御可能なフォトクロミック分子は、生体分子の光制御にも幅広く用いられている。特にアゾベンゼンの応用性は高く、酵素(Hohsaka et al., 1994; Itamar et al., 1991; Pamela et al., 1993)、受容体(Bartels et al., 1971; Stawski et al., 2010; Stawski et al., 2012; Tochitsky et al., 2012)、ペプチド(Bredenbeck et al., 2005; Dong et al., 2006; Guerrero et al., 2005; Pieroni et al., 2001; Renner et al., 2005; Renner and Moroder, 2006; Woolley et al., 2006)、タンパク質(Yamada et al., 2007)、そしてイオンチャネル(Banghart et al., 2004; Hilf et al., 2010; Mourot et al., 2011)などの光制御に使用されている。光だけで可逆的な制御が可能である点が、生体分子への応用が進んだ主な理由であると考えられる。ここでは、多数ある応用例の中で具体的に3例を示す。

1つ目は、イオンの輸送に必須の細胞膜中の細孔の開閉を制御するためにアゾベンゼンが利用された研究である(Banghart et al., 2004) (図1-25)。細胞膜中の細孔の開閉部分近傍に、アゾベン

ゼンを導入し、可視光線照射時に、アゾベンゼンの一端が開閉部分に入り込み、イオンの輸送を阻害する。紫外線を照射すると開閉部分からアゾベンゼンが解離し、再びイオンが輸送されるという仕組みである。

2つ目は、アゾベンゼンを用いて、ペプチドの α -ヘリックス構造を制御したものである(Bredenbeck et al., 2005; Guerrero et al., 2005) (図 1-26)。ペプチドをアゾベンゼンで架橋し、*trans* 体の時は正常な構造を保つが、紫外線を照射して *cis* 体になると、アゾベンゼンの構造変化に伴い、ペプチドも構造変化し、 α -ヘリックス構造を取れなくなる。再び、可視光線照射によってアゾベンゼンを *trans* 体に戻すと、正常な α -ヘリックス構造を取ることができる。

3つ目は、当研究室の yamada らによって行われた、アゾベンゼンを用いたキネシンの光制御である(Yamada et al., 2007)。yamada らは、キネシンファミリー間で保存された共通の機械的仕組み(微小管結合部位)に、人工的制御デバイスを導入し、外部刺激によって、従来型キネシンの機能を制御できることが明らかにした。しかしながら、共通の機械的仕組みに制御デバイスを導入した方法では、酵素活性の増減で制御されるにとどまっており、より効率の良い生体分子機械の制御には、制御デバイスおよび制御デバイス導入部位のさらなる検討が必要である。

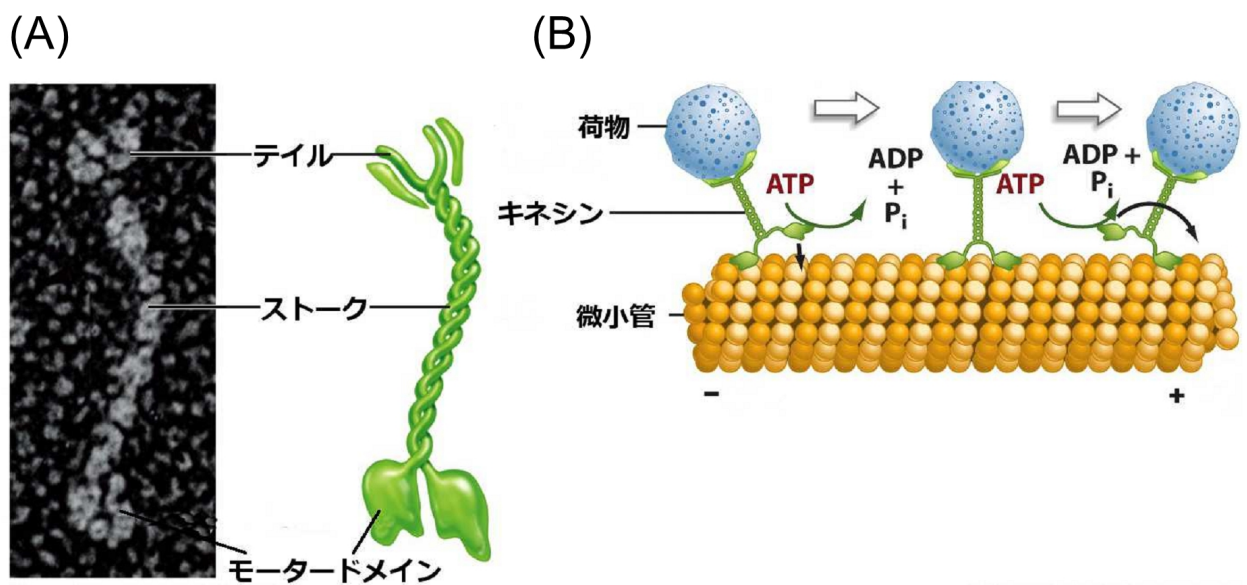
さらに、近年は、生体内でも利用されており、生きた細胞内のコイルドコイルの光制御(Zhang et al., 2010)や蛍光イメージング(Beharry et al., 2011b)、生体内でのイオンチャネルの光制御(Chambers et al., 2006; Volgraf et al., 2006)などの報告がある(図 1-27)。

このように特定の波長の光によって外部から人工的に制御できるフォトクロミック分子は、生体分子の制御方法として有用であり、今後も生体分子の制御に幅広く利用されることが期待できる。

1.6 第一章のまとめ

第一章では、はじめに有糸分裂に必須のキネシンである Eg5 の構造的特徴そして、特異的阻害剤について述べた。Eg5 が L5 という特徴的な構造を持ち、L5 が Eg5 の機能に重要な部位であること、そして、Eg5 の機能を阻害する特異的阻害剤が多数存在し、それら阻害剤の多くが L5 を含む阻害剤結合ポケットに結合することを述べた。次に、Eg5 をはじめ、キネシンが細胞内を移動する際に、レールとなる微小管について述べた。現在使用されている抗がん剤は、微小管を標的としたものであり、その副作用が問題となっている。Eg5 が副作用の少ない新たな抗がん剤の標的となり得ることを述べ、さらに、副作用を減少させる方法として光で Eg5 を制御することを提案した。光を用いた制御方法としてフォトクロミック分子の利用を挙げ、現在までにフォトクロミック分子が生体分子に応用された例についても触れた。

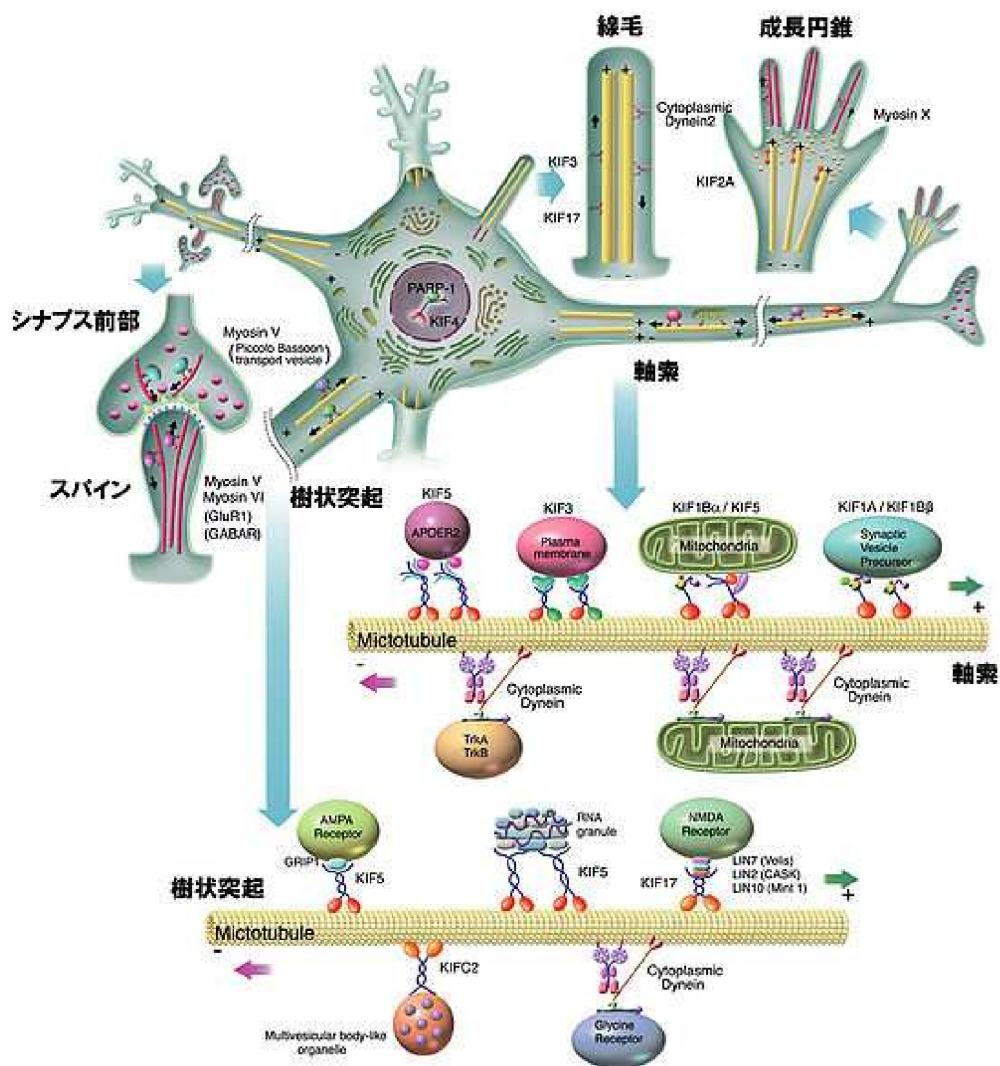
以上のことに基づいて、本論文では、有糸分裂キネシン Eg5 の光制御を目的とした研究を行った。Eg5 の構造的特徴である L5 と特異的阻害剤に注目し、それらに光制御スイッチであるフォトクロミック分子を導入し、Eg5 の光制御を試みた。



(Pearson Prentice Hall, Inc., 2005 一部改変)

図 1-1 キネシン

(A) 従来型キネシンの構造. モータードメイン, ストーク, テイルの3つの部位で構成される. (B) 外部刺激(ATP)によって、「動き」を生み出す生体分子機械キネシン. ATPを加水分解しながら微小管上を移動する.



(Hirokawa et al., 2010 改変)

図 1-2 生体内でのキネシンの働き

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 の輸送などの多くの重要な細胞機能を担っている

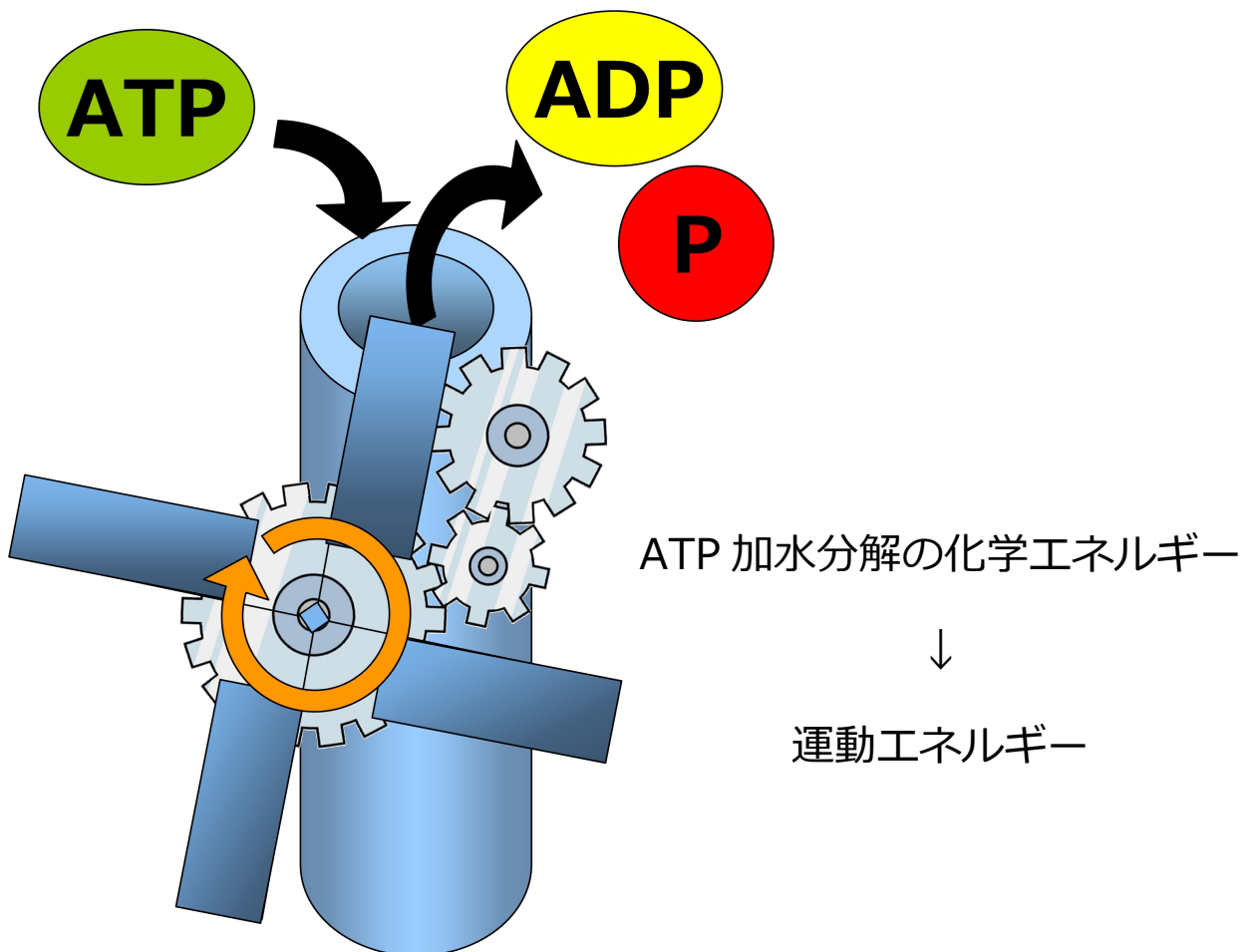
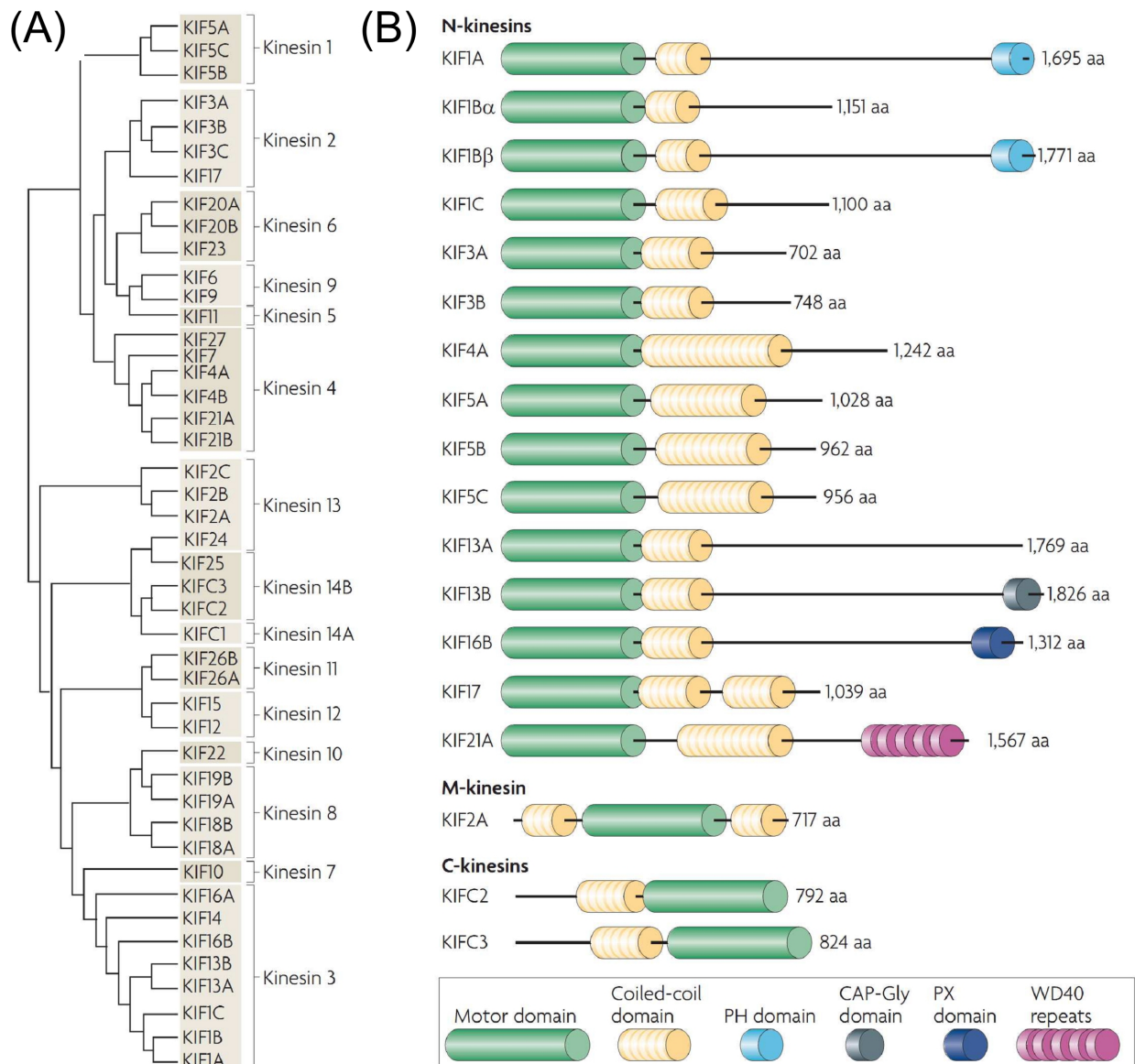


図 1-3 エネルギー変換分子機械キネシン

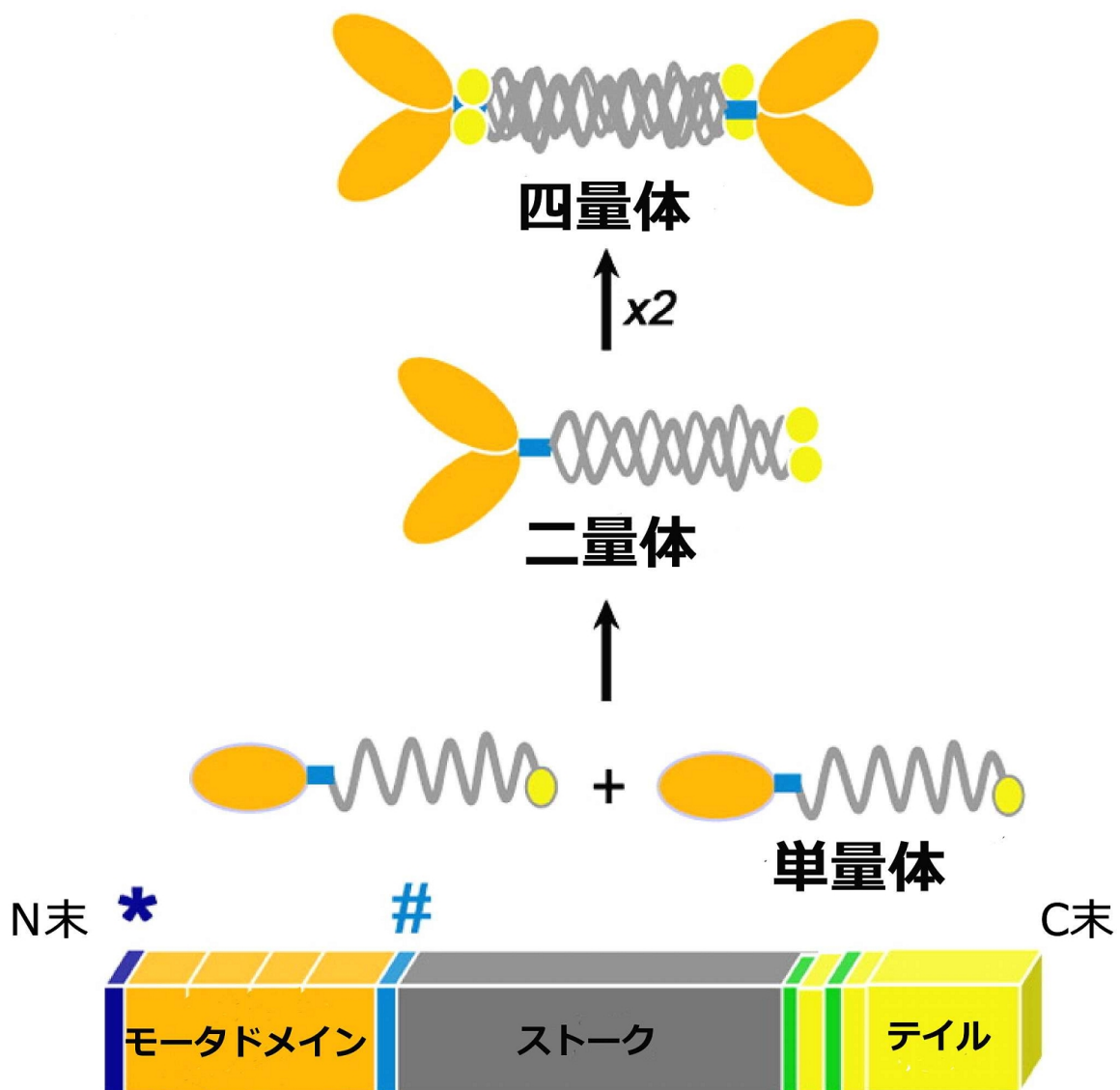
モータードメインに存在するヌクレオチド結合部位に、エネルギー源となる ATP が結合し、結合した ATP を ADP とリン酸に加水分解することにより得た化学エネルギーを、生体内を移動するための運動エネルギーへと変換する



(Hirokawa et al., 2009)

図 1-4 キネシンファミリー

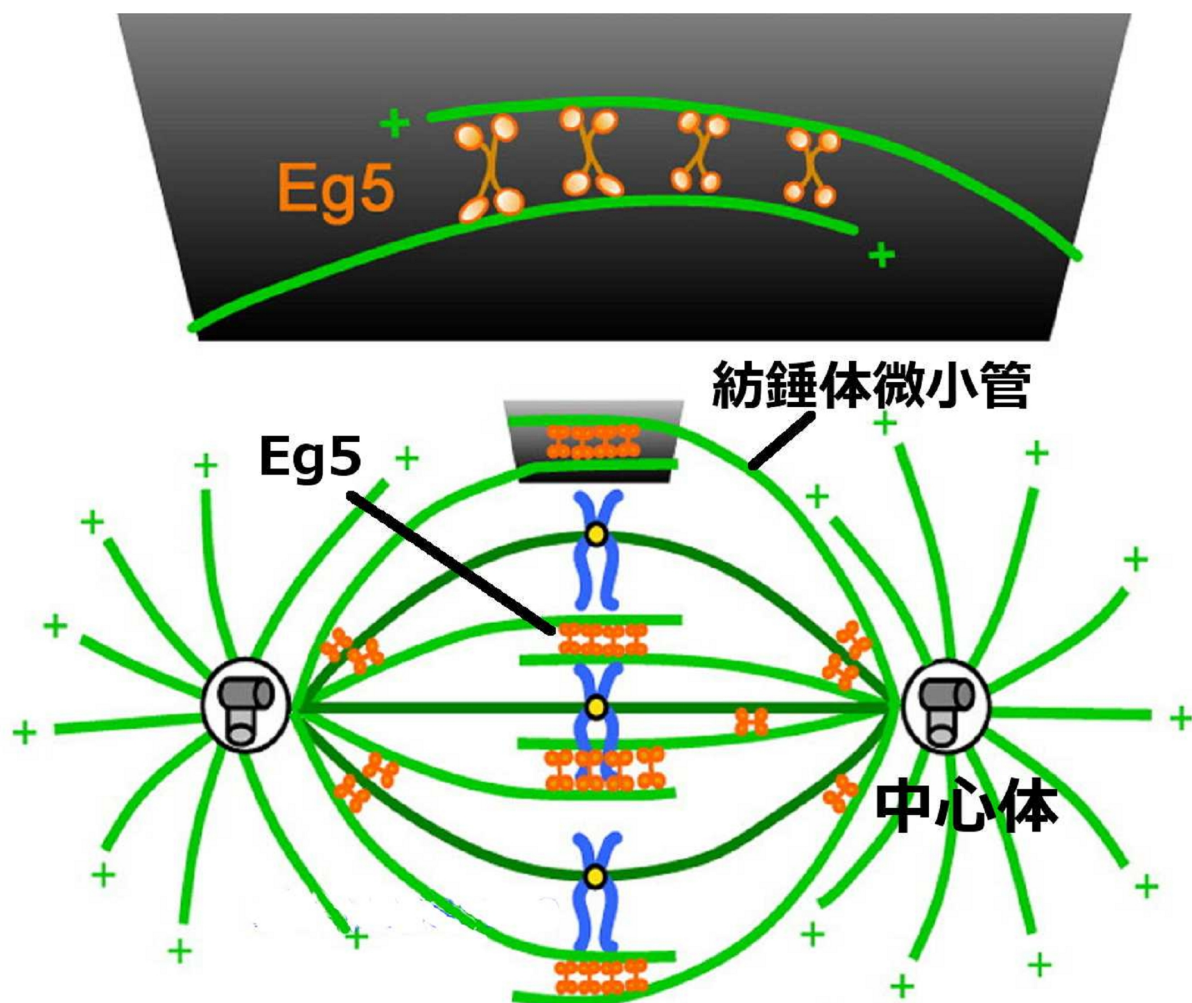
(A)キネシンは、モータードメインの系統解析によって 15 のサブファミリーに分類されている。(B)キネシンファミリーは、モータードメインの位置に応じて大きく 3 つに分類することができる。N-キネシンはN末端領域に、C-キネシンはC末端領域、M-キネシンは中央に、それぞれモータードメインを有している。



(Wojcik et al., 2013 一部改変)

図 1-5 有糸分裂キネシン Eg5 の構造

Eg5 はキネシン-5 ファミリーに属する N-キネシンで、2 つの逆平行になった 2 量体によって形成されたホモ四量体タンパク質である



(Wojcik et al., 2013 一部改変)

図 1-6 有糸分裂キネシン Eg5 の細胞内での役割

Eg5(オレンジ)は有糸分裂の際、逆平衡に並んだ微小管を架橋し、微小管のプラス端方向に動く力を利用して、架橋した微小管をスライドさせ、双極紡錘体形成を行う。

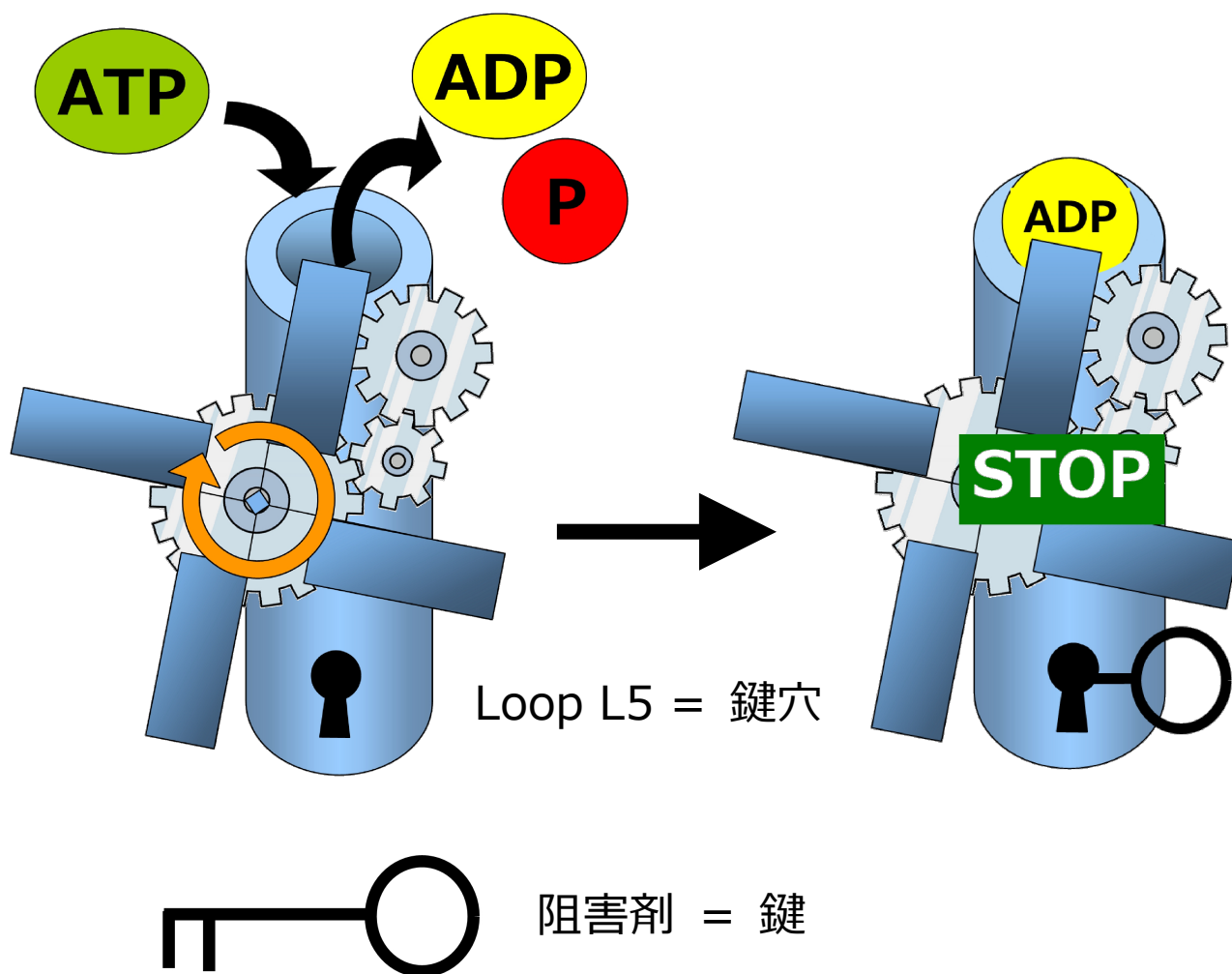
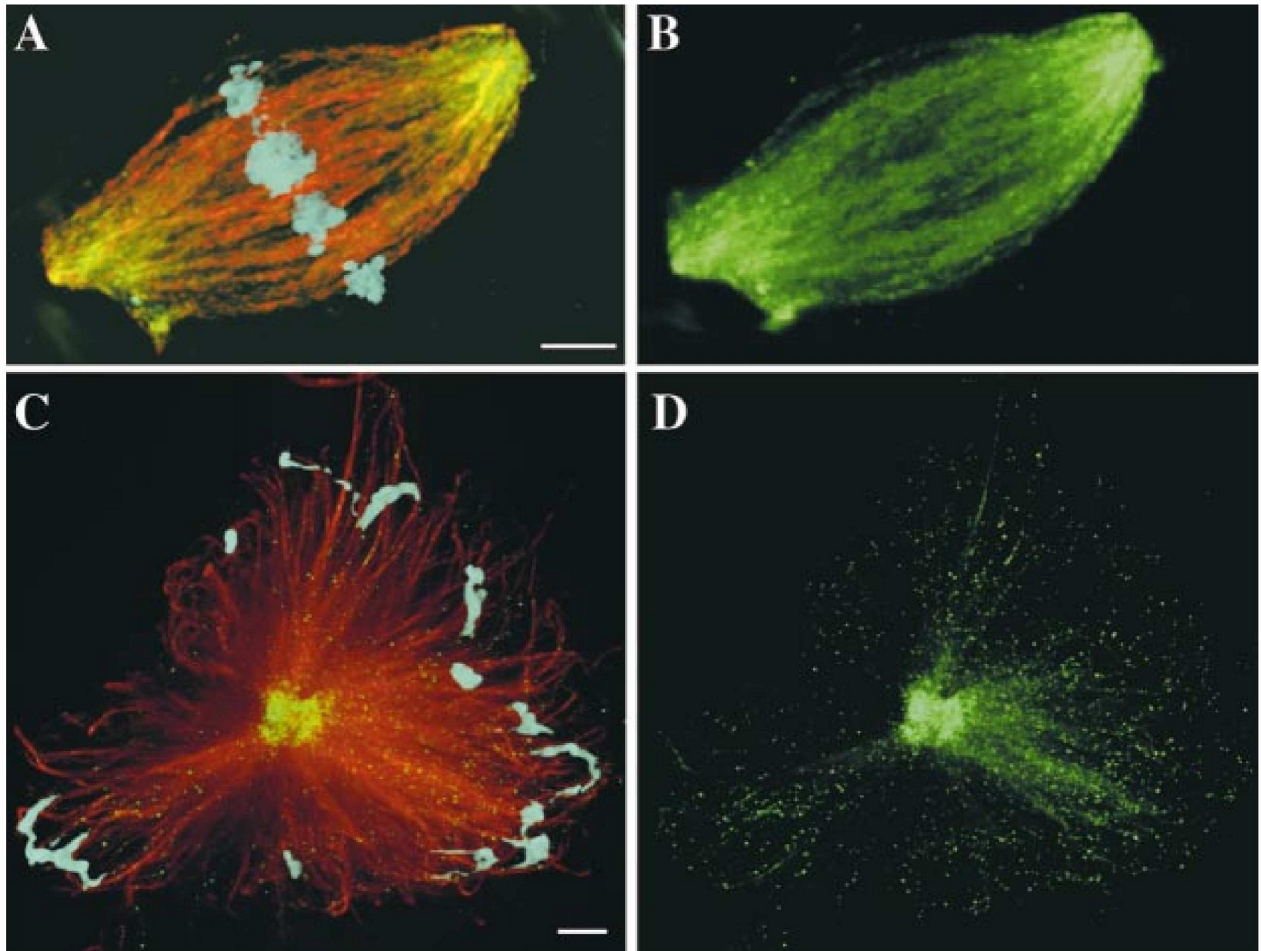


図 1-7 Eg5 の 2 つの特徴

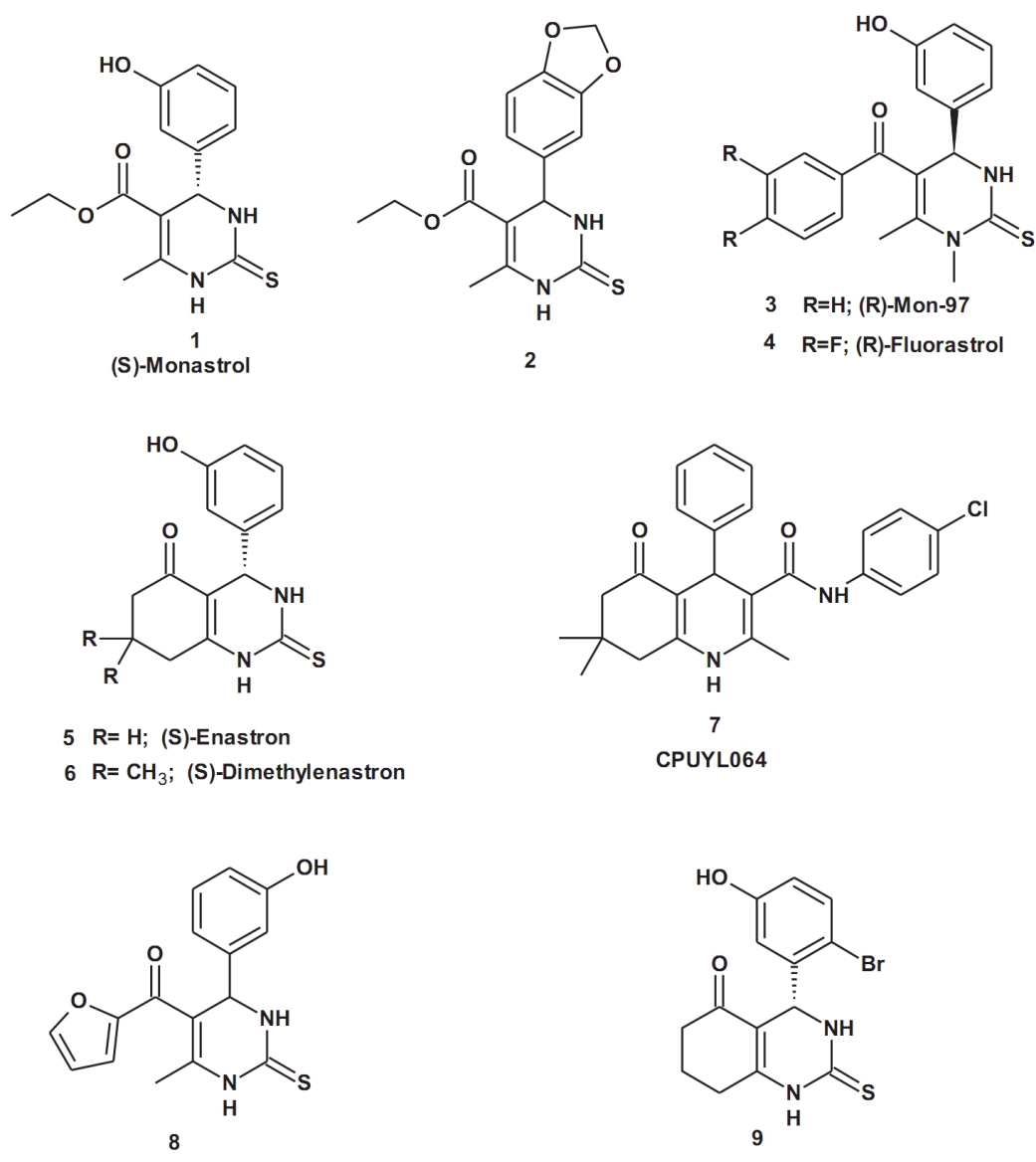
Eg5 には、ATP の加水分解サイクルを制御するための鍵(阻害剤)が存在し、その鍵を鍵穴(L5 を一部とする阻害剤結合ポケット)に差し込むことによって、ATP の加水分解サイクルを停止させることができる仕組みが存在する



(Kapoor et al., 2000)

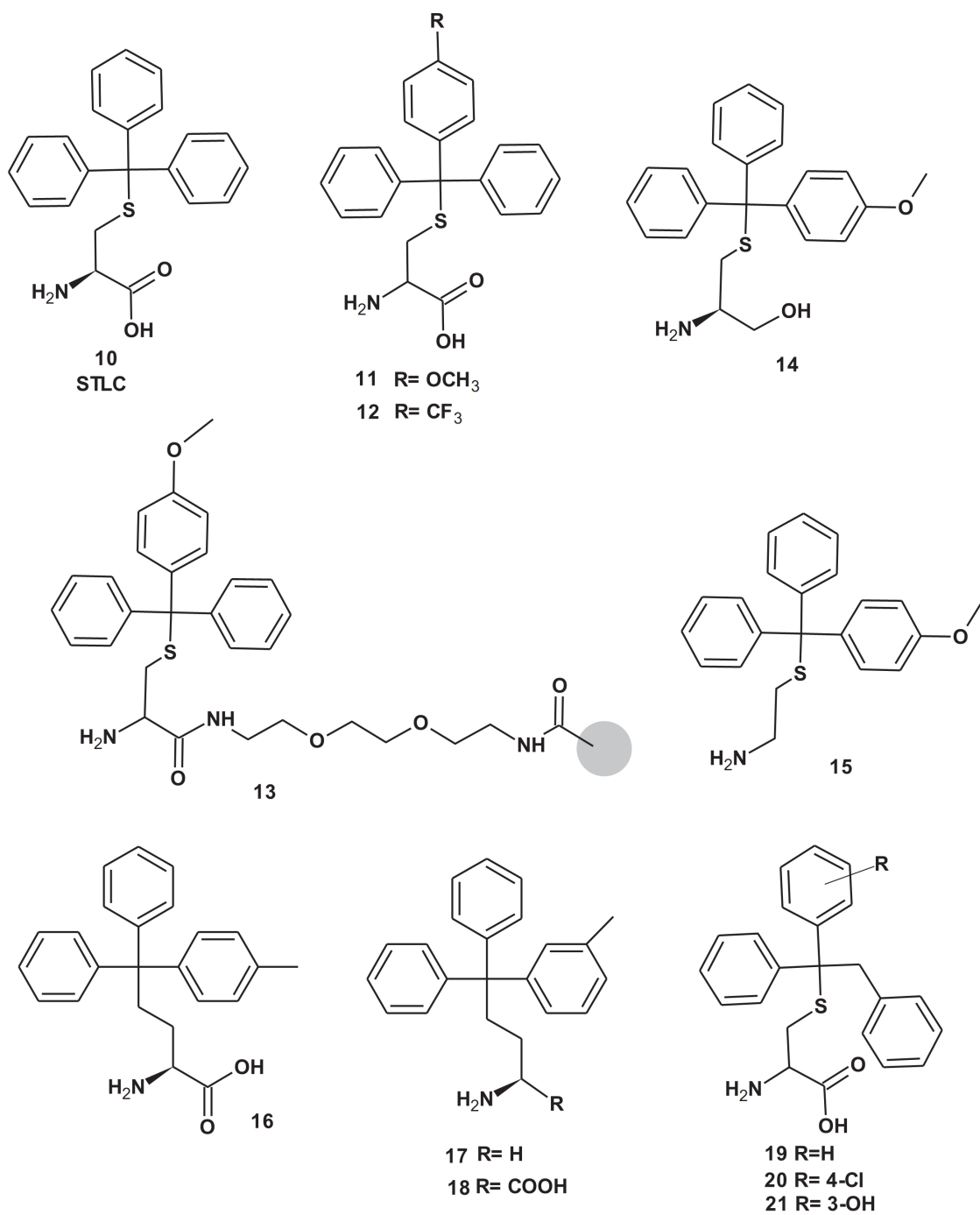
図 1-8 Eg5 阻害剤による単極紡錘体の形成

Eg5(緑)を阻害すると、中心体の分離や双極紡錘体の形成が妨げられ、単極紡錘体の形成が誘導される。クロマチンは青、チューブリンは赤で示している。(A,B)Eg5 阻害前, (C,D)Eg5 阻害後



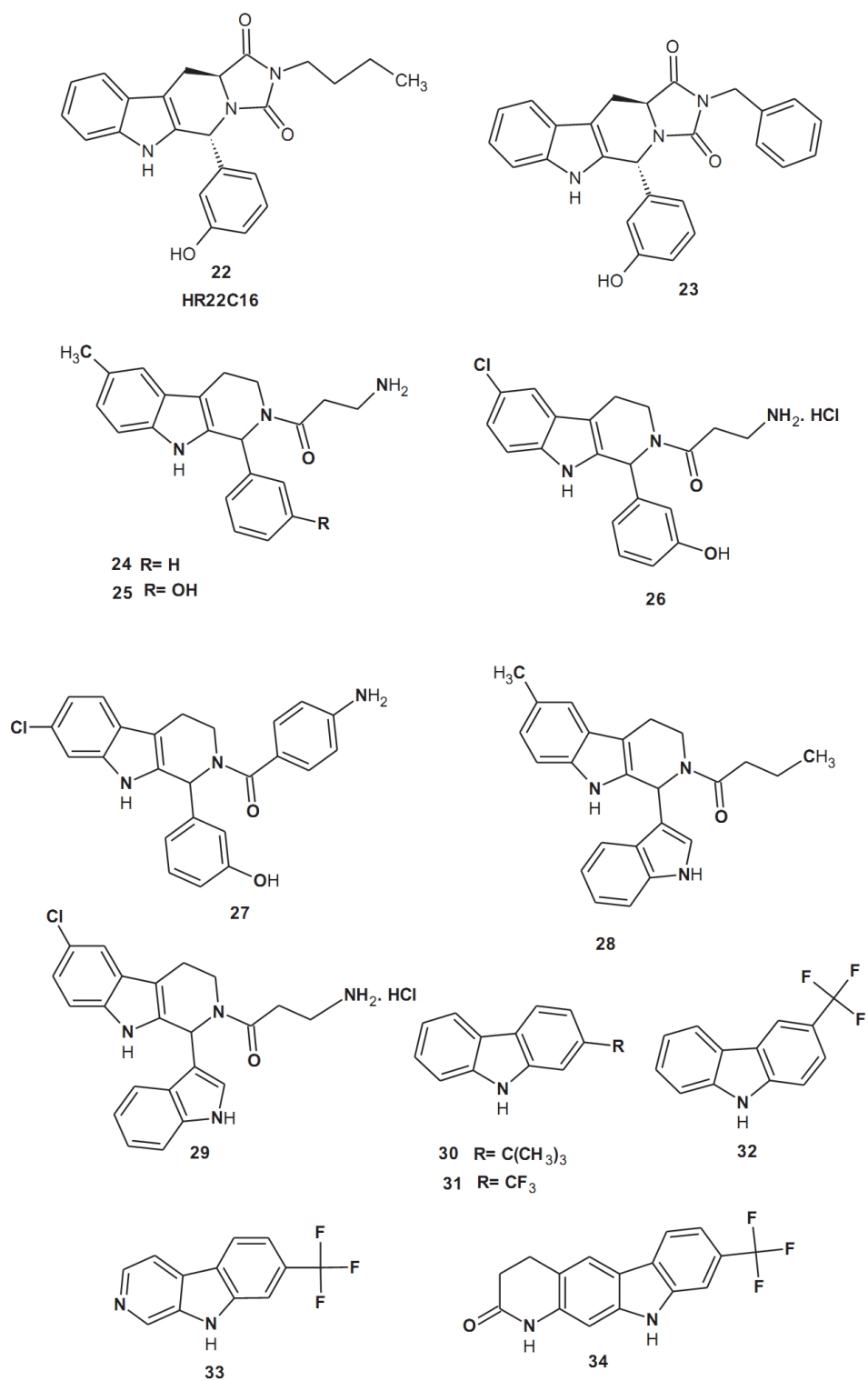
(Hala et al., 2013)

図 1-9 ジヒドロピリミジン誘導体の Eg5 阻害剤



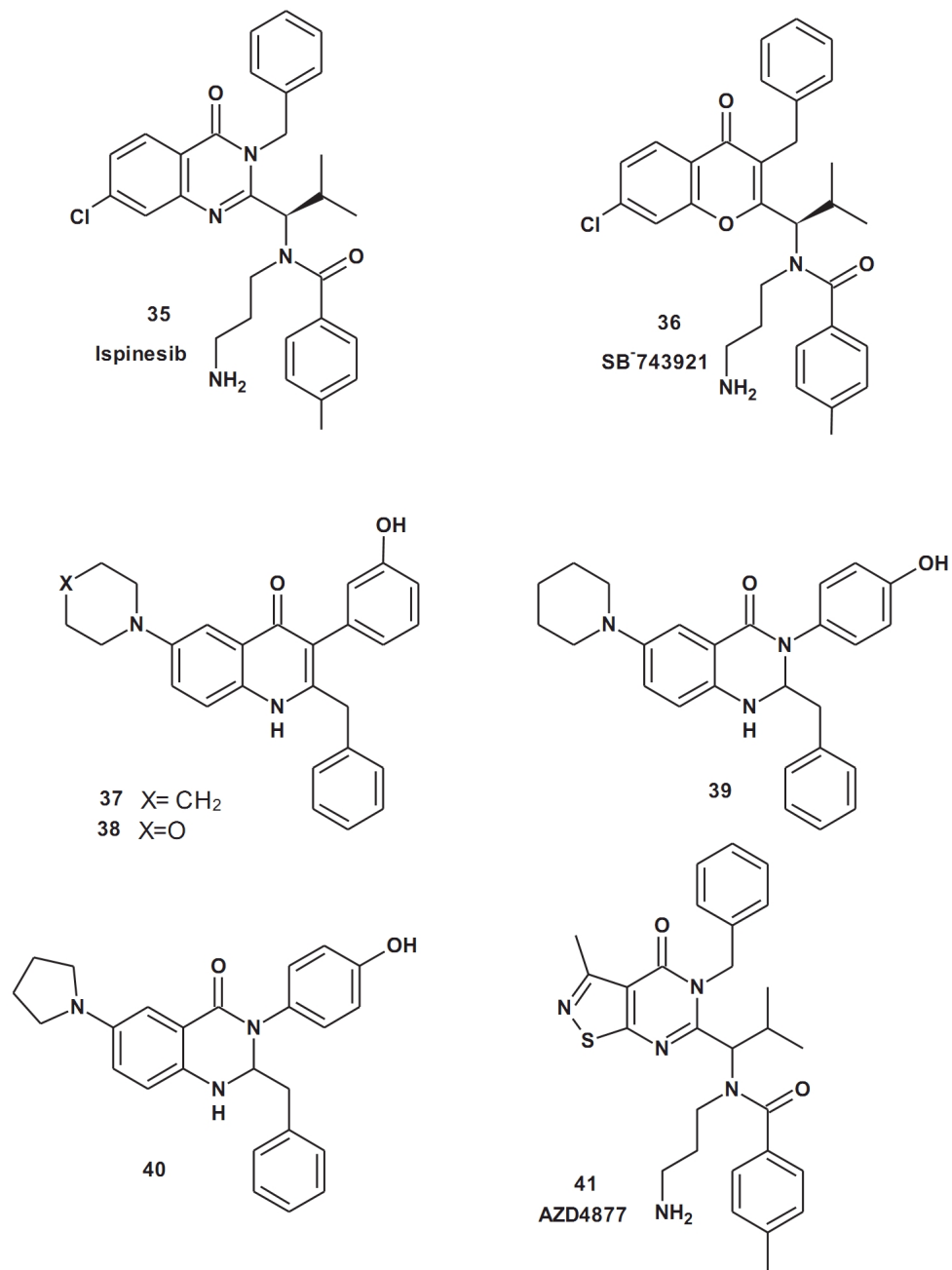
(Hala et al., 2013)

図 1-10 STLC 誘導体の Eg5 阻害剤



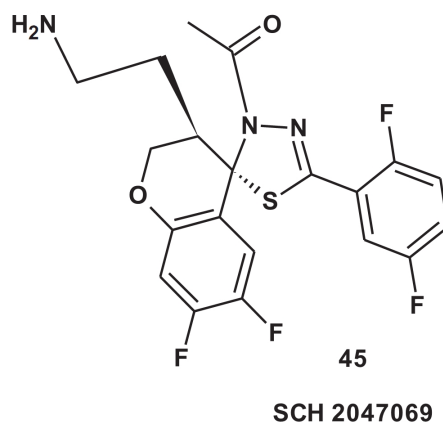
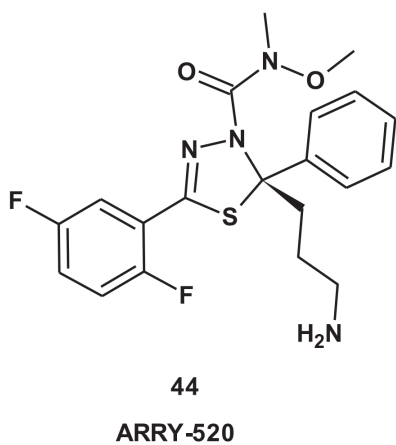
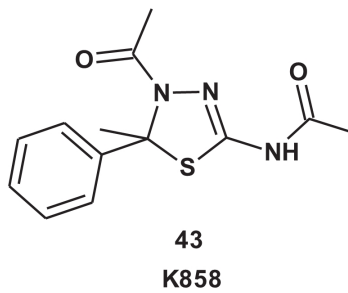
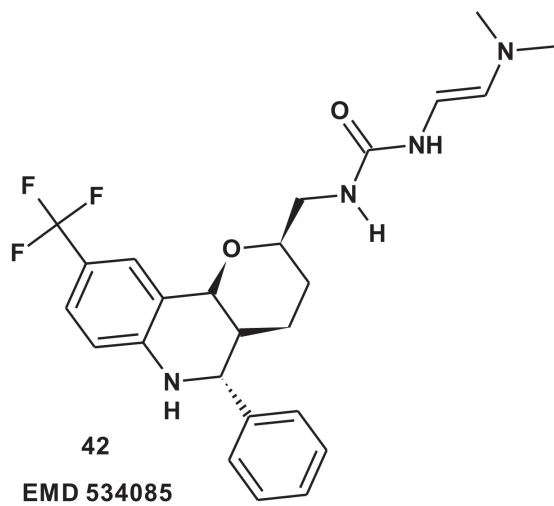
(Hala et al., 2013)

図 1-11 カルバゾール誘導体, カルボリン誘導体の Eg5 阻害剤



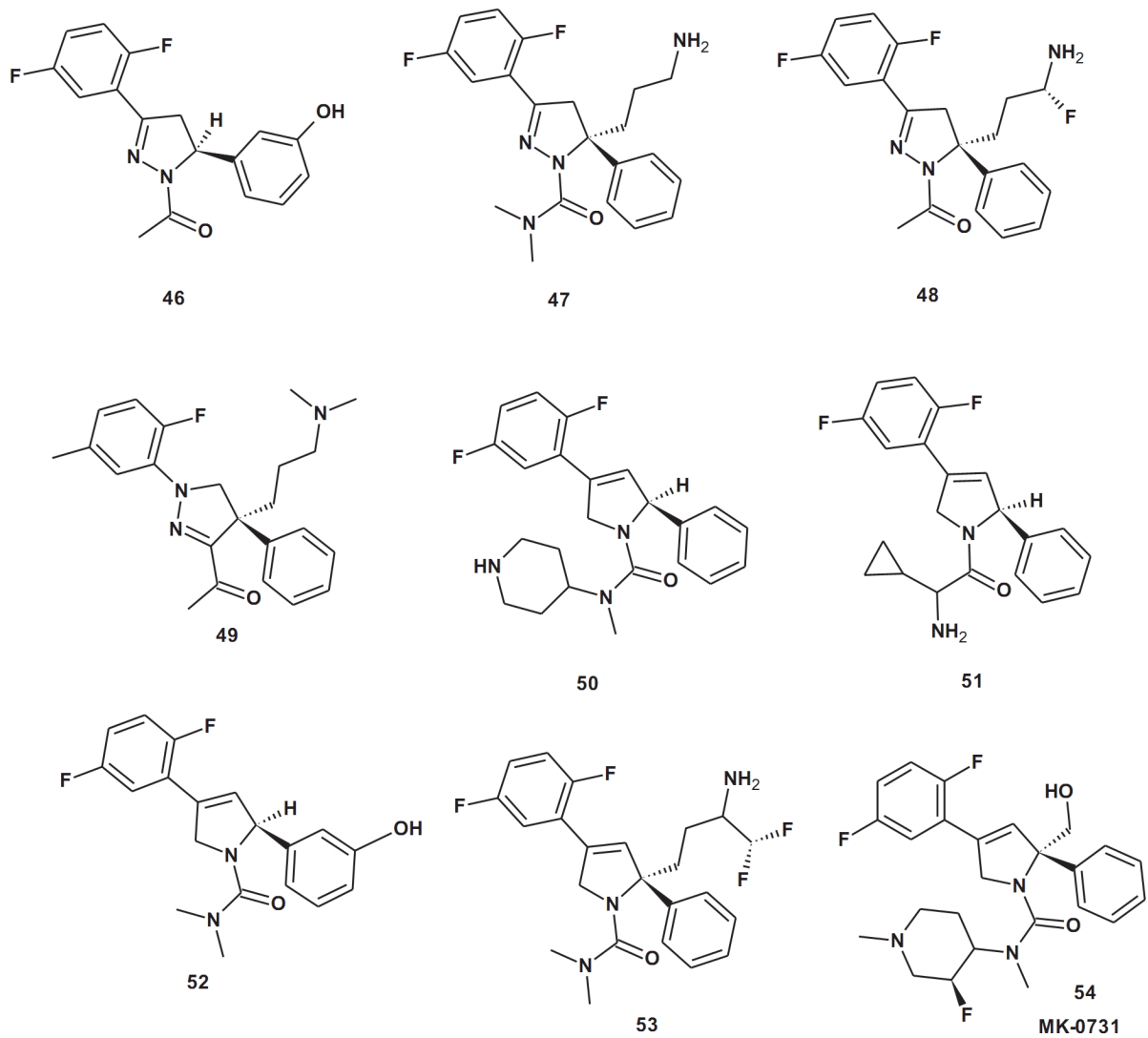
(Hala et al., 2013)

図 1-12 キナゾリン誘導体とチアゾロピリミジン誘導体の Eg5 阻害剤



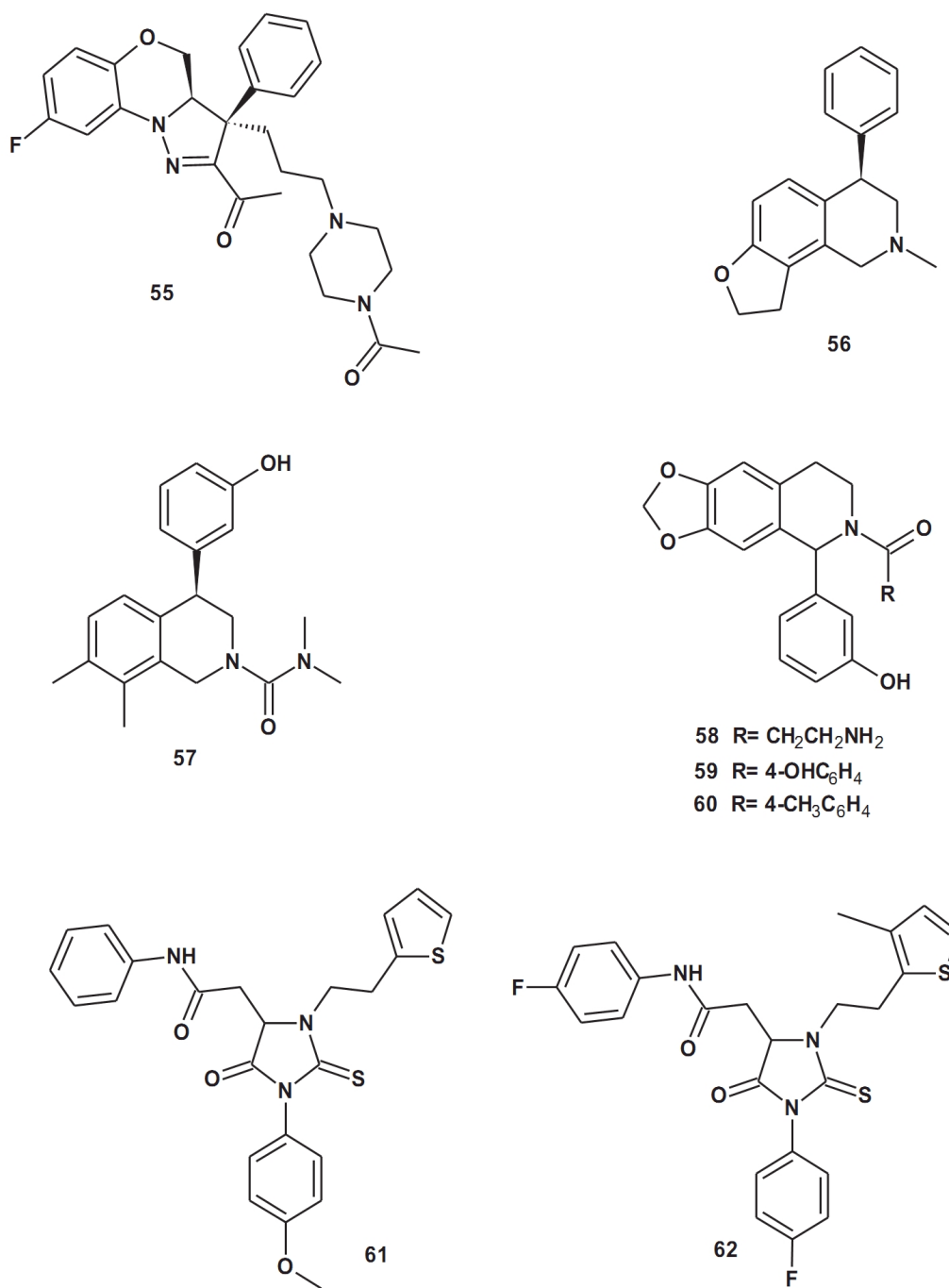
(Hala et al., 2013)

図 1-13 HHPQ 誘導体とチアジアゾール誘導体の Eg5 阻害剤



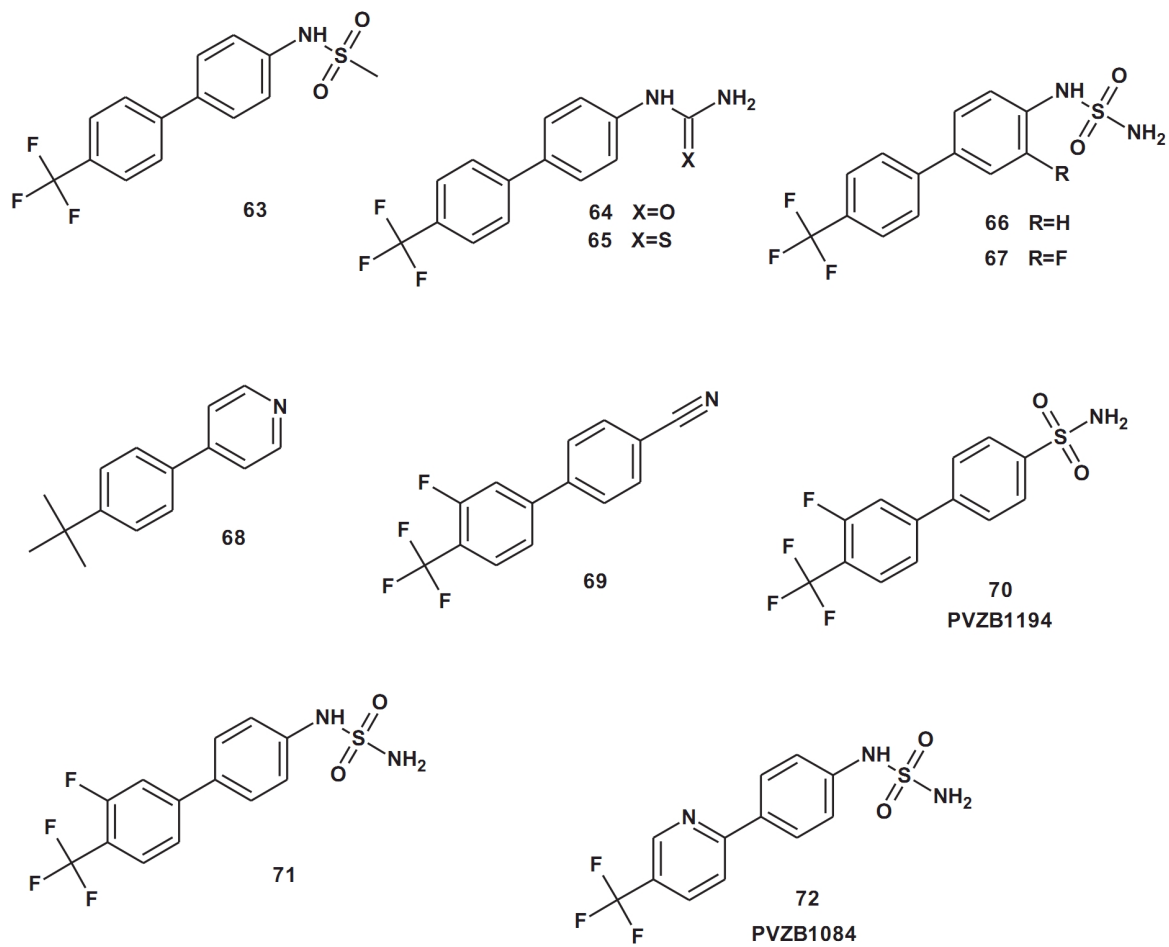
(Hala et al., 2013)

図 1-14 ピラゾール誘導体とピロール誘導体の Eg5 阻害剤



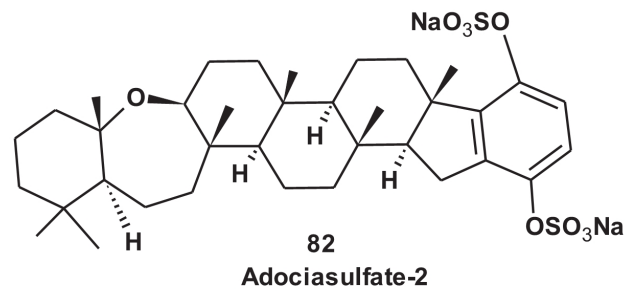
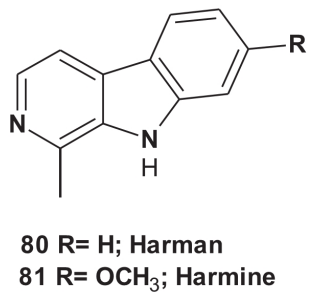
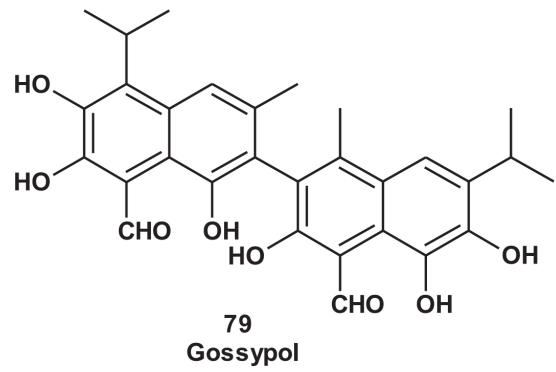
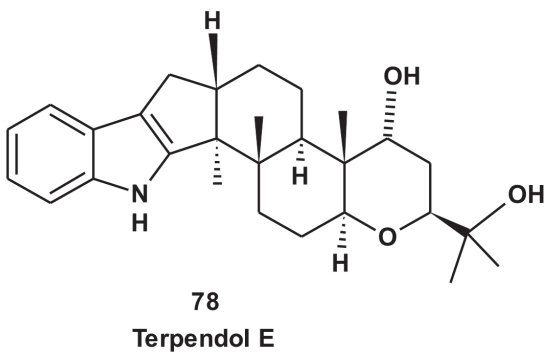
(Hala et al., 2013)

図 1-15 Pyrazolobenzoxazine, イソキノリンおよびイミダゾール誘導体の Eg5 阻害剤



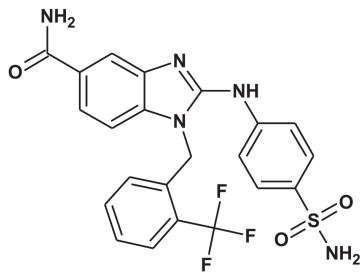
(Hala et al., 2013)

図 1-16 ビフェニル誘導体の Eg5 阻害剤

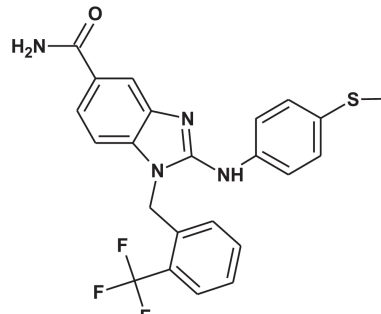


(Hala et al., 2013)

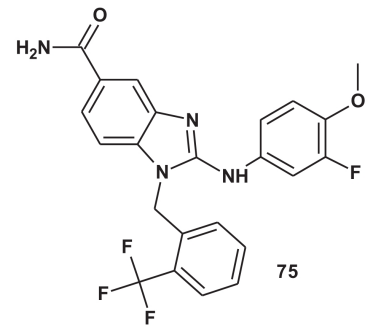
図 1-17 天然の Eg5 阻害剤



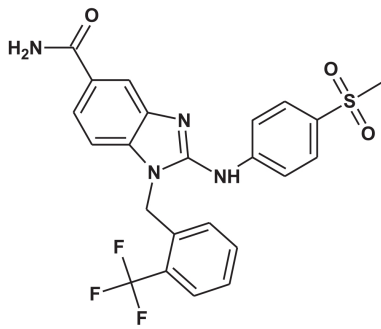
73



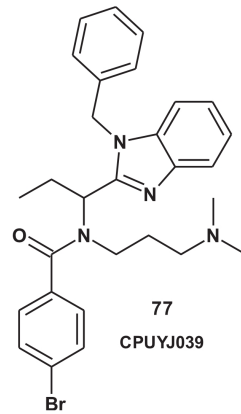
74



75



76

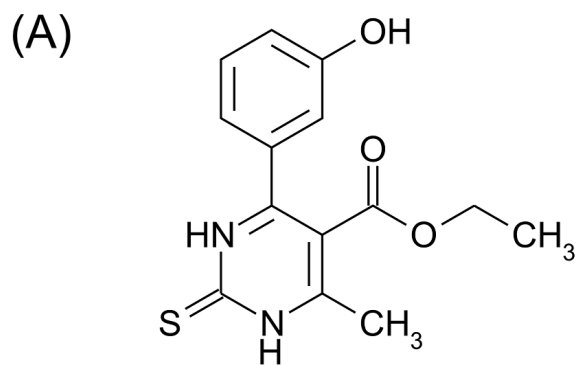


77

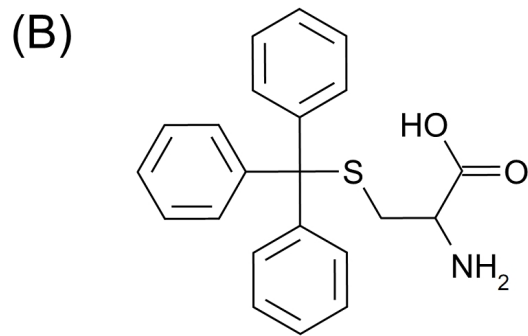
CPUYJ039

(Hala et al., 2013)

図 1-18 ベンゾイミダゾール誘導体の Eg5 阻害剤



monastrol



STLC

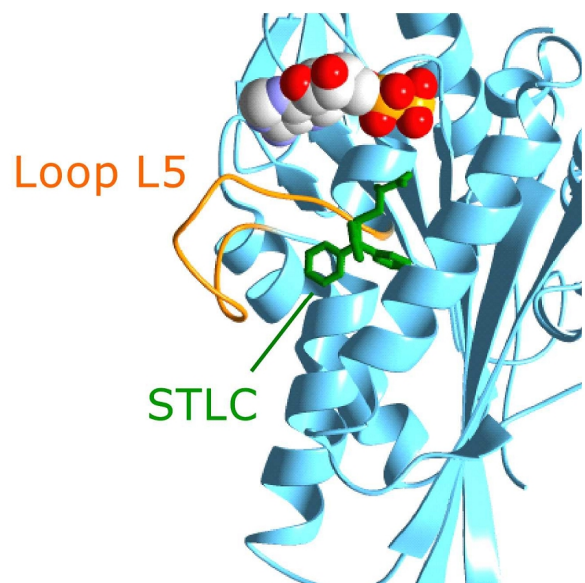
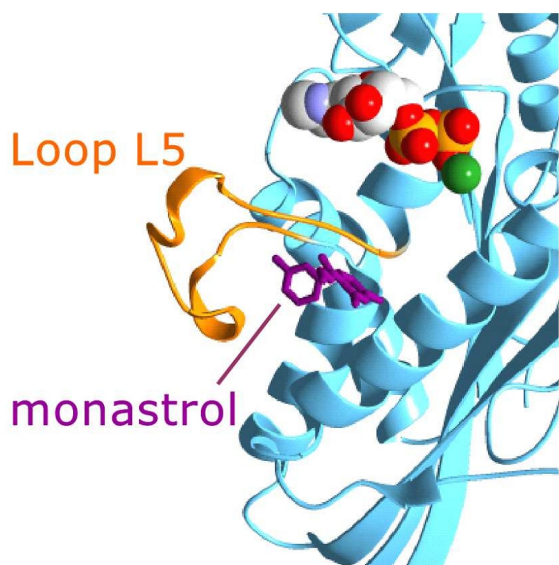


図 1-19 Eg5 阻害剤の構造式と L5 から成る阻害剤結合ポケット
 (A)monastrol[紫]も(B)STLC[緑]も L5[オレンジ]から成る阻害剤結合ポケットに結合する.
 Mg-ADP は space-filling model で示す.

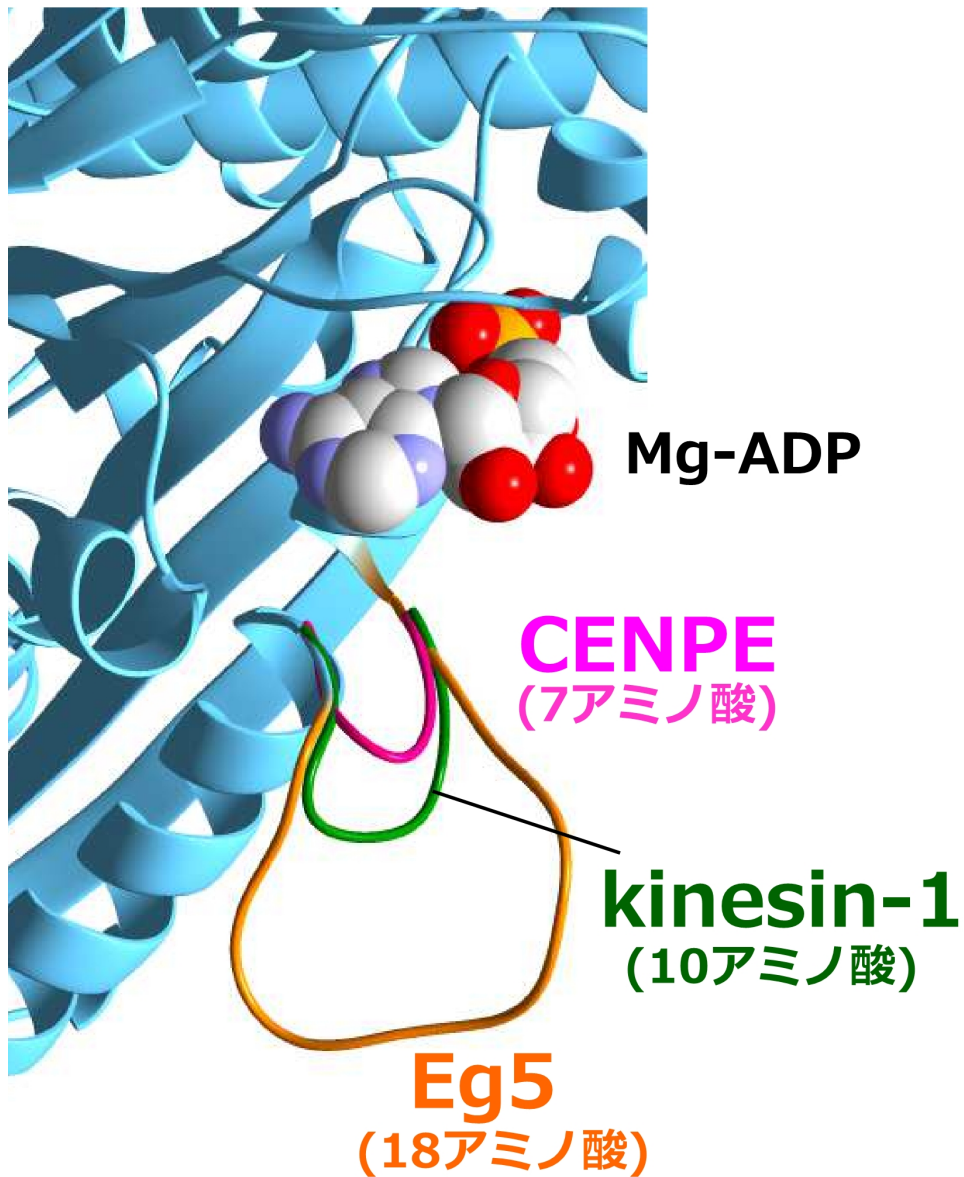


図 1-20 3 種のキネシンの L5 近傍の結晶構造

Eg5 の L5(オレンジ)は 18 アミノ酸残基から成る. kinesin-1(緑), CENPE(ピンク)の L5 はそれぞれ 10 アミノ酸残基, 7 アミノ酸残基から成る. 結晶構造(Eg5 [1H6], kinesin-1 [1BG2], CENPE [1T5C]) は, molecular graphics program Mol Feat を用いて作成した. Mg-ADP は space-filling model で示す.

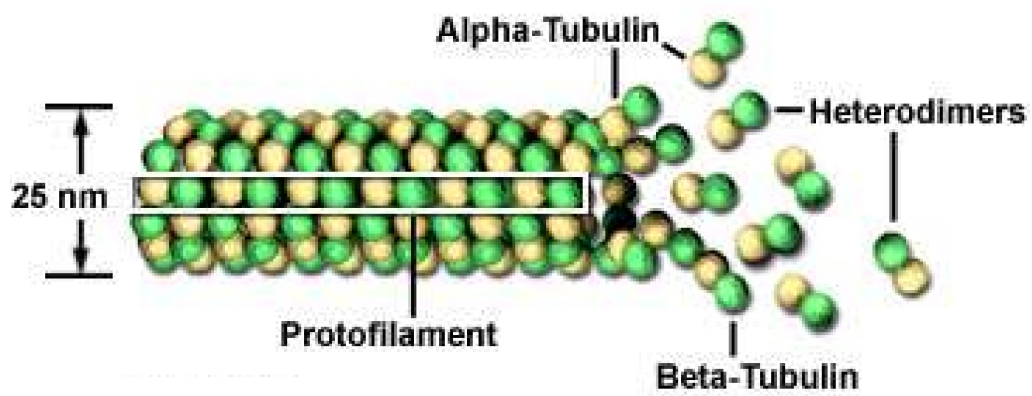
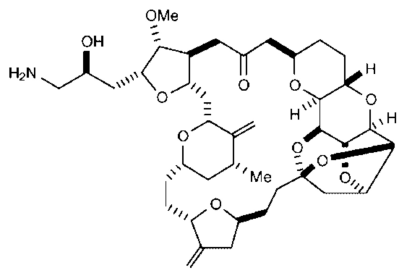
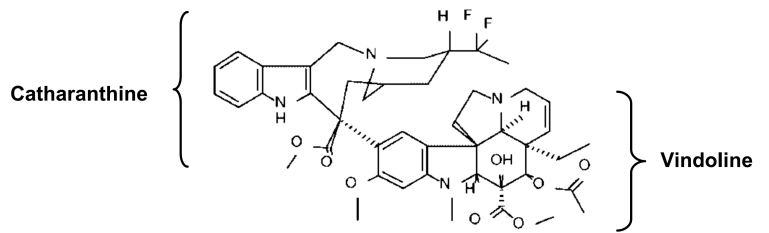


図 1-21 微小管の構造

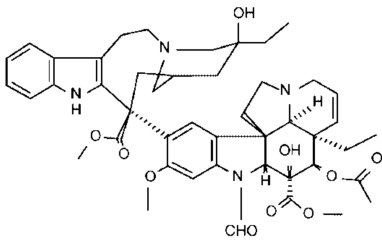
微小管は、 α チューブリン(黄)および β チューブリン(緑)から構成されるチューブリンヘテロ二量体を基本単位として構成されている。



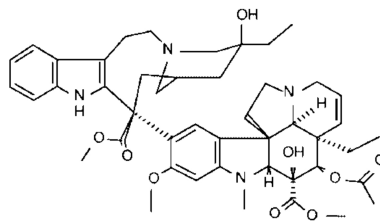
**Erubilin mesylate
(E7389)**



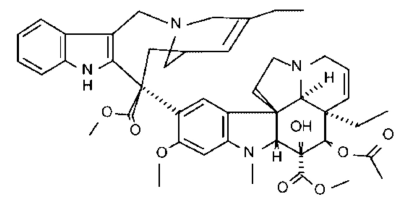
Vinflunine



Vincristine



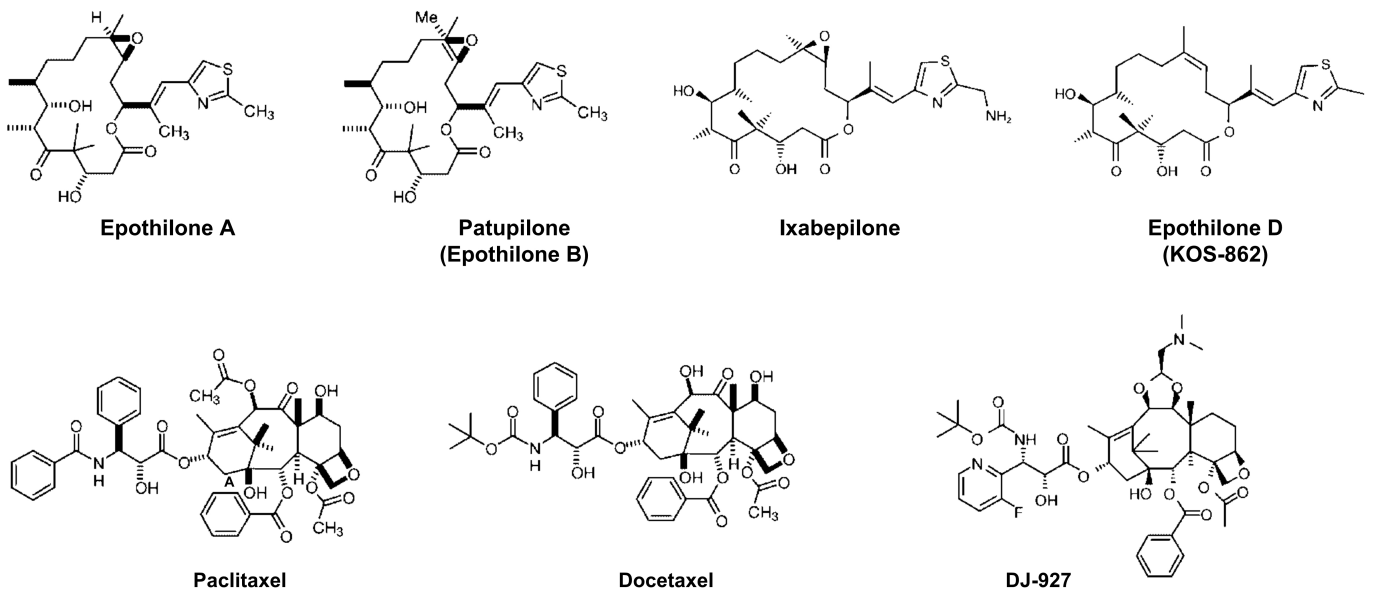
Vinblastine



Vinorelbine

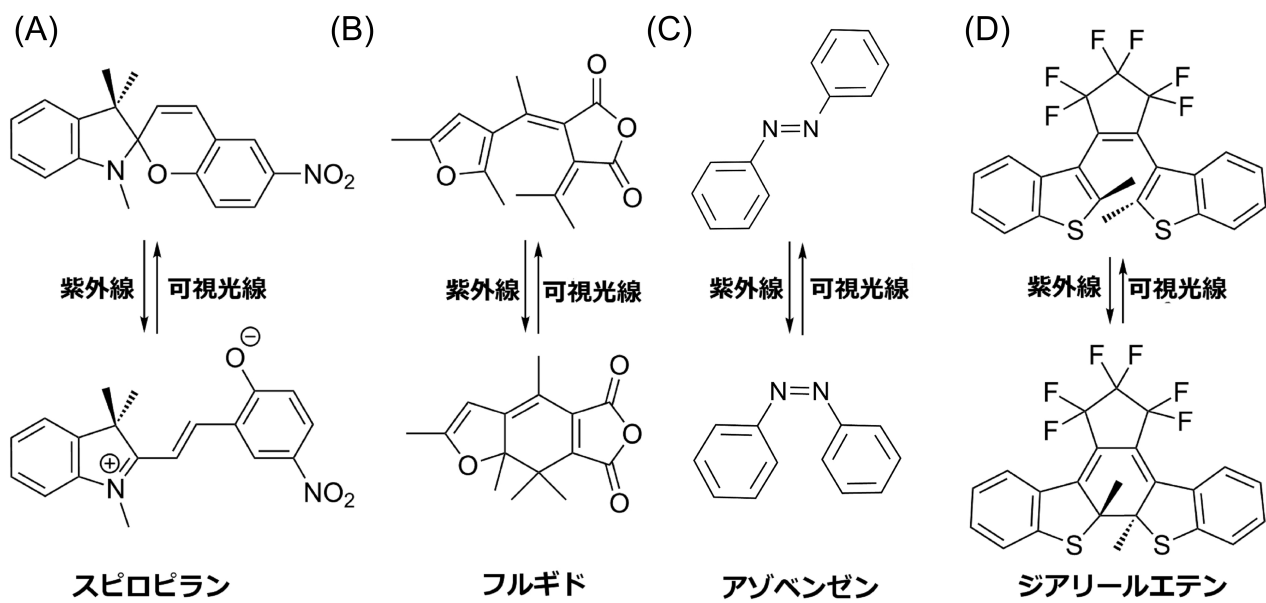
(Perez, 2009)

図 1-22 ビンカアルカロイド系の微小管阻害剤



(Perez, 2009)

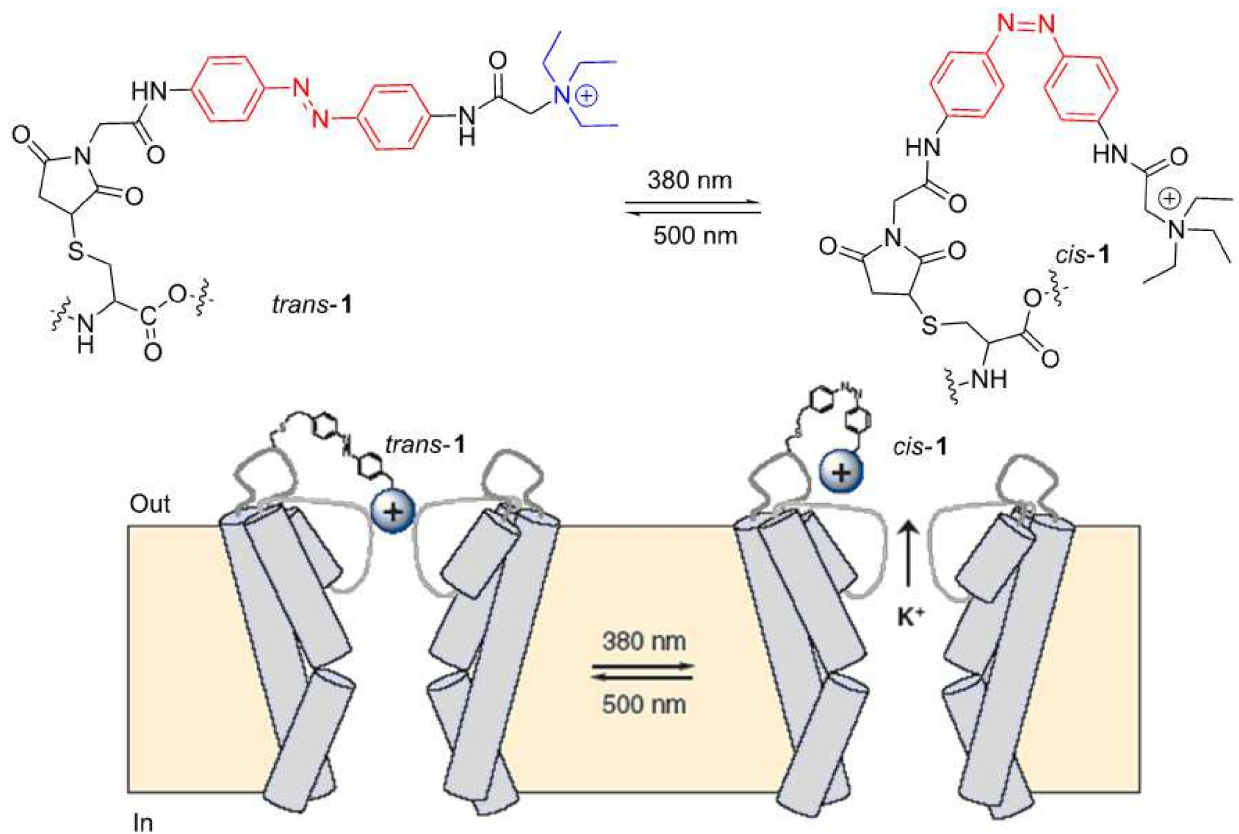
図 1-23 タキサン系の微小管阻害剤



(Garcia-Amoros and Velasco., 2012, 一部改変)

図 1-24 フォトクロミック分子の種類

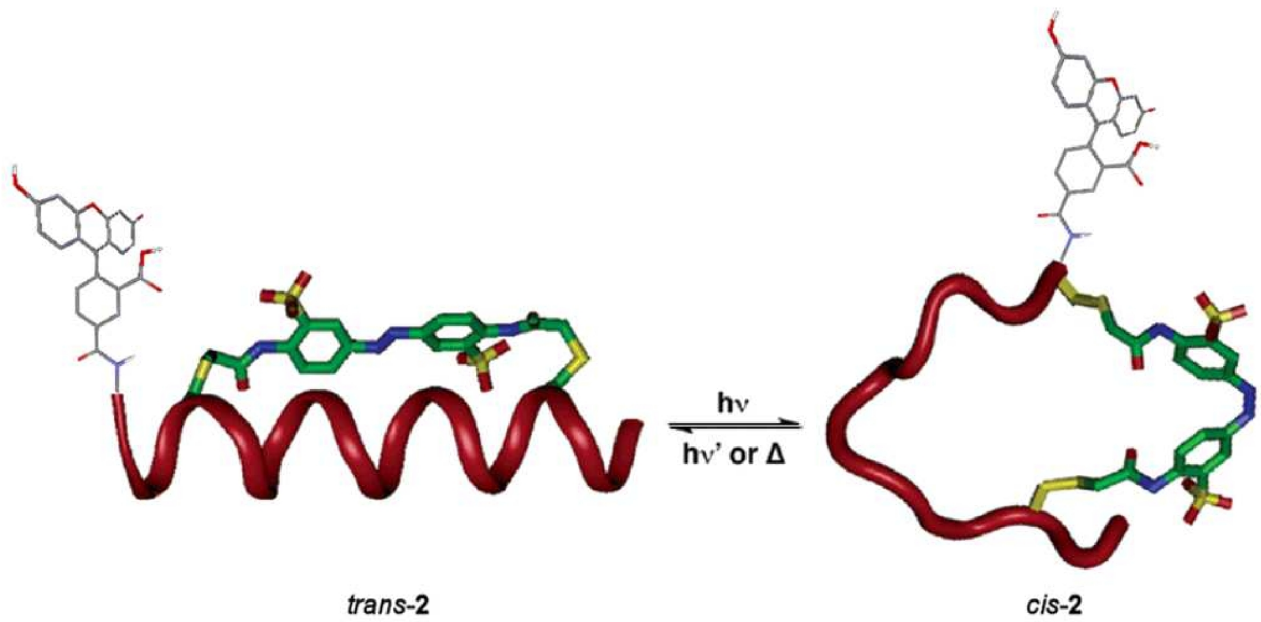
フォトクロミック分子は、光照射によって分子構造と性質が変化する化合物である。



(Banghart et al., 2004)

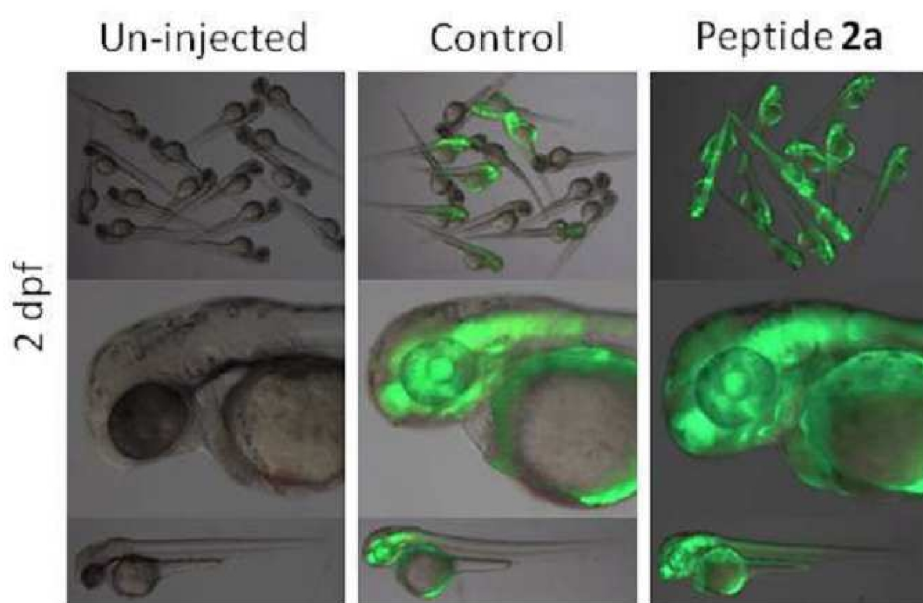
図 1-25 フォトクロミック分子を利用したイオン輸送の光制御

細胞膜中の細孔の開閉部分近傍に、フォトクロミック分子であるアゾベンゼンを導入し、可視光線照射によって、アゾベンゼンの一端が開閉部分に入り込み、イオンの輸送を阻害し、紫外線を照射すると開閉部分からアゾベンゼンが解離し、再びイオンが輸送される。



(Guerrero et al., 2005)

図 1-26 フォトクロミック分子を利用したコイルドコイルの光制御
 ペプチドをアゾベンゼンで架橋し, *trans* 体の時は正常な構造を保つが, 紫外線を照射して *cis* 体になると, アゾベンゼンの構造変化に伴い, ペプチドも構造変化し, α -ヘリックス構造を取れなくなる.



(Beharry et al., 2011)

図 1-27 フォトクロミック分子を利用した蛍光イメージング

表 1-1 Eg5 の機能と局在

Eg5 は、増殖性の組織で過剰発現している.

Organism	Protein abbreviation	Subcellular localization	Function	% Identity to human ortholog
<i>A. nidulans</i>	BimC	Not determined	Assembly of spindle microtubule array & separation of spindle pole bodies	54%
<i>D. discoideum</i>	Kif13	Not determined	Not essential for mitosis, but mutation slightly increases rate of spindle elongation	33%
<i>S. pombe</i>	Cut7	Near spindle pole bodies & spindle MTs	Assembly of mitotic spindle microtubule arrays	48%
<i>S. cerevisiae</i>	Kip1	Spindle MTs	Redundant with Cin8	36%
<i>S. cerevisiae</i>	Cin8	Spindle MTs	Separation of spindle pole bodies & assembly of spindle MTs	41%
<i>X. laevis</i>	Eg5-1	Meiotic spindle MTs	Bipolar spindle assembly in vitro at meiotic and mitotic extracts	89%
<i>C. elegans</i>	BMK-1	Spindle MTs	Not essential, but mutation results in reduced fecundity/meiotic defects	52%
<i>H. sapiens</i>	HsEg5	Spindle, poles	Mitotic centrosome separation and bipolar spindle assembly	100%
<i>D. melanogaster</i>	Klp61F	Mitotic spindle MTs	Mitotic centrosome separation and bipolar spindle assembly	60%
<i>M. musculus</i>	Kif11/Knsl1	Not determined	Essential in early mouse development	97%

(Wojcik et al., 2013)

表 1-2 Eg5 阻害剤の臨床試験段階

Target	Inhibitor	Clinical Phase	Number of patients	Cancer type	Administration, duration and schedule(s) evaluated	Clinical results/best responses	Adverse effects	Remarks ^a
EG5	Ispinesib	I	24	Recurrent or refractory solid tumours in children ¹	1 h IV; D1, 8, 15 Q28	3 patients with SD \geq 4 months; no objective tumour responses	Neutropenia	CYP3A4 inhibition; Ongoing phase II trial
	Ispinesib	I	30	Advanced solid tumours ²	1 h IV; D1, 8, 15 Q28	9 patients with SD \geq 6 months	Neutropenia	CYP3A4 inhibition
	Ispinesib in combination with docetaxel	I	24	Advanced solid tumours ³	1 h IV docetaxel followed by ispinesib; D1 Q21	7 patients with SD \geq 4.5 months; No confirmed CR or PR	Prolonged neutropenia	CYP3A4 inhibition
	Ispinesib	II	21	Recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck ⁴	1 h IV; D1 Q21	5 patients with SD \geq 3 cycles	Neutropenia and leukopenia	CYP3A4 inhibition; additional evaluation at dose and schedule not
	Ispinesib	II	21	Androgen-independent prostate cancer previously treated with taxanes ⁶	1 h IV; D1 Q21	No response in any of the patients	Neutropenia	CYP3A4 inhibition; EG5 expression is absent or very low in archival primary tumours ^b
	Ispinesib	II	20	Previously-treated advanced renal cancer ⁷	1 h IV; D1, 8, 15 Q28	6 patients with SD $>$ 2 cycles	Anemia, lymphopenia	CYP3A4 inhibition; No significant cytotoxic effects
	Ispinesib	II	15	Metastatic or recurrent ^c chemo-naïve hepatocellular carcinoma ⁸	1 h IV; D1 Q21	7 patients with SD with median duration of 3.9 months	Granulocytopenia, leukopenia	CYP3A4 inhibition; No correlation of EG5 staining with clinical outcome; No overall response
	SB-743921	I	44	Advanced solid tumours or relapsed/refractory lymphoma ⁹	1 h IV; D1 Q21	One PR; 6 patients with SD for $>$ 4 cycles	Dose-dependent neutropenia	No neuropathy observed; under continuing development
	AZD4877	I	43	Advanced solid tumours ¹⁰	1 h IV; D1, 8, 15 Q28	Detection of monoasters; 7 patients had SD \geq 12 weeks	Dose-related neutropenia	Limited clinical response, no further development planned
	AZD4877	I/II	39	Recurrent or refractory acute myeloid leukaemia ¹¹	1 h IV; D1 Q14; D1, 2, 3	Detection of monoasters;	Hyperbilirubinemia, stomatitis, palmar-plantar erythrodysesthesia	Limited clinical efficacy

(Rath and Kozielski., 2012)

第二章

L5 変異による キネシン Eg5 の生化学的性質への影響

2.1 本章の要旨

第二章では、キネシン Eg5 のもつキネシンスーパーファミリーの中で最も長いループ L5 に変異を入れ、Eg5 の生化学的性質にどのような影響を与えたのか述べる。L5 は、Eg5 の活性や機能に重要な部位であり、Eg5 特異的阻害剤は、L5 から成る阻害剤結合部位に結合し、Eg5 から ADP が解離するのを阻害することが知られている。この章では、18 残基から成る Eg5 の L5 の中から、活性や阻害剤の結合に関与していると考えられる 5 残基を選び、それら 5 残基をシステインに変異させる 1 アミノ酸置換を行った(E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C)。調製した 5 種類の変異体の生化学的性質がどのように変化したのかを、Eg5 WT と比較するために、変異体の ATPase 活性および STLC による阻害効果を調べた。E118C は Eg5 WT よりも約 1.7 倍高い ATPase 活性を示した。STLC による阻害効果は、変異部位により顕著な差が見られ、E116C, W127C, D130C で明らかな STLC 阻害効果の耐性が観察された。さらに第三章では、第二章で調製した 5 種類の変異体の L5 に光制御スイッチであるフォトクロミック分子を導入する実験を行った。フォトクロミック分子導入に際して、L5 にのみにシステインを有する Eg5 が必要であるため、前段階として、Eg5 のモータードメインに本来存在する4つのシステインを他のアミノ酸に変異した cysteine-light を調製した。これら 4 つのシステインのアミノ酸置換は Eg5 の活性および STLC による阻害効果に影響しないことを確認した上で、cysteine-light Eg5 を基に、L5 にのみシステインを有する5種類の変異体を調製し、L5 のアミノ酸置換が活性および STLC による阻害効果に及ぼす影響を明らかにした。

2.2 緒言

キネシンスーパーファミリーは、ATP 結合部位近くに L5 と呼ばれる保存されたループを有している。L5 の長さやアミノ酸組成は、キネシンスーパーファミリー間で異なっており、本研究で用いた Eg5 はキネシンスーパーファミリーの中で最も長い L5 を有していることが知られている (Behnke-Parks et al., 2011; Turner et al., 2001) (図 1-20)。L5 の重要性は、L5 の1アミノ酸置換による Eg5 の ATP や微小管との親和性および阻害剤の阻害活性の変化(Behnke-Parks et al., 2011;

Kim et al., 2010; Tcherniuk et al., 2010)や、スピン標識した ADP を用いることにより観察された L5 のネックリンカードッキングへの関与(Larson et al., 2010)などから示されてきた。また、第一章で述べたように、Eg5 には特異的阻害剤が多数存在し、それら阻害剤は、ヌクレオチド結合部位近傍の L5、 $\alpha 2$ 及び $\alpha 3$ で構成されたポケットに結合することが知られている(Brier et al., 2006; Kim et al., 2010)。阻害剤が結合することにより、L5 は大きく構造を変化させ(図 2-1)、結合した阻害剤は、L5 の特定のアミノ酸と相互作用しながら、阻害剤結合部位に入り込む(図 2-2)。このように L5 は、Eg5 の活性や機能に重要な部位である。結晶構造解析から阻害剤 STLC が阻害剤結合部位に結合する際に、相互作用する L5 上のアミノ酸が明らかになっているため、それらのアミノ酸をアミノ酸置換し、Eg5 の生化学的性質への影響を調べた。具体的には、変異体の ATPase 活性および STLC による阻害効果を調べ、Eg5 WT と比較した。また、第三章では、L5 にフォトクロミック分子を導入することにより、人工的に Eg5 の機能を制御することを試みた。L5 にフォトクロミック分子を導入する際、L5 にのみ単一のシステインを有する Eg5 が必要であるため、本来 Eg5 のモータードメインに存在する 4 つのシステインを他のアミノ酸に置換し、cysteine-light Eg5 を調製した。4 つのシステインは、L5 のような機能部位ではない位置に存在しているため(図 2-3, 2-4)、機能部位ではない部分のアミノ酸置換が Eg5 の生化学的性質へ影響するかどうかを、機能部位である L5 のアミノ酸置換の結果と合わせて報告する。

2.3 実験材料と方法

2.3.1 試薬

試薬類は特にことわりのない限り、和光純薬工業(株)の試薬特級を使用した。オリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジー株式会社を利用して合成したものを使用した。制限酵素およびその他の酵素は東洋紡株式会社またはタカラバイオ株式会社のものを使用した。pET21a ベクターおよび大腸菌 BL21(DE3)株は Novagen 社 (Medison, WI) のものを使用した。

2.3.2 Eg5 モータードメイン wild-type の調製法

マウス cDNA ライブラリーを鋳型として，N 末端側プライマー (5'-GGAATTCATGGCGTCCCAGCCGAGTTCTTTGAAGAAG-3')，C 末端側プライマー (5'-CGCCTCGAGGAGGTTTATGGAGGTGTGAAGCGGCAGTC-3')を用いて，PCR を行い，Eg5 のモータードメインから，ストーク，テイル部分を含む DNA 断片(アミノ酸残基 1-1052)を増幅させた．PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動をし，目的のバンドを切り出し，DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE)を用いて精製した．得られた Eg5 cDNA と大腸菌発現用ベクター pET21a を制限酵素 EcoRI と XhoI で一晩制限酵素処理をした．制限酵素処理をした溶液を全量アガロースゲルで電気泳動をして，目的のバンドを切り出し DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) でそれぞれの DNA 断片を溶出，回収した．回収した Eg5 cDNA と大腸菌発現用ベクター pET21a を 15°C，2 時間の条件でライゲーションした．ライゲーション溶液を大腸菌 DH5α に導入し，目的の DNA 断片が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌株を得た．アルカリ法により，目的の DNA 断片が挿入されたプラスミドを精製した．このプラスミドを基に，Eg5 のモータードメイン部分のみのプラスミドを調製した．N 末端側プライマー (5'-CACCACCACCACCACC ACTGAGATCCGGC-3')，C 末端側プライマー (5'-TTTTTGATTA ACTTCAGGCTTATTCATTATG -3')を用いて，PCR を行い，Eg5 のモータードメイン部分の DNA 断片(アミノ酸残基 1-367)を増幅させた．PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動をし，目的のバンドを切り出し，DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE)を用いて溶出，回収した．回収した DNA 断片を 15°C，2 時間の条件でセルフライゲーションさせ，アルカリ法により，目的の DNA 断片が挿入されたプラスミドを精製した．これをもって，キネシン Eg5 単量体プラスミドの完成とした．以降，キネシン Eg5 単量体プラスミドを Eg5 の野生型(WT)とする．

2.3.3 Eg5 cysteine-light の調製法

キネシン Eg5 はもともとモータードメインに 4 つのシステインを有している(図 2-3, 2-4)．本研究では，チオール基反応性フォトクロミック分子を用いて，タンパク質に存在するシステインにフォトクロ

ミック分子を修飾させる手法を扱う。したがって、フォトクロミック分子を修飾させたい位置以外に存在するシステインを無くす必要があるため、まず、システインを有していない Eg5 モータードメイン (cysteine-light) を調製した。Peter らの方法に従って、25 番目のシステインをバリン、43 番目のシステインをセリン、87 番目のシステインをアラニン、99 番目のシステインをアラニンに変異し、Eg5 cysteine-light にした (Rosenfeld et al., 2005)。それぞれ、変異をかけるプライマーを以下のものを使用した。

25 番目のシステインをバリン

N 末端側プライマー (5'-AGACCATTTAATCTGGCAGAGCGGAAAGC-3')

C 末端側プライマー (5'-AACTCTCACCACCACCTGGATGTTCTGCC-3')

43 番目のシステインをセリン

N 末端側プライマー (5'-CGACCATGCACGGAAAGAAGTCAGTGTACG-3')

C 末端側プライマー (5'-GATTCCACTACTGAGTGGGCATTAGCTTTC-3')

87 番目のシステインをアラニン

N 末端側プライマー (5'-GCTCCAATTCTAGATGAAGTTATTATGGGC-3')

C 末端側プライマー (5'-AACAACTTCGGTAAACATCAATTTG-3')

99 番目のシステインをアラニン

N 末端側プライマー (5'-TACCATCTTCGCATATGGTCAGACTGGCAC-3')

C 末端側プライマー (5'-GCATTATAGCCCATAATAACTTCATCTAG-3')

PCR 後の操作は、Eg5 WT プラスミドの調製方法と同様である。プラスミド調製後、オペロンバイオテクノロジー株式会社に依頼して、シーケンス解析を行い、変異の確認を行った。

2.3.4 Eg5 変異体の調製法

調製した Eg5 cysteine-light のプラスミドを基に、フォトクロミック分子導入部位である L5 に単一のシステインを有した Eg5 変異体を調製した。Eg5 の 18 残基から成る L5 の中から 5 残基を選び、それら 5 残基をシステインに変異し、計 5 種類の変異体 (E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C)

を調製した(図 2-6). L5 にシステインを導入するプライマーは以下のものを使用した.

E116C

N 末端側プライマー(5'-GGTGAAAGGTCACCTAATGAAGTATATAACC-3')

C 末端側プライマー(5'-GCACATTGTAAAAGTTTTCCAGTGCCAGT-3')

E118C

N 末端側プライマー(5'-TGCAGGTCACCTAATGAAGTATATAACCTGG-3')

C 末端側プライマー(5'-ACCTTCCATTGTAAAAGTTTTCCAGTGCC-3')

Y125C

N 末端側プライマー(5'-TGCACCTGGGAGGAGGATCCTCTGGCTGG-3')

C 末端側プライマー(5'-TACTTCATTAGGTGACCTTTCACCTTCC-3')

W127C

N 末端側プライマー(5'-GCGAGGAGGATCCTCTGGCTGGTATAATTC-3')

C 末端側プライマー(5'-AGGTATATACTTCATTAGGTGACCTTTCAC-3')

D130C

N 末端側プライマー(5'-TGCCCTCTGGCTGGTATAATTCCACGCACT-3')

C 末端側プライマー(5'-CTCCTCCCAGGTATATACTTCATTAGGTGA-3')

PCR 後の操作は, Eg5 WT プラスミドの調製方法と同様である. プラスミド調製後, オペロンバイオテクノロジー株式会社に依頼して, シーケンス解析を行い, 変異の確認を行った.

2.3.5 Eg5 の発現, 精製法

Eg5 WT も変異体も同様の操作により, 発現, 精製を行った. まず, 得られたプラスミドをタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) にトランスフォーメーションし, 37°C で一晩培養した. 少量培養でタンパク質の発現確認のできたコロニーを, L-broth 100mL (100mg/mL のアンピシリン入り) に植菌し, 37°C で一晩培養した. 2L の三角フラスコに対して L-broth 1L (100mg/mL のアンピシリン入り) を準備し, 一晩前培養した培養液を 10 mL 加え, 37°C で振盪培養した. OD₆₀₀ = 約 0.7 に

なったら final 0.1mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside を加え、タンパク質発現誘導を行い、17-18 時間 20°C で振盪培養した。その後、高速遠心(5000 \times g, 15 min, 4°C (No. 30 rotor, Hitachi Himac CR22G))を行い、目的タンパク質を含んだ大腸菌を集菌し、沈殿を 10mL HEM buffer (110 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.2, 1 mM MgCl₂, 1 mM *O,O'*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid [EGTA], and 25 mM NaCl) で懸濁し、-80°C で保存した。

以下、タンパク質の精製はすべて 4°C で行った。-80°C で保存しておいた菌体を解凍し、高速遠心 (4,700 \times g , 10min, 4°C) で集菌した。沈殿を 15 mL of lysis buffer (20 mM 3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) pH 7.0, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/mL leupeptin, 2 μ g/mL aprotinin, and 2 μ g/mL pepstatin A) で懸濁し、懸濁した菌体を Ultra S homogenizer (VP-30S, Taitec, Saitama, Japan) で超音波破碎した(30 秒超音波破碎後, 30 秒氷上を合計 5 回 (micro tip limit 5- 6, duty cycle 50%)). 超音波破碎した菌体は、超遠心し(200,000 \times g, 4°C, 1 h (70 Ti rotor, Beckman Coulter, CA, USA Optima XL-90 ultracentrifuge)), 目的タンパク質の含まれた上澄みを回収した。タンパク質は Co-NTA column (Talon® Metal Affinity Resin, Takara, Shiga, Japan) を用いて精製した。pet21a ベクターに組み込まれた目的 DNA は、C 末端に His タグを有したタンパク質として発現されるので、コバルトイオンを配位結合した Co-NTA column を利用して精製することができる。

まず、Co-NTA column を lysis buffer (300 mM NaCl, 20 mM MOPS (pH7.0), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, 0.2 mM β -mercaptoethanol) で平衡化する。lysis buffer で平衡化した Co-NTA column に、目的タンパク質の含まれた上澄みをアプライし、His タグ融合タンパク質とコバルトイオンと十分に結合させる。カラムに結合させた後、イミダゾールを添加し、His タグをコバルトイオンから解離させ、His タグ融合タンパク質を溶出させる。まず、30 mM imidazole を含む lysis buffer で非特異的にカラムに結合したタンパク質を溶出させ、取り除いた。その後、150 mM imidazole を含む lysis buffer で目的のタンパク質を溶出させた。溶出液を SDS-PAGE 電気泳動し、目的タンパク質(42.1 kDa)が溶出されているか確認した(図 2-5)。確認後、透析 buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 120

mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, and 0.5 mM DTT)中で一晩透析した。透析後、凍結防止剤として最終濃度 10%になるように滅菌グリセロールを加え、液体窒素で急速凍結し -80 °C に保存した。

2.3.6 微小管調製法

チューブリンは, Hackey らの手法(Hackney, 1988)によって豚脳から精製した。微小管に重合する際は, チューブリンに PEM buffer (100 mM Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) [PIPES], pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, and 1 mM GTP)を加え, 37°C で 30 分間インキュベートして重合した。重合反応は 10 μM の タキソールを加えて停止させ, 超遠心(280,000 × g, 15 min, 37°C (Hitachi Himac CS 120GX))を行って重合したチューブリン(微小管)を沈殿させた。沈殿した微小管は MT buffer (100mM PIPES pH 6.8, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 1mM GTP, and 10 mM taxol)で懸濁, 回収した。使用直前まで 37°C で保存した。

2.3.6 ATPase 活性測定法

キネシン 1 分子が 1 秒間に加水分解した ATP の濃度(ATPase 活性)を測定した。微小管存在下での活性測定は, 反応開始前に, 0.1 μM の Eg5 を 3 μM の微小管と ATPase assay buffer (20 mM HEPES pH 7.2, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid [EDTA], 0.1 mM EGTA, and 1 mM β-mercaptoethanol)中で室温で 5 分間インキュベートした。ATP の加水分解は, 2 mM ATP を加えることにより開始し, 10% trichloroacetic acid を加えて停止した。キネシンによって加水分解された ATP の濃度は, 加水分解によって放出された遊離リン酸の濃度を Youngburg 法により定量した(Youngburg and Youngburg, 1930)。STLC による阻害効果の測定は, 0-50 μM の STLC と 3 μM の微小管を ATPase assay buffer 中で室温で 5 分インキュベートしたあと, 0.1 μM の Eg5 を加えてから反応を開始した。

2.4 結果と考察

2.4.1 Eg5 wild-type, cysteine-light および変異体の調製

Eg5 WT がもともと有している4つのシステインは、図 2-3, 2-4 に示すように、アミノ酸残基の 25, 43, 87, 99 番目に位置している。25 番目, 43 番目のシステインは β 1 に, 87 番目のシステインは α 1, 99 番目のシステインは β 3 にそれぞれ存在している。これら4つのシステインを実験方法に記載した通り, それぞれ別のアミノ酸に置換し, WT にシステインが存在しない cysteine-light の Eg5 を調製した。調製した cysteine-light Eg5 の ATPase 活性を測定したところ, Eg5 WT と同程度の活性を示した(図 2-7)。また, Eg5 阻害剤の1つである STLC を 0-50 μ M の濃度で加え, STLC 濃度依存的阻害効果を調べた。図 2-8 に示すように, cysteine-light は WT と同程度の STLC による阻害効果を示した。これらの結果から, 今回変異した4つのシステインは Eg5 の ATPase 活性, および STLC の阻害効果には影響を及ぼさない部位であると考えられる。結晶構造からも, 4つのシステインは, 阻害剤結合部位から離れた位置のそれぞれ存在していることが確認でき, 変異により, 阻害効果に影響しなかったと考えられる。このことから, 変異やフォトクロミック分子導入によって, 活性や阻害効果を制御するためには, 活性や阻害剤の結合に直接関与している部位を選択する必要があると考えられる。したがって, Eg5 の機能部位である L5 の変異およびフォトクロミック分子導入は, Eg5 を制御できる可能性を示唆している。また, この cysteine-light Eg5 を基に L5 にのみ単一のシステインを有する変異体を調製したが, 調製した変異体で観察された, 活性や STLC による阻害効果の変化は, もともと有している4つのシステイン変異による影響ではなく, L5 のアミノ酸変異による影響が観察できることになる。

2.4.2 Eg5 の ATPase 活性測定

Eg5 cysteine-light を基に, フォトクロミック分子導入部位である L5 に単一のシステインを有した Eg5 変異体を調製した。Eg5 の 18 残基から成る L5 の中から 5 残基を選び, それらのアミノ酸をシ

ステインに置換した、5種類の変異体(E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C)を調製した(図 2-6). これら5残基は、ATPase 活性や STLC の結合に関与していると考えられている部位であり、変異やフォトクロミック分子導入により、活性が変化すると期待できるため選んだ。Eg5 に STLC が結合した結晶構造解析により、STLC のトリチル基が、L5 の E116, G117, E118, W127, D130 によって形成されたポケットに収まることがわかっている(図 2-2, Abualhasan et al., 2012). 図 2-1 に示すように、STLC が結合することにより、L5 は大きく構造を変化させる。特に、W127 は STLC を覆うようにして Eg5 側に近づき、W127 のインドール環は STLC のフェニル環と相互作用することが分かっている(Kaan et al., 2009). したがって、W127 とその近傍に位置する芳香族アミノ酸である Y125 を変異部位の候補にした。また、過去の研究で、E116, E118, D130, A133 の変異が、Eg5 の ATPase 活性と STLC による阻害効果に影響を与えることが示された(Kim et al., 2010). さらに、U2OS 細胞における D130 の変異は STLC の阻害効果に耐性をもつという報告がある(Tcherniuk et al., 2010). したがって、D130 は変異、そしてフォトクロミック分子導入によって大きな活性および阻害効果の変化が観察できると考えられる重要なアミノ酸残基である。

cysteine-light と同様に、調製した5種類の変異体の ATPase 活性と STLC 濃度依存的阻害効果を調べた。図 2-7 に示すように、E118C は WT に比べて約 1.7 倍高い活性を示したが、他の変異体は WT と同程度の活性を示した。STLC 濃度依存的阻害効果を調べたところ、興味深いことに、3種類の変異体 E116C, W127C, D130C は STLC による阻害作用を著しく妨げた(図 2-8). 一方、Y125C は WT と同程度 STLC によって強く阻害された。これらの結果から、E118 は Eg5 の ATPase 活性に関与している残基であること、そして E116C, W127C, D130 が STLC と相互作用する主要なアミノ酸残基であることが示唆された。

STLC に阻害耐性を示した要因を明らかにするために、STLC が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造比較した。E116 は STLC が阻害剤結合ポケットに結合すると、R221 と塩橋を形成すると考えられる(図 2-9). また、W127 は、阻害剤が結合すると $\alpha 3$ 上の Y211 と疎水性相互作用し(図 2-10, Kaan et al., 2009), D130 側鎖は、L5 の構造を安定させるために R119, S120, L132 と相互作用する(図 2-11,12,13, Indorato et al., 2013). したがって、E116 や W127, D130 のように、STLC の結合に伴って、他のアミノ酸との相互作用する L5 上のアミノ酸を変異させたため、3 種の変異体

において, STLC に阻害耐性が見られたと考えられる.

2.5 第二章のまとめ

Eg5 cysteine-light 調製によって, 活性や阻害剤の結合に直接関与していない部位を変異しても, 活性や阻害剤の結合には影響せず, 反対に, 機能部位である L5 に変異を入れた変異体 5 種類の調製によって, 活性や阻害剤の結合に直接関与している部位の変異が, そのまま活性や阻害剤の結合に影響を及ぼすことが分かった. また, L5 の変異部位によって STLC による阻害作用が大きく異なり, 阻害剤結合部位となる L5 のアミノ酸の特性が STLC の結合に非常に大きく影響することが分かった.

cysteine-light が Eg5 WT と同程度の活性および STLC による阻害効果を示したことは, 第三章で, L5 にフォトクロミック分子を導入する上で, 大変良い結果となった. 本来存在する 4 つのシステインをアミノ酸置換し, L5 にのみ単一のシステインを導入できたため, フォトクロミック分子導入の際, L5 以外のところへのフォトクロミック分子導入を防ぎ, L5 にのみ導入することが可能となった.

また, STLC の結合に伴って, 他のアミノ酸との相互作用するアミノ酸は, 変異により, 大きく阻害剤との作用に影響したため, その位置にフォトクロミック分子を導入することにより, 効果的な STLC による阻害効果の光制御が期待できる.

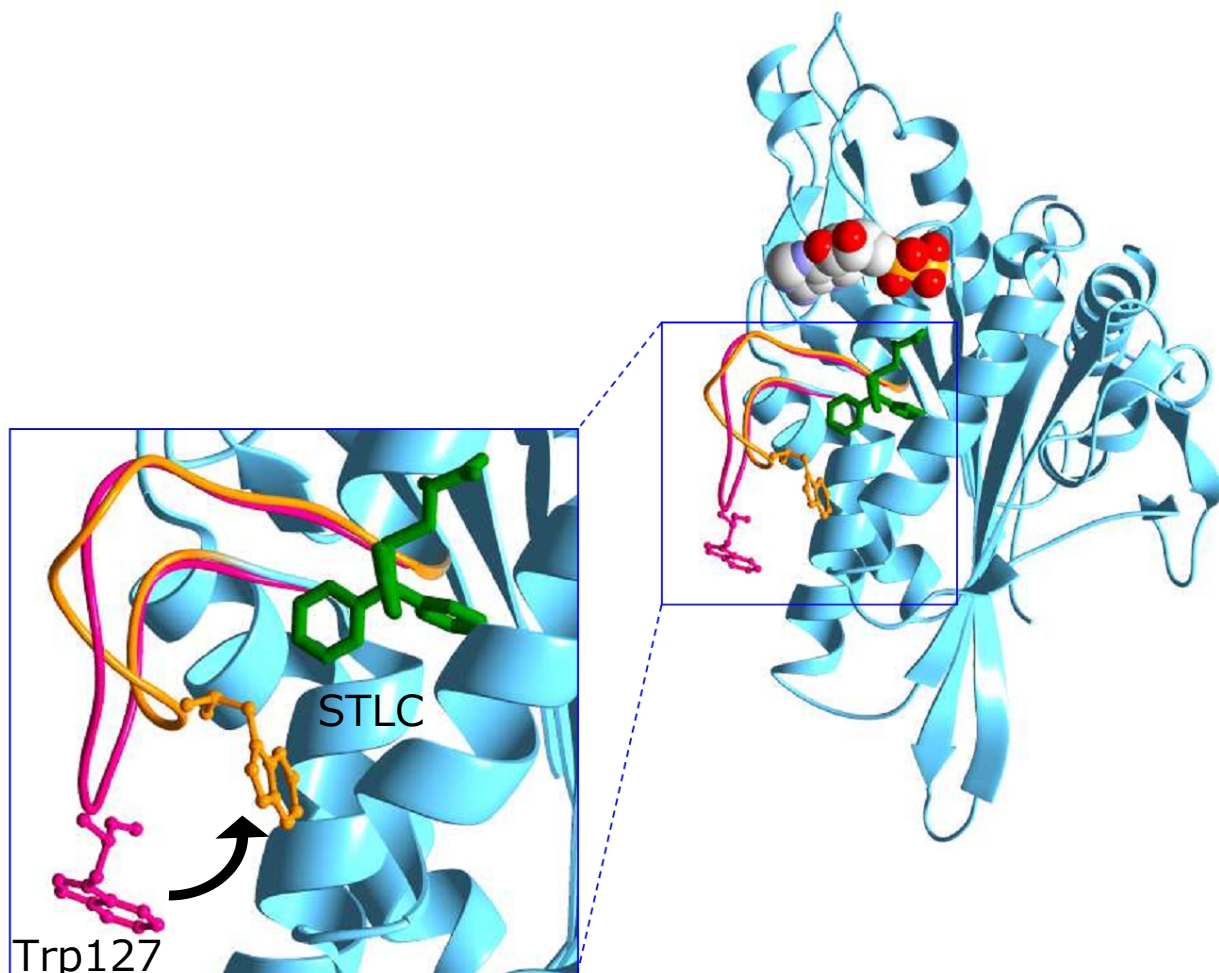
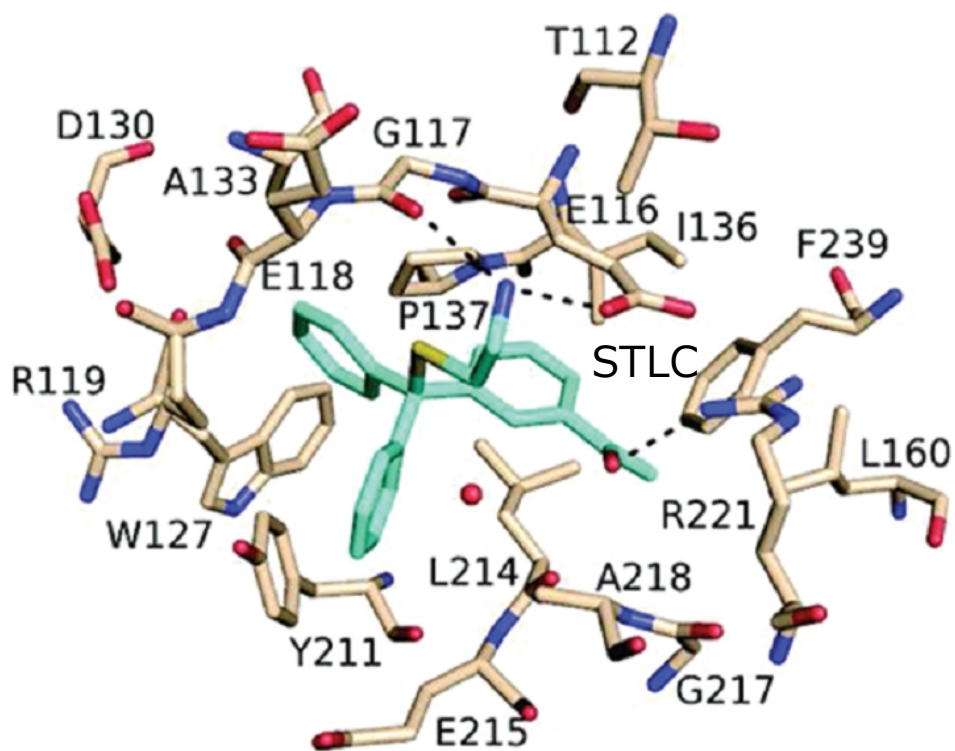


図 2-1 阻害剤 STLC 結合による Eg5 の L5 の構造変化

阻害剤が結合することにより、L5 は大きく構造を変化させる。STLC 結合前の L5 の構造(ピンク)と STLC 結合の L5 の構造(オレンジ)。STLC は緑で示す。特に、127 番目のトリプトファンは阻害剤を覆うようにして Eg5 側に近づき、トリプトファンのインドール環は STLC のフェニル環と相互作用する



(Kaan et al., 2009)

図 2-2 阻害剤結合ポケットに結合した STLC と相互作用するアミノ酸

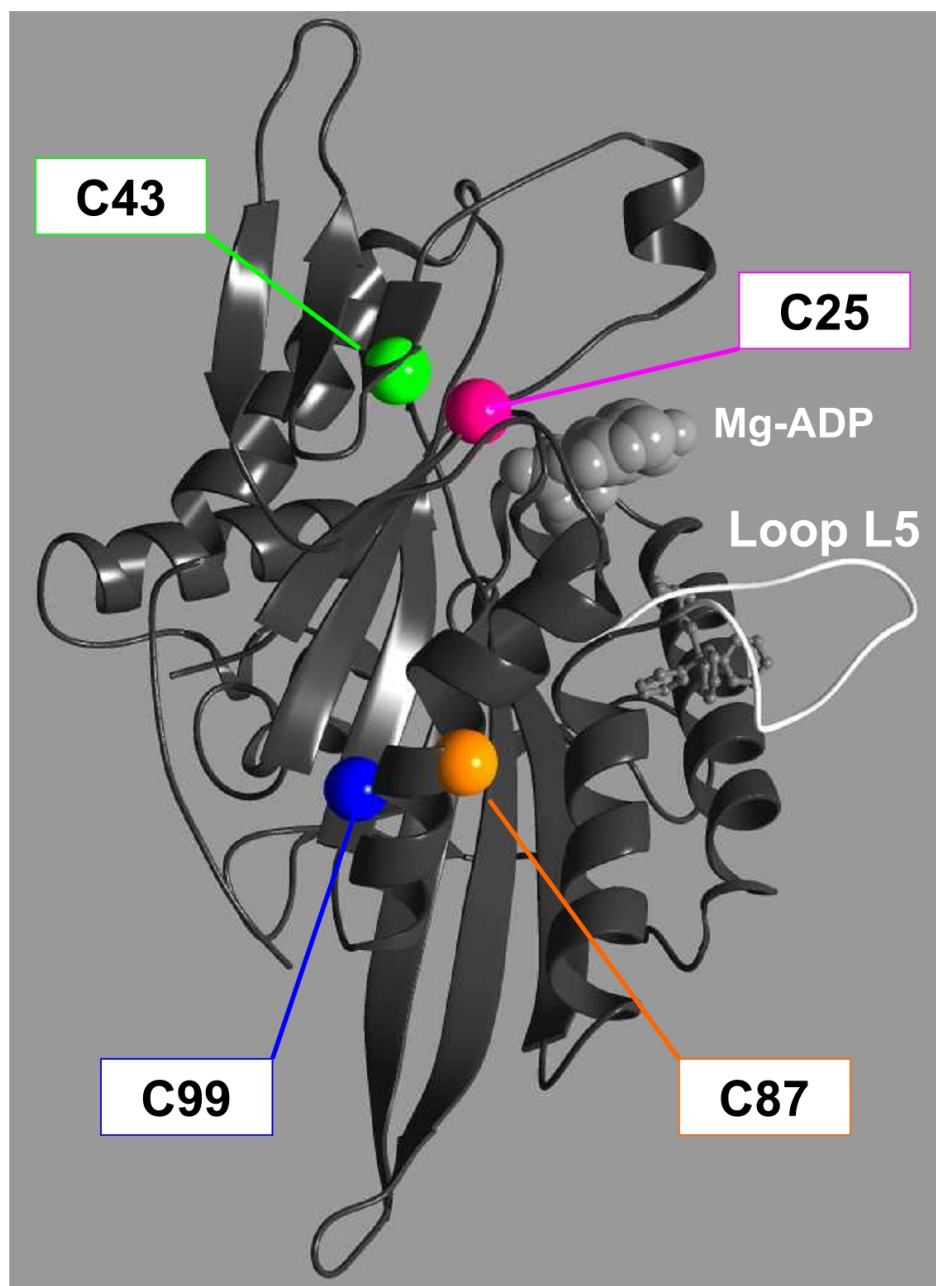


図 2-3 Eg5 に本来存在する 4 つのシステイン(結晶構造)

25 番目, 43 番目のシステインは $\beta 1$ に, 87 番目のシステインは $\alpha 1$, 99 番目のシステインは $\beta 3$ にそれぞれ存在する.

1 MASQPSSLKKKEEKGRNIQVVVRCRPFNLAERKANAHSVVECDHARKEVS 50
 51 VRTAGLTDKTSKKTYTFDMVFGASTKQIDVYRSVVCPIILDEVIMGYNCTI 100
L5
 101 FAYGQTGTGKTFTMEGERSPNEVYTWEEDPLAGIIPRTLHQIFEKLT DNG 150
 151 TEFSVKVSLLEIYNEELFDLLSPSSDVSERLQMFDDPRNKRGVIIKGLEE 200
 201 ITVHNKDEVYQILEKGAAKRTTAATLMNAYSSRSHSVFSVTIHKETTID 250
 251 GEELVKIGKLNLDLAGSENIGRSGAVDKRAREAGNINQSLLTLGRVITA 300
 301 LVERTPHIPYRESKLTRILQDSLGGRTRTSIIATISPASFNLEETLSTLE 350
 351 YAHRAKNIMNKPEVNQK 367

図 2-4 Eg5 に本来存在する 4 つのシステイン(アミノ酸配列)
 25 番目, 43 番目のシステインは β 1 に, 87 番目のシステインは α 1, 99 番目のシステインは β 3 にそ
 れぞれ存在する.

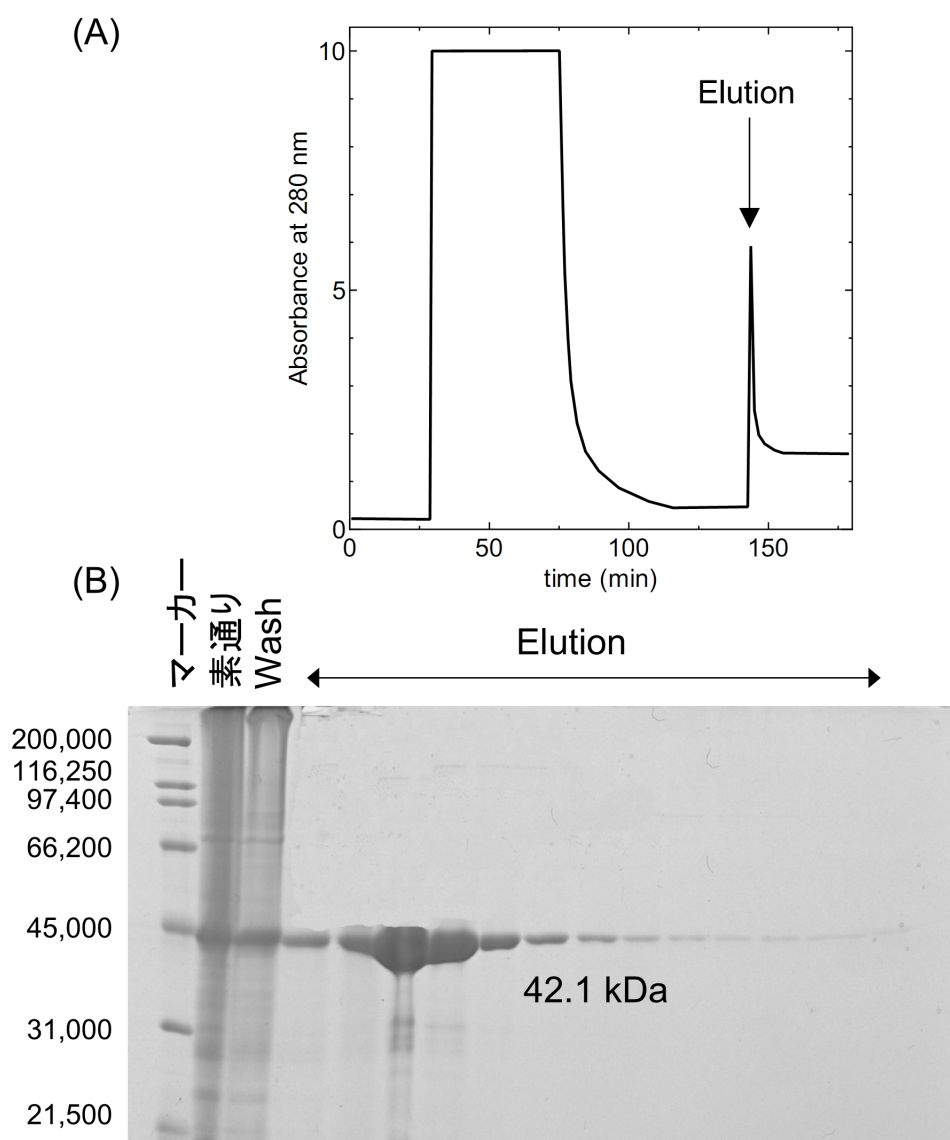


図 2-5 Eg5 WT(42.1 kDa)の精製結果

(A)タンパク質溶出曲線(B)SDS-PAGE 電気泳動による目的タンパク質溶出確認

(A)

L5

101 FAYGQTGTGKTFTMEGHRSPNEVYTWEEDPLAGIIPRTLHQIFEKLT DNG 150

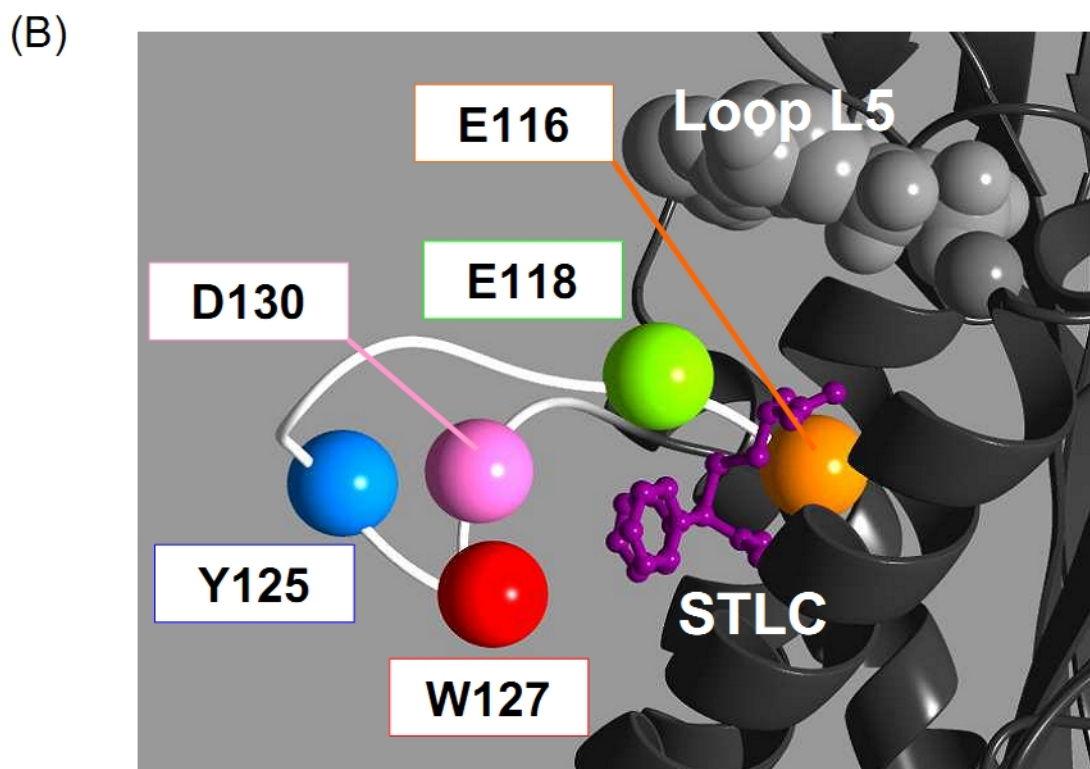


図 2-6 L5 上のシステイン置換部位

(A)L5 近傍のアミノ酸配列と(B)結晶構造. STLC は紫で示す. システイン置換部位である E116, E118, Y125, W127, そして D130 の位置をそれぞれ示す.

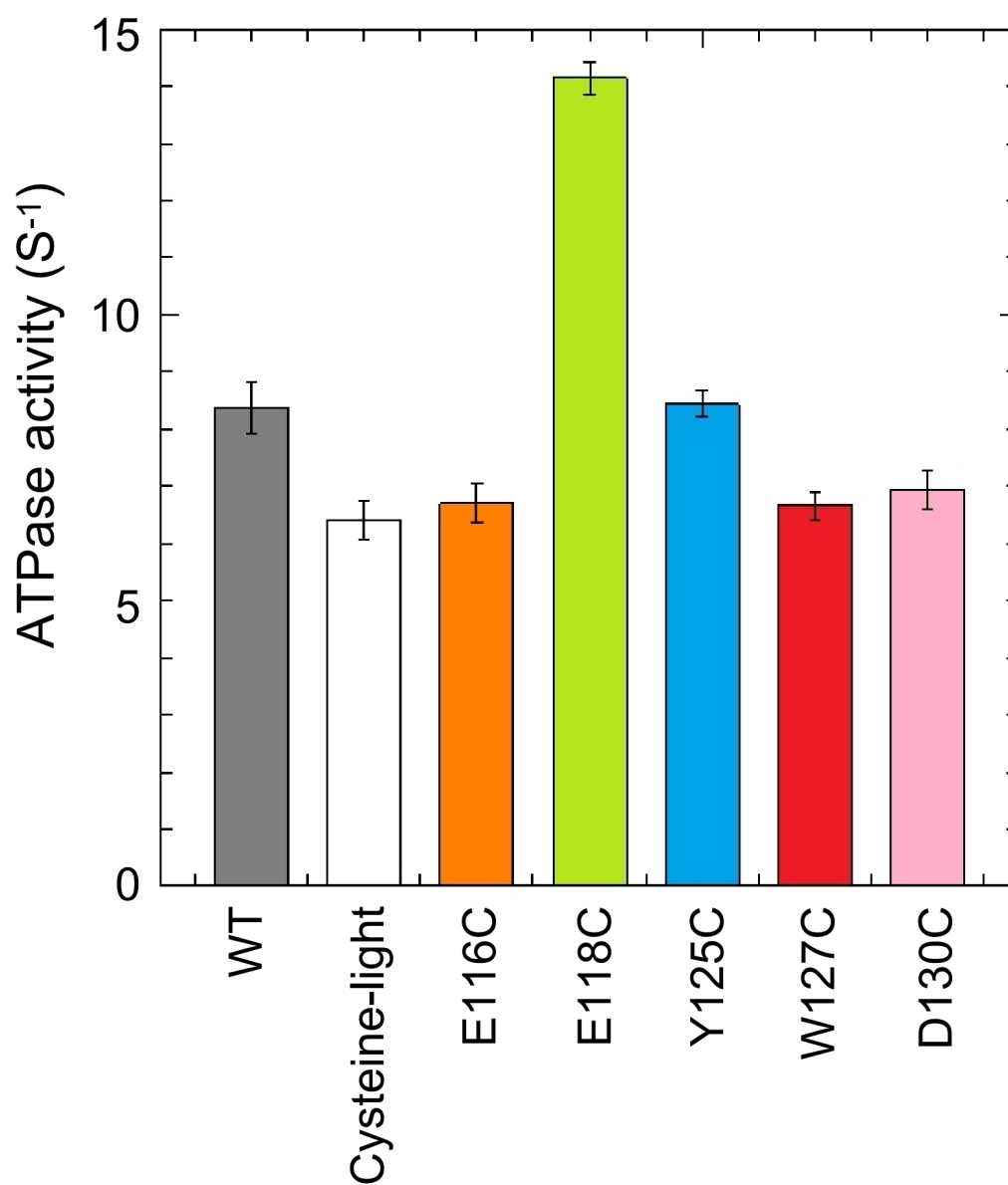


図 2-7 Eg5 の ATPase 活性

0.1 μM の Eg5 を 3 μM の微小管と ATPase assay buffer 中で室温で 5 分間インキュベートした。ATP の加水分解は、2 mM ATP を加えることにより開始し、10% trichloroacetic acid を加えて停止した。Eg5 によって加水分解された ATP の濃度は、加水分解によって放出された遊離リン酸の濃度を Youngburg 法により定量した

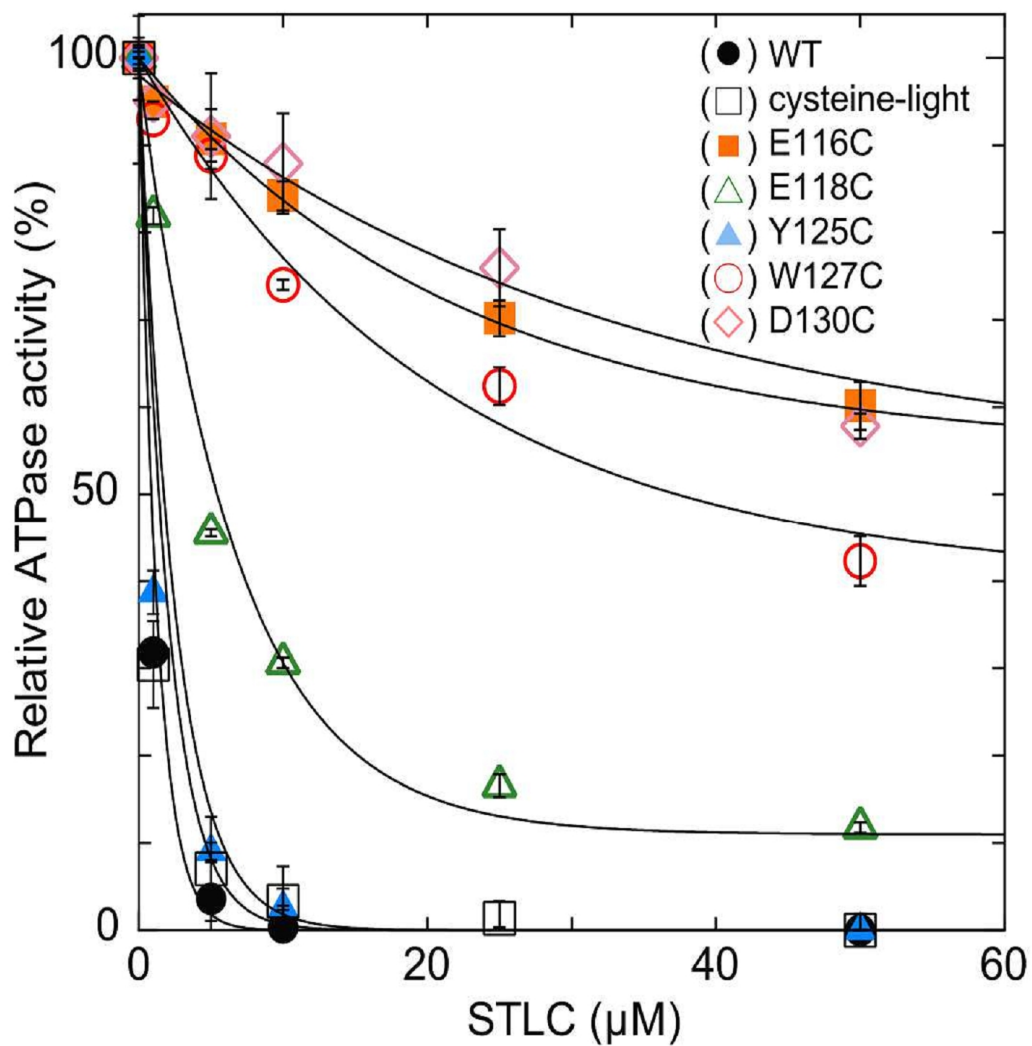


図 2-8 阻害剤 STLC による阻害効果

0-50 μM の STLC と 3 μM の微小管を ATPase assay buffer 中で室温で 5 分インキュベートしたあと、0.1 μM の Eg5 を加えてさらに室温で 5 分間インキュベートした。ATP の加水分解は、2 mM ATP を加えることにより開始し、10% trichloroacetic acid を加えて停止した。Eg5 によって加水分解された ATP の濃度は、加水分解によって放出された遊離リン酸の濃度を Youngburg 法により定量した。

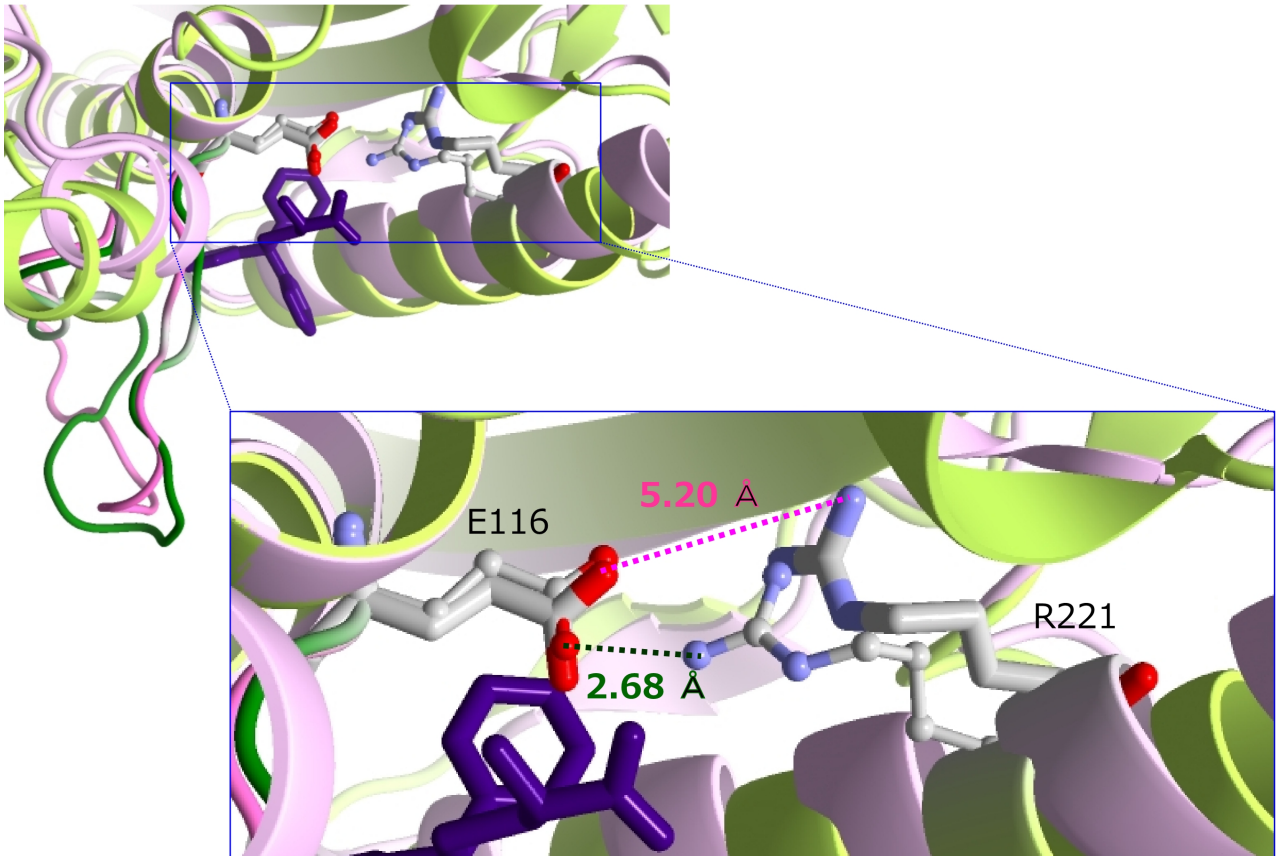


図 2-9 STL が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造: 結合前(ピンク), 結合後(緑)
E116 は STL が阻害剤結合ポケットに結合すると, R221 と塩橋を形成する

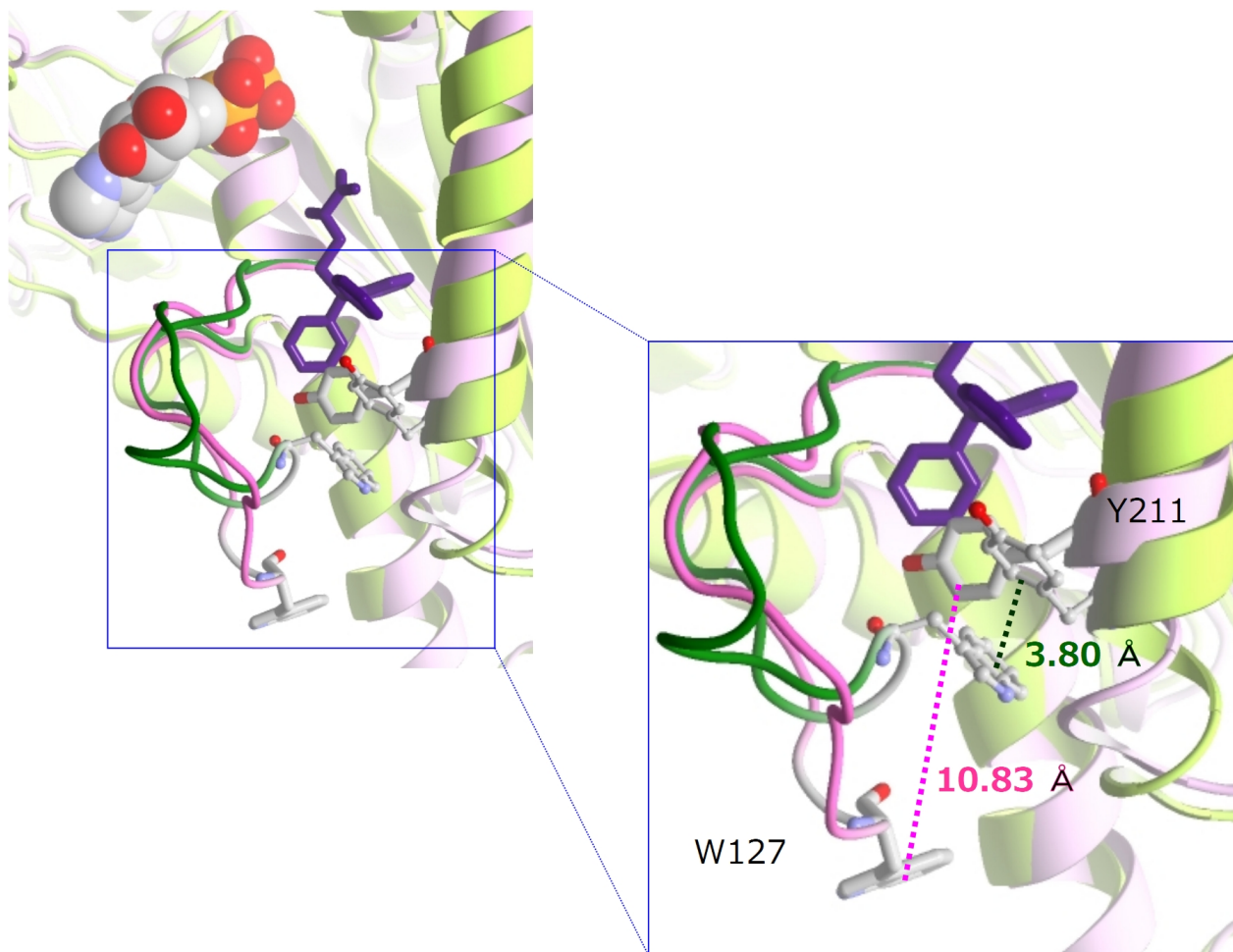


図 2-10 STLC が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造: 結合前(ピンク), 結合後(緑)
 W127 は STLC が阻害剤結合ポケットに結合すると, Y211 と疎水性相互作用する

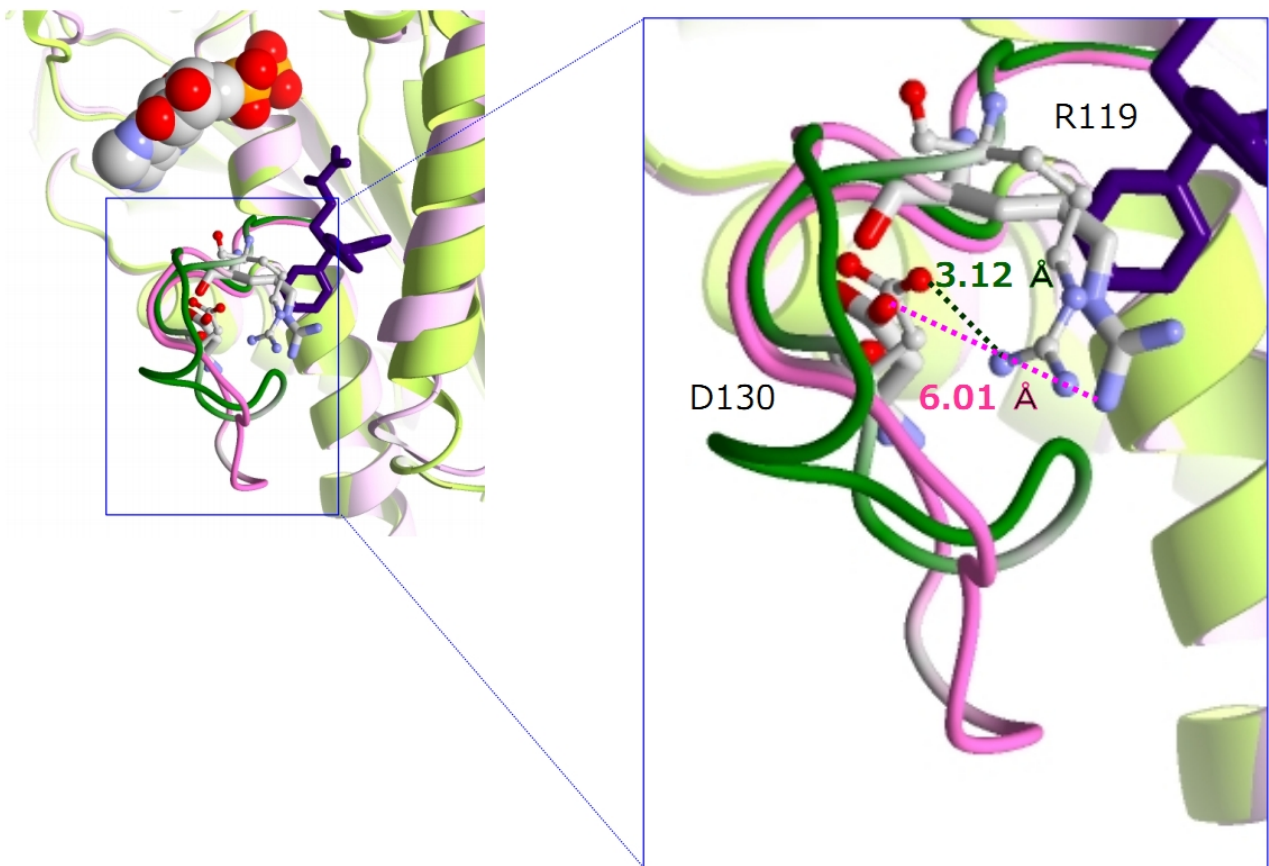


図 2-11 STLC が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造: 結合前(ピンク), 結合後(緑)
D130 は STLC が阻害剤結合ポケットに結合すると, R119 と相互作用する

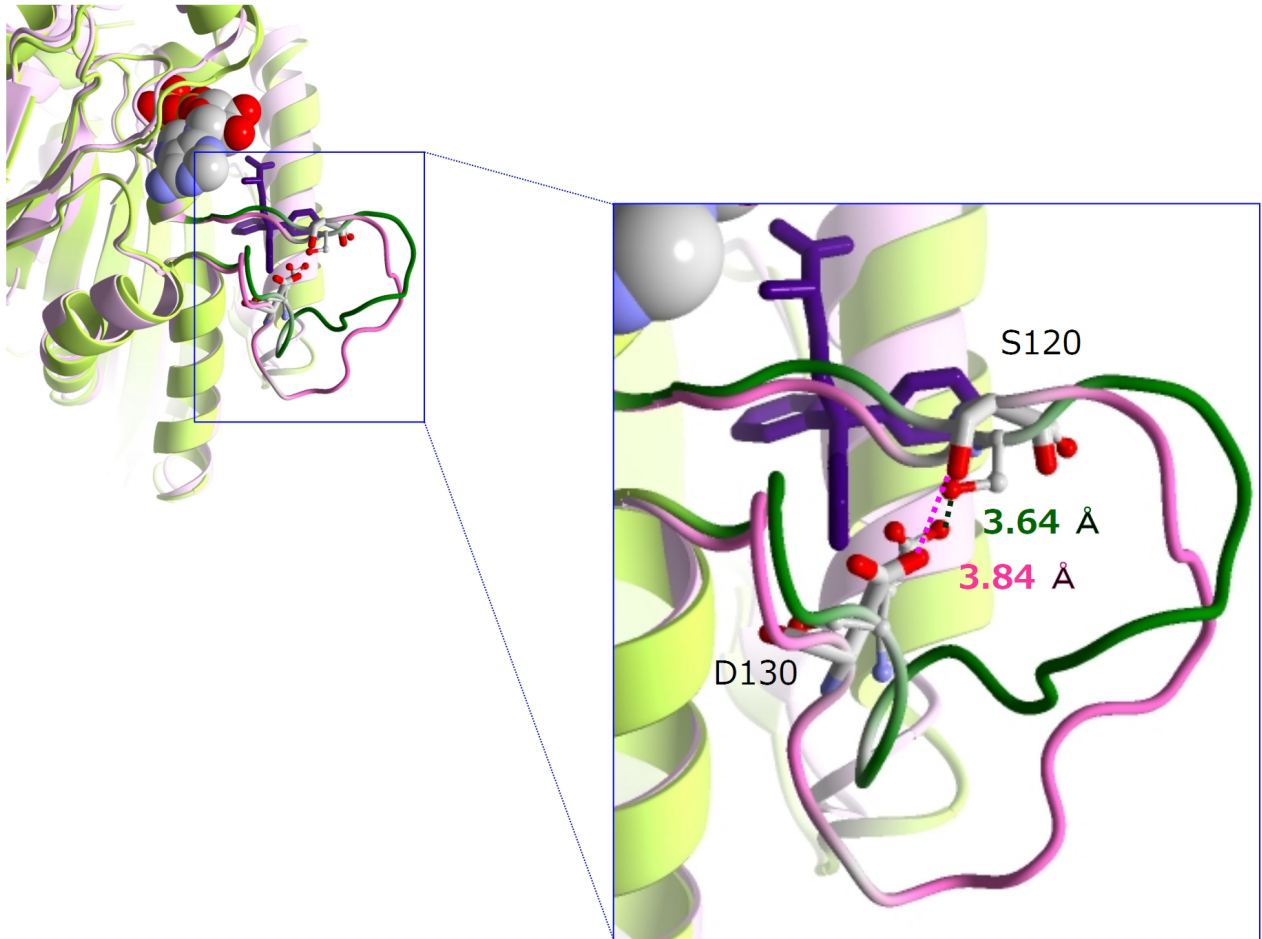


図 2-12 STLC が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造: 結合前(ピンク), 結合後(緑)
D130 は S120 と相互作用する

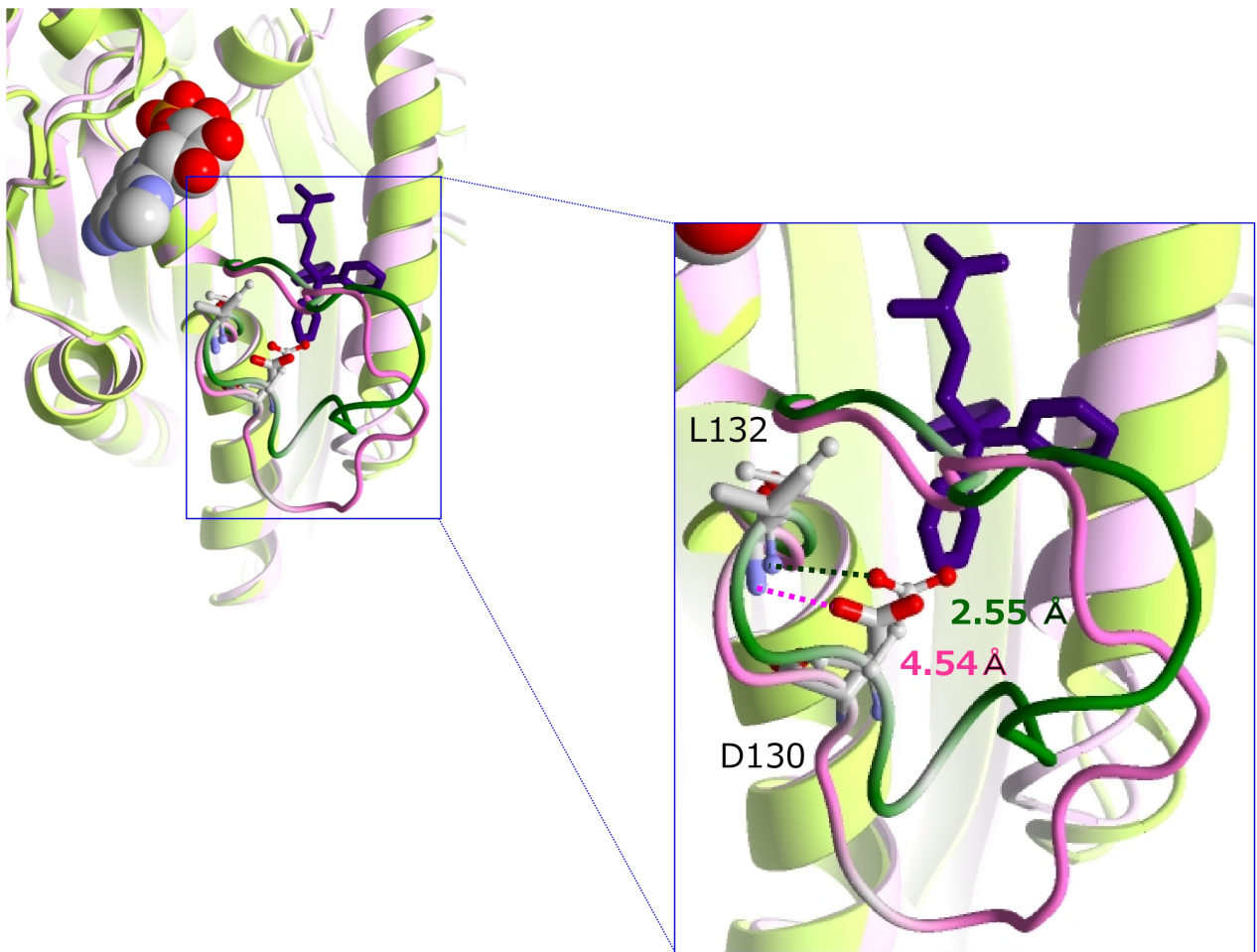


図 2-13 STLC が阻害剤結合ポケットに結合前後の結晶構造: 結合前(ピンク), 結合後(緑)
D130 は L132 の主鎖のアミノ基と相互作用する

第三章

キネシン Eg5 の機能性ループ L5 への
フォトクロミック分子修飾と光制御

3.1 本章の要旨

第三章では、第二章でも明らかになった Eg5 の機能に重要な L5 に、光制御スイッチであるフォトクロミック分子を導入して、紫外線、可視光線照射により Eg5 の活性光制御を行った。Eg5 特異的阻害剤は L5 から成る阻害剤結合ポケットに結合して、Eg5 の ATPase 活性を阻害する。阻害剤結合ポケットに結合する際は、L5 の特定のアミノ酸と相互作用することが分かっている。このように Eg5 の活性や阻害剤による阻害機構に重要な L5 にフォトクロミック分子を導入し、光照射によって L5 の特性を変化させ、Eg5 の活性光制御を行った。フォトクロミック分子を導入するための変異体は、第二章で調製した L5 にのみ単一のシステインを有する E116C, E118C, Y125C, W127C, D130C である。フォトクロミック分子は、紫外線、可視光線照射によって光異性化する PAM, IATAB, IASP を用いた。PAM, IATAB はアゾベンゼン誘導体、IASP はスピロピラン誘導体であり、それぞれ異なった種類のフォトクロミック分子であるため、異なる光制御効果をもたらすと期待できる。各フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体に紫外線、可視光線を交互に照射し、ATPase 活性に及ぼす影響を観察した。PAM-D130C, IASP-W127C, IASP-D130C において、光可逆的な活性制御ができた。さらに、第二章で、L5 の1アミノ酸置換が阻害剤 STLC の阻害効果に影響することが明らかになったため、フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の活性を STLC 存在下で測定し、光照射により、阻害効果に変化が現れるのか調べた。L5 へのフォトクロミック修飾と STLC を組み合わせることにより、IASP-D130C において ON/OFF のような機械的な光制御ができることが明らかになった。

3.2 緒言

Eg5 の L5 は、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。また、第二章で調製した L5 の変異体の結果からも、L5 の1アミノ酸置換が ATPase 活性および阻害剤の阻害活性に影響を及ぼすことが分かった。そこで、Eg5 とく特有の特徴の1つである、Eg5 の阻害剤結合ポケットとの L5 に人工的な制御デバイスとしてフォトクロミック分子を導入し、鍵穴(L5)の構造を光照射によって変化させ、鍵穴の構造により、阻害剤

である鍵が差し込めただけ、Eg5 の ATP 加水分解サイクルを停止させることができ、Eg5 の活性の ON,OFF 状態が人工的に作れるのではないかと考えた(図 3-1).

人工的な制御デバイスとして以下 3 つの点が重要であると考えられる。①安定である②制御デバイスが 2 つ以上の状態を取り、その特性が大きく異なること③制御デバイスの各状態を異なる刺激によって、制御できることである。この 3 点を兼ね備えた制御デバイスがフォトクロミック分子である。フォトクロミック分子は、異なる波長の光照射によって可逆的にその構造と性質を大きく変化させることができる化合物である。特にアゾベンゼンは、その安定性、合成の容易さから、多くの生体分子の光制御にも応用されており、これまでに従来型キネシンの活性(Yamada et al., 2007)や、受容体(Bartels et al., 1971; Stawski et al., 2010; Stawski et al., 2012; Tochitsky et al., 2012)やイオンチャネル(Banghart et al., 2004; Hilf et al., 2010; Mourrot et al., 2011)の機能の光制御などにも利用されている。外部刺激である光により、制御できるフォトクロミック分子は、生体分子を制御する仕組みとして大変有用である、最近では、生きた細胞内のコイルドコイルの光制御(Zhang et al., 2010)など、実際に生体内で利用されている報告もある。

第三章では、このフォトクロミック分子を Eg5 の機能部位である L5(鍵穴)に導入し、Eg5 の ATPase 活性および阻害剤 STLC による阻害効果が光制御できることを明らかにした。今回用いたチオール基反応性フォトクロミック分子は、市販されている PAM に加え、新たに、アゾベンゼンにトリチル基が結合した IATAB, そしてスピロピラン誘導体である IASP を合成した(図 3-2)。異なる種類のフォトクロミック分子を用いることによって、異なった光制御ができ、さらに異なる制御効率をもたらせることが分かった。Eg5 の L5 は阻害剤 STLC の結合部位であるため、フォトクロミック分子修飾により、STLC による阻害効果の光制御も試みた。STLC は L5 を構成するアミノ酸と相互作用して結合するため、その相互作用をフォトクロミック分子の光異性化によって変化させることにより、阻害効果を制御できると考えられる。本研究において、L5 そして阻害剤を組み合わせる事により、Eg5 を効率よく光制御することができ、生体分子機械を ON/OFF という制御効率で制御することができた。

3.3 実験材料と方法

3.3.1 試薬

試薬類は特にことわりのない限り、和光純薬工業(株)の試薬特級を使用した。オリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジー株式会社を利用して合成したものを使用した。制限酵素およびその他の酵素は東洋紡株式会社またはタカラバイオ株式会社のものを使用した。pET21a ベクターおよび大腸菌 BL21(DE3)株は Novagen 社 (Medison, WI) のものを使用した。有機合成に使用した試薬は、和光純薬工業(株)、東京化成工業株式会社、関東化学株式会社、同仁化学研究所のものを使用した。

3.3.2 キネシン Eg5 wild-type の調製法

キネシン Eg5 WT は 2.3.5 と同様の方法で行った。

3.3.3 ATPase 活性測定法

ATPase 活性の測定法、および STLC による阻害効果の測定は 2.3.7 と同様の方法で行った。

3.3.4 チオール基反応性フォトクロミック分子の合成法

4-Phenylazomaleinanil (PAM, SIGMA-ALDRICH) は購入可能である(図 3-2A)。

4-(*N*-(2-iodoacetyl)amino)-4'-(*N*-(2-(*N*-(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azobenzene [IATAB] は、4,4'-azodianiline と *N*-Tritylglycine, iodoacetic anhydride のカップリング反応によって合成した(図 3-3)。まず、4,4'-azodianiline (158 μmol) と *N*-Tritylglycine (158 μmol) を EDC/HOAt 法によって、2.5 mL *N,N*-dimethylformamide (DMF) 中で結合させた。この溶液を室温で 24 時間、攪拌し

反応を進行させた。翌日、一日攪拌した反応液に 32.5 mL の冷水を加え、高速遠心(30,000 × g, 20 min, 4°C)し、4,4'-azodianiline と *N*-Tritylglycine が結合した化合物 A を沈殿、回収した。回収した化合物 A を DMF にとかし、シリカゲルを詰めた(*ultra-pure Wakogel C-200*)オープンカラムクロマトグラフィーにアプライし精製した。化合物 A は、溶出 buffer (1% methanol, 99% chloroform)で溶出させた。溶出した化合物 A は、ロータリーエバポレーターを使用して、溶媒を飛ばし、乾燥させた。次に、乾燥した化合物 A(22.6 μmol) と iodoacetic anhydride (56.5 μmol) を 2 mL tetrahydrofuran (THF)に加え、室温で 24 時間、攪拌し結合させた。翌日化合物 A と iodoacetic anhydride が結合して完成した IATAB を分取用薄層クロマトグラフィー(PLC Silica gel 60, 2 mm, Merck Millipore, 溶媒: 5% methanol 95% chloroform)を用いて、精製した。精製後、薄層クロマトグラフィー(Silica gel 70 F254, Wako, 溶媒: 5% methanol 95% chloroform)を用いて純度を確認した。IATAB の Rf 値は 0.51 である。

3,3-dimethyl-1-(2-(2-iodoacetoxy)ethyl)-3*H*-1,2-dihydroindole-2-spiro-2'-(2*H*)-6'-nitrochromene [IASP] は、1-(2-Hydroxyethyl)-3,3-dimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran と iodoacetic anhydride のカップリング反応によって合成した(図 3-4)。1-(2-Hydroxyethyl)-3,3-dimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran (65 μmol) と iodoacetic anhydride (162 μmol) を触媒である *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine 存在下で、1 mL THF 中で反応させた。この溶液を室温で 48 時間、攪拌し反応を進行させた。合成された IASP を含む反応液は、シリカゲルを詰めた(*ultra-pure Wakogel C-200*)オープンカラムクロマトグラフィーにアプライし精製した。溶出 buffer (5% methanol, 95% chloroform)で溶出後、薄層クロマトグラフィー(Silica gel 70 F254, Wako, 溶媒: 5% methanol 95% chloroform)を用いて純度を確認した。IASP の Rf 値は 0.92 である。

3.3.5 チオール基反応性フォトクロミック分子の光学的特徴づけ

3 種類のチオール基反応性フォトクロミック分子(PAM, IATAB, IASP) (図 3-2) の光学的特徴づけをするために、吸収波長を測定した。さらに、紫外線、可視光線を照射して、フォトクロミック分子

が光異性化することを吸収スペクトル変化から観察した.

DMF に溶かした各チオール基反応性フォトクロミック分子に, 溶媒表面から 7 cm の位置から, 室温で, 波長 366 nm の紫外線ランプ(UVP Inc., San Gabriel, USA)と可視光線(蛍光灯 27 W)を一定時間照射し, スペクトルを測定した.

3.3.6 チオール基反応性フォトクロミック分子の L5 への修飾

チオール基反応性フォトクロミック分子(PAM, IATAB, IASP)を Eg5 変異体の L5 に存在するシステインに修飾した. まず, L5 中のシステイン残基への修飾最適条件を特定するために, 各変異体とチオール基反応性フォトクロミック分子の反応時間依存性, および濃度依存性を確認した. チオール基反応性フォトクロミック分子修飾の際は, 光照射を行わず, PAM および IATAB は trans 体, IASP はスピロピラン型を用いた. 変異体の種類, そしてフォトクロミック分子の種類によって, 修飾効率が異なったため, 修飾条件を変えて行った. まず, 10 μ M PAM は, 修飾 buffer (120 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 2 mM MgCl₂)中で, 等量の 10 μ M Eg5 変異体 E118C, Y125C, W127C, D130C と室温で 15 分間反応させた. 10 μ M E116C と 10 μ M PAM は室温で 3 時間の反応が必要であった. 10 μ M IATAB は, 修飾 buffer 中で, 等量の 10 μ M W127C と D130C と室温で 30 分間反応させた. 10 μ M の Y125C は 10 μ M の IATAB と室温で 3 時間反応させた. 残りの E116C と E118C は, 20 μ M IATAB と室温で 3 時間反応させた. 10 μ M IASP は 10 μ M D130C と室温で 30 分間反応させ, 10 μ M E116C, E118C, Y125C, そして W127C は 10 μ M IASP と室温で 3 時間反応させた. 修飾反応は 5 mM DTT を加えることにより停止させ, 未反応のチオール基反応性フォトクロミック分子は, VIVA SPIN 500 (10K, Nippon Genetics) を用いて 18,000 \times g, 40 min, 4°C の条件で遠心し, 除去した. 修飾効率は, ブラッドフォード法によるタンパク質の濃度定量と, 各チオール基反応性フォトクロミック分子が持つモル吸光係数を用いて定量した. PAM のモル吸光係数は 13,200 M⁻¹cm⁻¹ (322 nm), IATAB は 21,800 M⁻¹cm⁻¹ (376 nm), IASP は 35,000 M⁻¹cm⁻¹ (350 nm)である.

3.3.7 L5 へ修飾したチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化

Eg5 に修飾されたチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化は、修飾 buffer 中の 3 μ M Eg5 に、溶媒表面から 7 cm の位置から、0°C の条件で、波長 366 nm の紫外線ランプ(UVP Inc., San Gabriel, USA)と可視光線(蛍光灯 27 W)を一定時間照射し、吸収スペクトルを測定することにより確認した。

3.3.8 阻害定数算出法

阻害定数 K_i 値は Dixon 法を用いて求めた(Dixon and Webb, 1979)。

3.4 結果と考察

3.4.1 チオール基反応性フォトクロミック分子の特徴

第二章で調製した Eg5 変異体の L5 に位置するシステインに修飾するためのフォトクロミック分子として PAM, IATAB, IASP の 3 種類を用いた(図 3-2)。PAM, IATAB, IASP はシステインのチオール基と反応し、結合できるように、それぞれ PAM はマレイミド基を、IATAB, IASP はヨードアセチル基を有している(図 3-5)。PAM は、SIGMA-ALDRICH で市販されている。IATAB と IASP は、実験方法に記載した方法に従って合成した。3 種類のチオール基反応性フォトクロミック分子は、それぞれ図 3-6,7,8 に示すように、紫外線と可視光照射により可逆的に光異性化する。

PAM は、アゾベンゼンにマレイミド基が結合した化合物である(図 3-2A)。IATAB はアゾベンゼンの一端にトリチル基が、もう一端にヨードアセチル基が結合した化合物である(図 3-2 B, 図 3-9B)。トリチル基は、Eg5 の ATPase 活性を阻害する阻害剤 STLC の重要な部分である(図 3-9A, Ogo et al., 2007; Wang et al., 2012)。光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(図 3-9C)。

アゾベンゼン及びその誘導体の紫外線，可視光線照射による立体配置状態(*cis*, *trans*)は吸光分光法により観察することができる。Yamada らの以前の報告に示すように，PAM の紫外線，可視光線照射による吸収スペクトル変化は，アゾベンゼンとほぼ同一であった(図 3-6)。 *trans*-PAM は 300 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-PAM に光異性化した。 *cis*-PAM は，300 秒間の可視光線照射により *trans*-PAM に光異性化した。同じ条件の下で吸収スペクトルを測定したところ，PAM の吸収極大は 330 nm を示し，IATAB は 372 nm に吸収極大を示した。アゾベンゼンのベンゼン環に結合した官能基の種類によって，吸収極大が，ブルーシフトもしくはレッドシフトすることが知られており(Beharry et al., 2011a; Han and Honda 2011)，IATAB の吸収極大が PAM と比較してレッドシフトしたのは，アゾベンゼンのベンゼン環に結合したトリチル基もしくはヨードアセチル基による影響であると考えられる。図 3-7 に，IATAB の光異性化を観察した吸収スペクトルを示した。 *trans*-IATAB は 100 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-IATAB に光異性化した。 *cis*-IATAB は，180 秒間の可視光線照射により *trans*-IATAB に光異性化した。

IASP はチオール反応性のスピロピラン誘導体である(図 3-2C)。電荷を持たない疎水性のスピロピラン型(SP)から，紫外線照射によって，電荷分離し双性イオンを持った，親水性のメロシアニン型(MC)へと光異性化する。この大きな変化を利用して，阻害剤結合ポケットに対する阻害剤の親和性を制御できるのではないかと考えた (図 3-10)。IASP も PAM や IATAB と同様に，吸光分光法により光異性化を確認することができる。SP-IASP と MC-IASP の吸収スペクトル変化は図 3-8 に示した。PAM や IATAB と同じ条件の下で吸収スペクトルを測定したところ，紫外線照射による SP- IASP から MC- IASP の光異性化には 300 秒間かかった。MC- IASP を SP- IASP に異性化するには 90 秒間の可視光線照射が必要であった。

3.4.2 Eg5 変異体へのチオール基反応性フォトクロミック分子の修飾

第二章で調製した Eg5 変異体にチオール基反応性フォトクロミック分子(PAM,IATAB,IASP)を修飾した。PAM は Eg5 変異体 D130C に，約 15 分で化学量論的に修飾され，同濃度の時点で修飾効率は飽和した(図 3-11A)。IATAB と IASP も，PAM と同様に Eg5 の変異体に化学量論的に

修飾された(図 3-11B,C). 変異体の種類やフォトクロミック分子の種類により修飾効率が異なったため,それぞれの最適条件で実験方法に記載した通りに修飾し,変異体 1 分子あたりに修飾されたフォトクロミック分子の割合を表 3-1 にまとめた. L5 の C 末に位置する D130C は修飾効率が良く短時間でフォトクロミック分子と反応したが, N 末に位置する E116C や E118C は修飾効率が悪く,長時間の反応が必要であった. これらの結果から, D130 は, 外部因子と作用しやすい位置である可能性が示唆された. 外部因子と作用しやすい D130 は, 外部因子である阻害剤 STLC を加えた際, その阻害効果に影響を及ぼしやすいと考えられる.

3.4.3 L5 へ修飾したチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化

Eg5 に修飾されたチオール基反応性フォトクロミック分子の光異性化を調べたところ, PAM は過去の yamada らの報告にあるように, タンパク質へ修飾しても同様に, 紫外線(366 nm), 可視光線照射によって光異性化した(Yamada et al., 2007). IATAB および IASP についても, タンパク質へ修飾後光異性化を観察したところ, *trans*-IATAB-D130C は 180 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-IATAB-D130C に光異性化した. *cis*-IATAB-D130C は, 180 秒間の可視光線照射により *trans*-IATAB-D130C に光異性化した(図 3-12). また, SP-IASP-D130C は 300 秒間の紫外線(366 nm)照射により MC-IASP-D130C に光異性化し, MC-IASP-D130C は, 180 秒間の可視光線照射により SP-IASP-D130C に光異性化することが分かった(図 3-13). このことから, チオール基反応性フォトクロミック分子は Eg5 に修飾後も, 修飾前と同程度の効率で光異性化することが明らかになった.

3.4.4 フォトクロミック分子修飾による Eg5 変異体の活性変化

trans-PAM, *trans*-IATAB, SP-IASP を修飾した Eg5 変異体の ATPase 活性を測定し, フォトクロミック分子修飾による活性への影響を調べた(表 3-2). *trans*-PAM を修飾した Eg5 変異体は, 修飾前と比較して 39-61% ATPase 活性が減少した. *trans*-IATAB を修飾した Eg5 変異体は, 修飾前と

比較して 44-58% ATPase 活性が減少した. SP-IASP を修飾した変異体は, D130C 以外は, 修飾前と比較して 44-66% ATPase 活性が減少し, SP-IASP を修飾した D130C の活性は, 修飾前に比べて 15%にまで減少した. SP-IASP を修飾した D130C 以外は, PAM, IATAP, IASP 修飾による活性の減少は同程度の割合であった. D130C への IASP の修飾が, 大きな ATPase 活性の減少をもたらしたことから, IASP-D130C が効率的な ATPase 活性の制御に適している可能性が示唆された.

3.4.5 フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の活性光制御

3種のチオール基反応性フォトクロミック分子(PAM, IATAB, IASP)をそれぞれ修飾した5種類のEg5変異体に, 紫外線, 可視光線を照射してフォトクロミック分子の光異性化が ATPase 活性に及ぼす影響を調べた. フォトクロミック分子の光異性化は実験方法に記載した方法に従って行った. まず, PAM 修飾による活性への影響を調べた. PAM を修飾した E116C, E118C, Y125C, W127C は紫外線, 可視光線照射で ATPase 活性に有意な変化は見られなかったが, D130C は *trans*-PAM, *cis*-PAM 状態で活性に明らかな変化を示した. *cis*-PAM-D130C は, *trans*-PAM-D130C よりも 24%低い ATPase 活性を示し, この活性変化は, 紫外線, 可視光線の交互照射に従って可逆的に起こった(図 3-14A). 過去の L5 の D130 の 1 アミノ酸置換を行った研究で, 130 番目のグルタミン酸を, 同じ酸性アミノ酸であるアスパラギン酸に置換しても活性に影響はないが, 塩基性アミノ酸であるリジンに置換すると活性が減少し, 疎水性アミノ酸であるバリンに置換すると活性が増加するという報告がある(Kim et al., 2010). 本研究で得られた PAM による D130 の活性変化は, PAM の *trans* 体から *cis* 体への光異性化が, D130 の疎水性アミノ酸から親水性アミノ酸への置換の模倣に対応すると考えられる. また, すべての変異体において, 光異性化には 366 nm の紫外線を使用しているが, 紫外線, 可視光線の交互照射を行っても, E116C, E118C, Y125C, W127C が一定の活性を示し, D130C が可逆的な活性変化を示したことから, 紫外線によりタンパク質は失活および変性していないことが分かる.

次に, IATAB を修飾した Eg5 変異体の光照射による活性変化を調べた. IATAB はトリチル基を

有しているため、光照射によるアズベンゼンの構造変化に伴い、トリチル基が阻害剤結合ポケットに入り込むこみ、Eg5 を阻害する状態と、阻害剤結合ポケットに入り込まない状態を作り出し、大きな光制御をもたらすと期待していた。しかし、IATAB を修飾したすべての Eg5 の変異体の ATPase 活性は、紫外線、可視光線照射で変化せず、活性の光制御には至らなかった(表 3-2)。これは、本研究での IATAB の修飾位置では、トリチル基と阻害剤結合ポケットの位置関係を変化させることができなかつたと考えられる。今後、修飾部位の検討が必要である。

最後に、IASP による活性制御である。図 3-2C に示すように IASP は、光照射によって、大幅にその構造と性質を変化させる。したがって、L5 に組み込まれた IASP の光異性化は、効果的な光制御効率をもたらすと期待できる。IASP は、PAM とは異なる活性変化を示した。SP-IASP-D130C は、MC-IASP-D130C に比べ、30% も低い ATPase 活性を示した(図 3-16A)。さらに、PAM では制御できなかった W127C の活性も IASP 修飾により光制御することができた。SP-IASP-W127C は MC-IASP-W127C に比べ、21% 低い ATPase 活性を示した(図 3-15A)。これら 2 種類の変異体の活性変化は、いずれも紫外線、可視光線の交互照射に従って可逆的に起こった。

また、IASP-W127C、IASP-D130C、PAM-D130C の ATPase 活性の V_{\max} and K_{MT} を求め、表 3-3 にまとめた。IASP-W127C と PAM-D130C の光異性化は、 V_{\max} と K_{MT} の両方に影響を与えた。しかし、興味深いことに、IASP-D130C の光異性化は、 V_{\max} には影響せず、 K_{MT} のみに影響を与えた。MC-IASP-D130C の K_{MT} は、SP-IASP-D130C の K_{MT} の約 4 倍であった。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。

3.4.6 フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の STLC による阻害効果の光制御

3 種のチオール基反応性フォトクロミック分子(PAM, IATAB, IASP)をそれぞれ修飾した 5 種類の Eg5 変異体に、紫外線、可視光線を照射してフォトクロミック分子の光異性化が STLC による阻害効果に及ぼす影響を調べた。第二章で示したように、3 種類の変異体 E116C, W127C, D130C は、STLC の阻害効果に対して明らかな耐性を示した。したがって、L5 に修飾したフォトクロミック分子

の光異性化が STLC の結合に影響を与える可能性があると予想される。そのため、我々は STLC の存在下で、フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の光制御を試みた。

IASP を修飾した W127C と D130C において、STLC の阻害効果を光制御することができた。いずれも STLC 非存在下のときよりも、紫外線、可視光線照射によってより大きな活性変化を示した。特に、IASP-D130C は著しい STLC の阻害効果の変化を示した。50 μ M STLC 存在下で紫外線、可視光線照射を行ったところ、SP-IASP-D130C は、MC-IASP-D130C の約 4 分の 1 の活性を示した(図 3-16B)。また、SP-IASP-W127C も 50 μ M STLC 存在下で活性測定したところ、MC-IASP-W127C に比べ、37%低い ATPase 活性を示した(図 3-15B)。IASP に光異性化に伴い、STLC の阻害剤結合ポケットに対する親和性が変化したと考えられる。IASP 修飾した W127C と D130C 以外の Eg5 変異体は、光照射によって STLC による阻害効果に変化は見られなかった。また、PAM と IATAB で修飾したすべての Eg5 変異体についても、光照射によって STLC による阻害効果に変化は見られなかった。

結晶構造解析により、Eg5 の 2 つのアミノ酸が STLC との相互作用に重要な位置であることが明らかになっている。W127 は、阻害剤は結合すると阻害剤結合ポケットの入り口に向かって動き、 α 3 上の Y211 と疎水性相互作用をする(図 2-10, Kaan et al., 2009)。また、D130 側鎖は、L5 の構造を安定させるために R119, S120, L132 と相互作用する(図 2-11,12,13, Indorato et al., 2013)。したがって、STLC との相互作用に重要な W127 と D130 の変異は阻害剤結合ポケットの構造変化を引き起こすと考えられる。実際に、図 2-8 に示すように、W127C と D130C は、STLC 阻害活性に耐性を示した。これらの知見は、W127C と D130C に組み込まれたフォトクロミック分子の光異性化が STLC 阻害活性に対する耐性を変化させ得ることを示唆している。予想通り、IASP を修飾した W127C と D130C の STLC 阻害活性は光照射によって変化した(図 3-15B, 3-16B)。どちらの変異体も、双性イオンをもつ MC-IASP のときに、STLC 阻害活性に耐性を示した。IASP がイオン化することによって、Eg5 と STLC の結合安定性が低下し、IASP は疎水性のスピロピラン型であるとき、阻害剤結合ポケットに STLC を安定化させることができ、STLC 阻害活性の増加促進に繋がった可能性が考えられる。一方、PAM や IATAB を修飾した変異体の光異性化は STLC 阻害活性に変化は見られなかった。PAM や IATAB の光異性化は、阻害剤結合ポケットに十分な構造変化を

もたらせなかったと考えられる。IATAB に関しては、すべての変異体において、ATPase 活性、STLC 阻害活性ともに光制御することができなかった。今後、もっと正確な分子設計と他の種類のフォトクロミック分子の利用が必要であると考ええる。

本研究では、最も効率の良い光制御が観察できた IASP を修飾した D130C を用いて、さらに、より効率良く Eg5 を制御できる条件を検討した。IASP を修飾した変異体 D130C に、紫外線、可視光線を照射して、STLC 濃度依存的阻害効果を調べたところ、STLC を 200 μM 以上加えることにより、可視光線照射時は、活性が完全に阻害され OFF 状態になったのに対し、紫外線照射時は高濃度の STLC を加えても 50%以上活性を保ち、ON 状態を維持することが明らかになった。これまでの生体分子の制御では、ON/OFF を実現するのが難しく、酵素活性の増減で制御されていたが、本研究において、L5 そして阻害剤を組み合わせる事により、効率よく光制御することができ、ON/OFF という制御効率を達成することができた(図 3-17)。また、紫外線、可視光線照射時の IASP-W127, PAM-D130C と IASP-D130C の STLC の阻害定数 K_i 値を算出した。表 3-4 に示すように、IASP と PAM の修飾および光異性化によって、STLC の K_i 値が変化した。特に IASP-D130C の K_i 値は IASP の光異性化によって大きく変化し、それぞれの K_i 値は SP-IASP-D130C が 22.2 μM , MC-IASP-D130C が 302.9 μM であった。

3.5 第三章のまとめ

新規チオール基反応性フォトクロミック分子(IATAB, IASP)を設計し、それらを合成した。合成したチオール基反応性フォトクロミック分子を Eg5 の機能部位である L5 に修飾する条件および光異性化法を確立させた。そして、L5 に修飾したフォトクロミック分子の光異性化によって、Eg5 の ATPase 活性と特異的阻害剤 STLC の阻害活性を光制御できることを明らかにした。また、Eg5 特有の特徴である L5 と阻害剤の両方を利用することにより、ON/OFF といった機械的な制御を可能にした。各タンパク質特有の性質を利用することで、効率の良い制御が可能であることを示すことができた。さらに、フォトクロミック分子の修飾部位やフォトクロミック分子の種類によって、もたらさ

れる光制御の結果が異なることが分かり、今回光制御に至らなかった IATAB も、修飾部位を検討することにより、効率よく Eg5 を光制御できると期待できる。

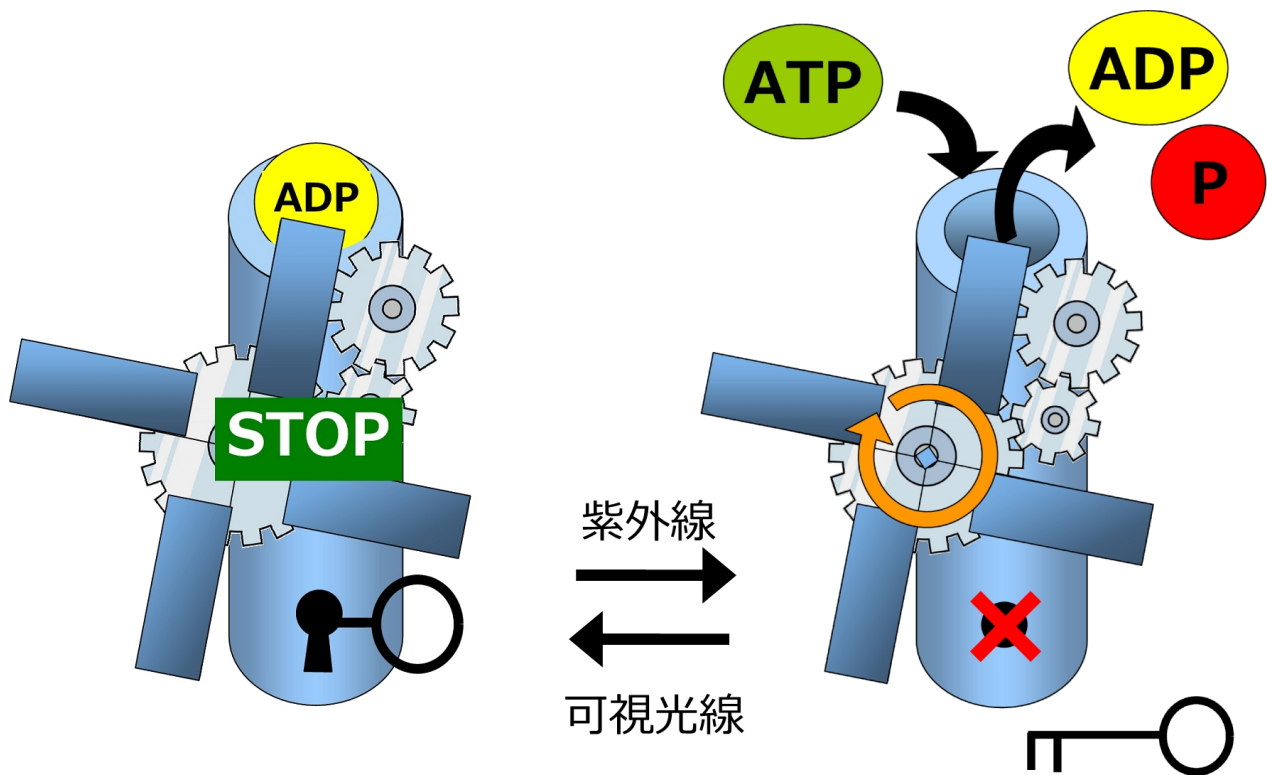


図 3-1 「Loop L5 = 鍵穴」を利用した Eg5 の制御

Eg5 の阻害剤結合ポケットとの一部である L5 にフォトクロミック分子を導入し、鍵穴の構造を照射によって変化させ、鍵穴の構造により、阻害剤である鍵が差し込めたときだけ、Eg5 の ATP 加水分解サイクルを停止させる

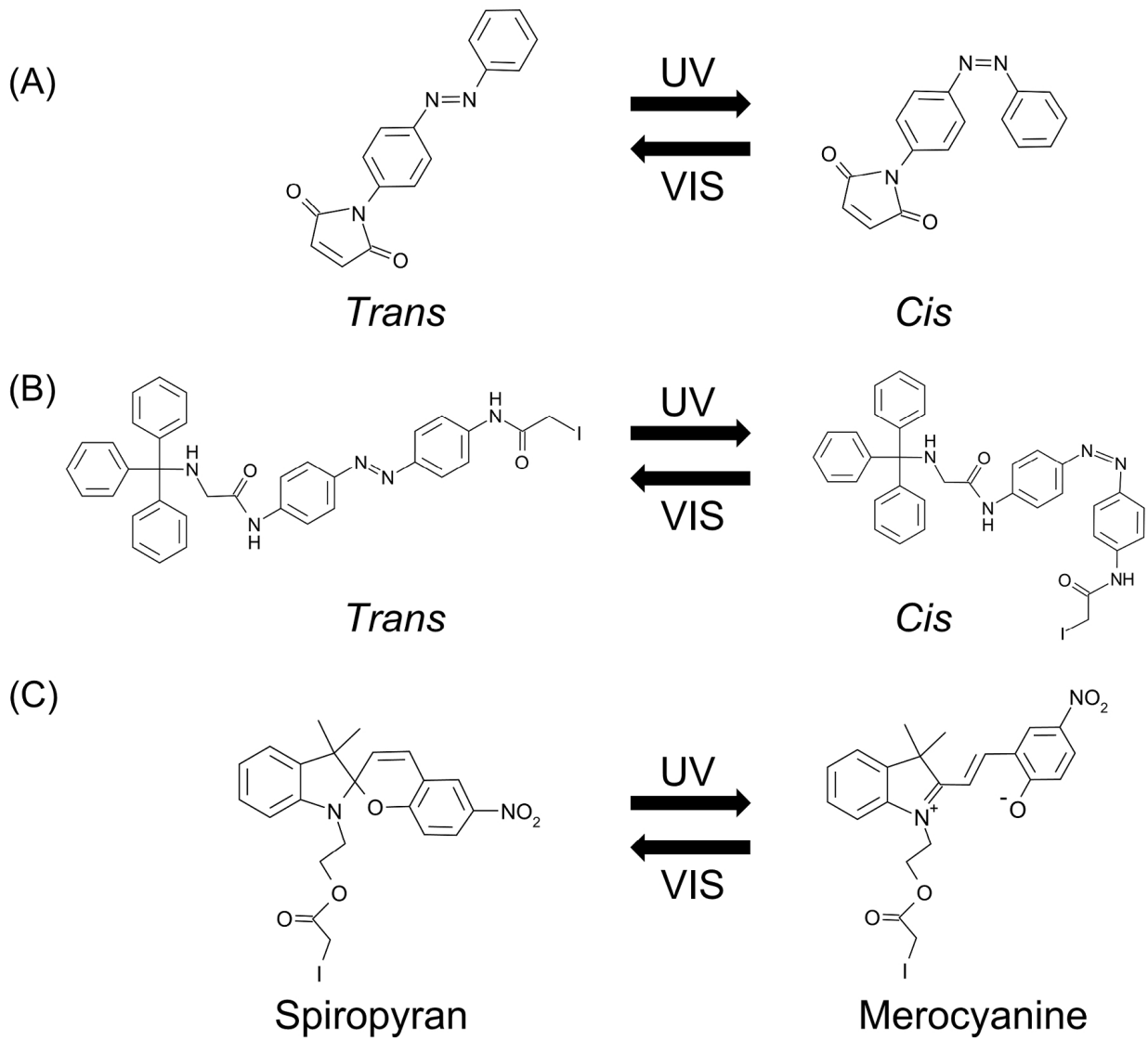


図 3-2 チオール基反応性フォトクロミック分子の構造式
(A) PAM, (B) IATAB, (C) IASP

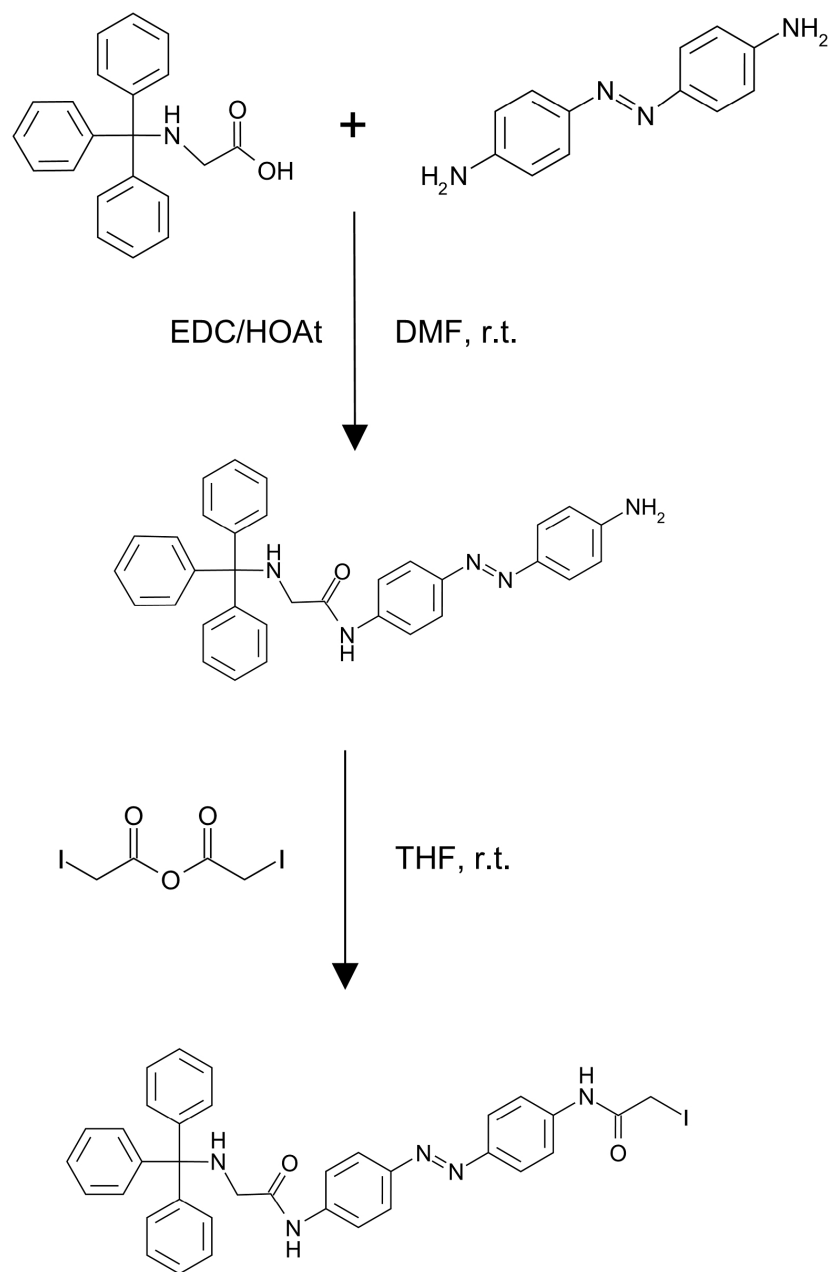


図 3-3 チオール基反応性フォトクロミック分子 IATAB の合成法

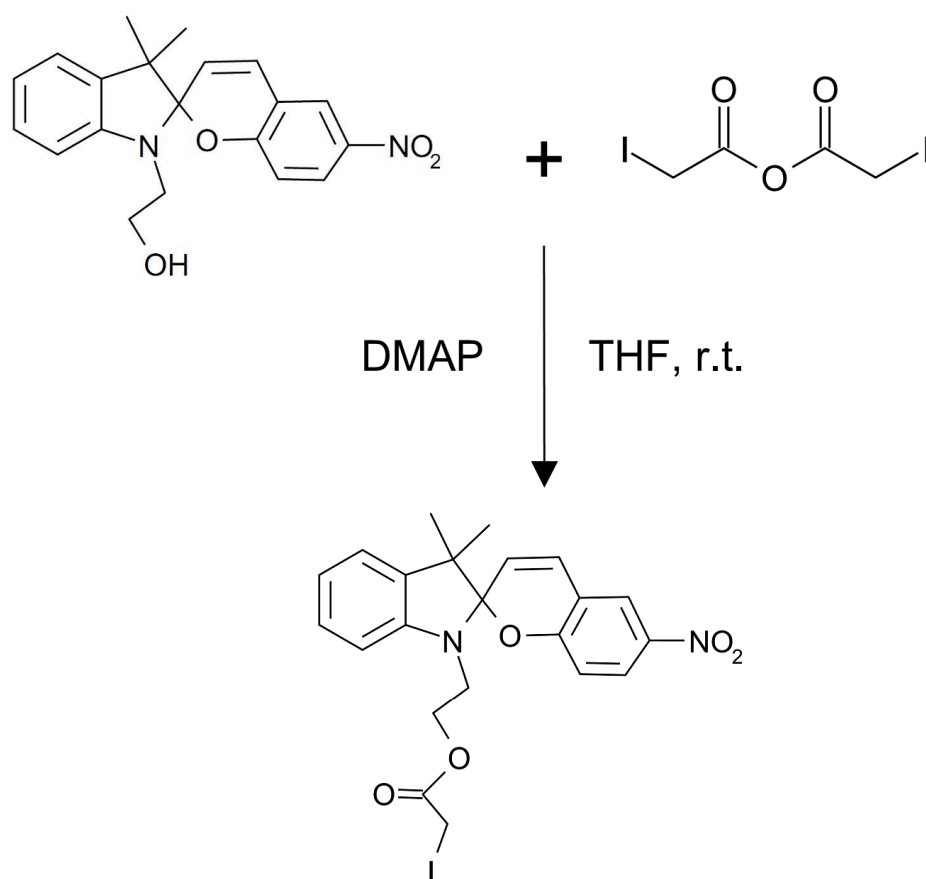
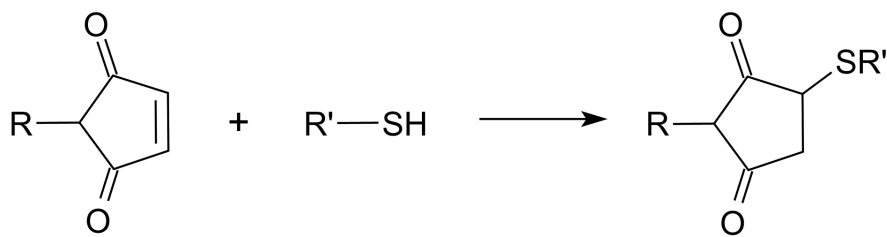


図 3-4 チオール基反応性フォトクロミック分子 IASP の合成法

(A)



(B)

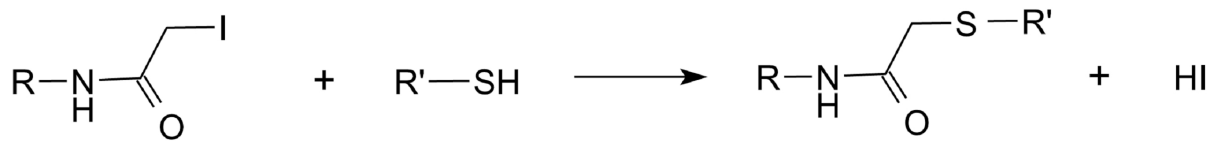


図 3-5 チオール基反応性の官能基(A)マレイミド基, (B)ヨードアセチル基

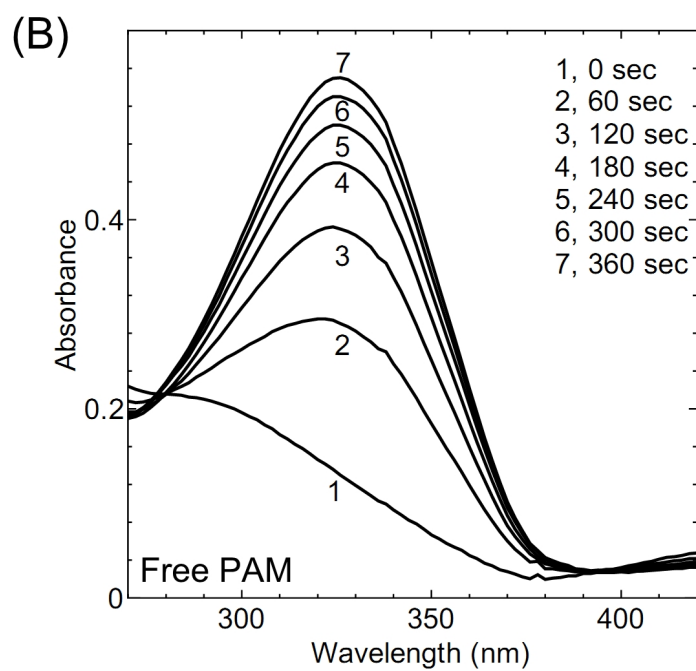
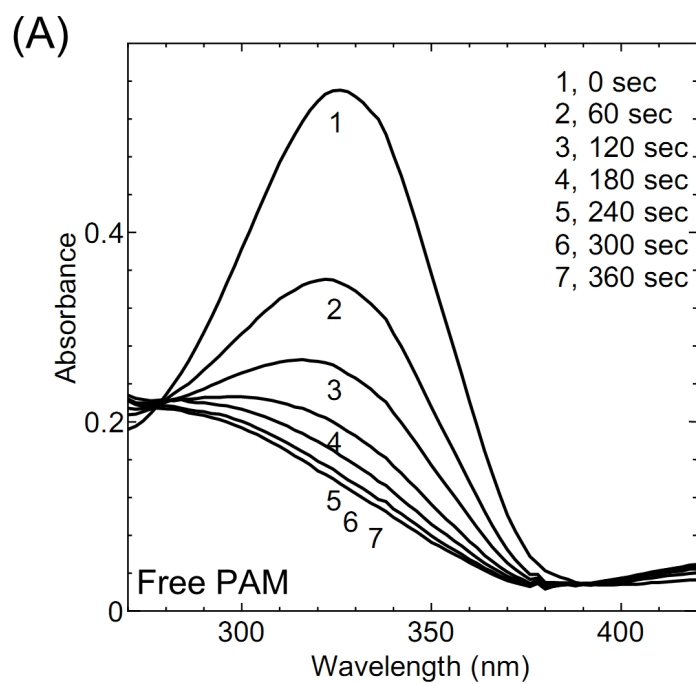


図 3-6 チオール基反応性フォトクロミック分子 PAM の光異性化

(A) *trans*-PAM(40 μ M)は 300 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-PAM に光異性化した.

(B) *cis*-PAM(40 μ M)は, 300 秒間の可視光線照射により *trans*-PAM に光異性化した.

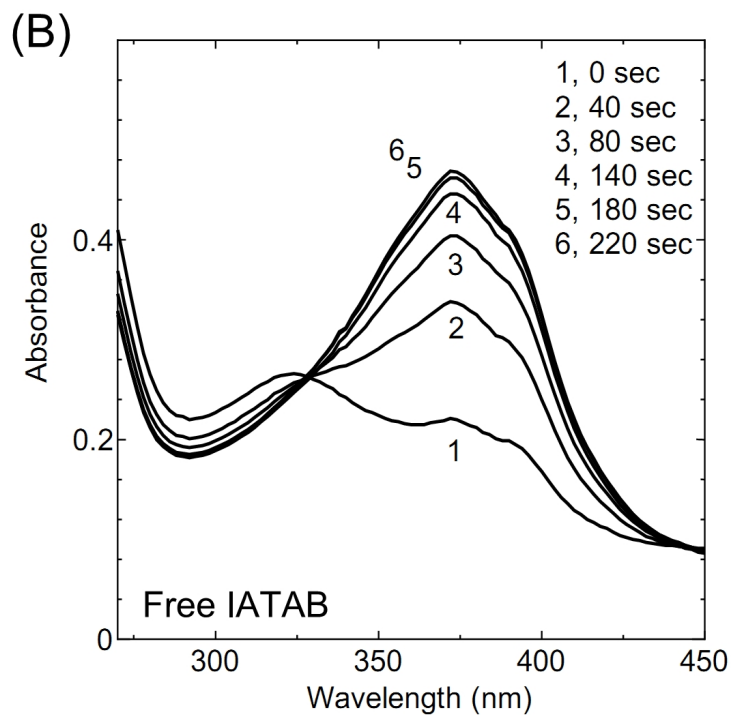
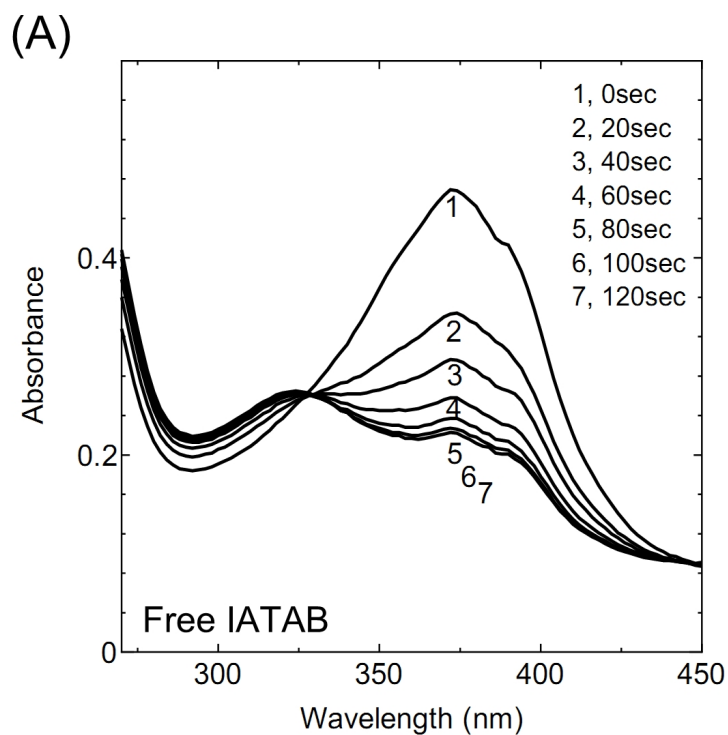


図 3-7 チオール基反応性フォトクロミック分子 IATAB の光異性化

(A) *trans*-IATAB (25 μ M) は 100 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-IATAB に光異性化した。

(B) *cis*-IATAB(25 μ M) は, 180 秒間の可視光線照射により *trans*-IATAB に光異性化した。

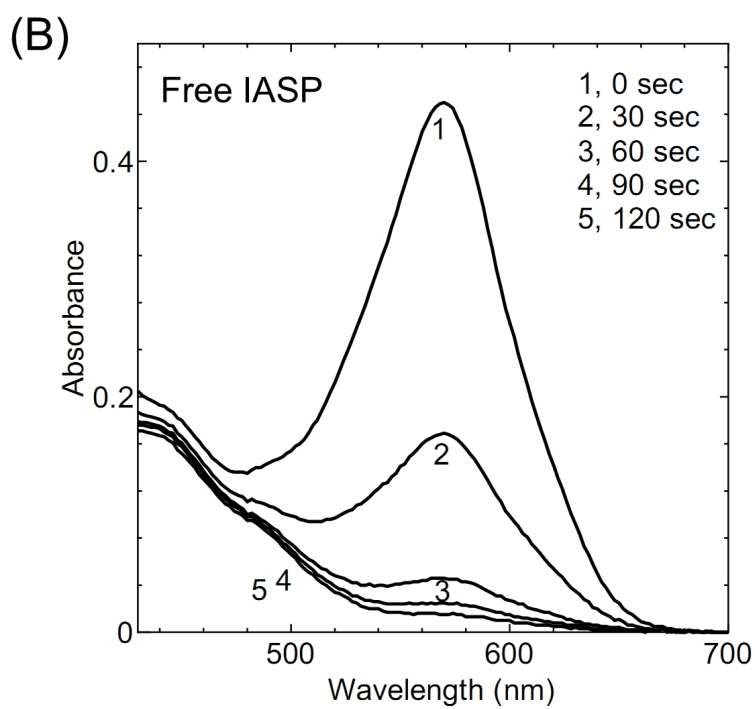
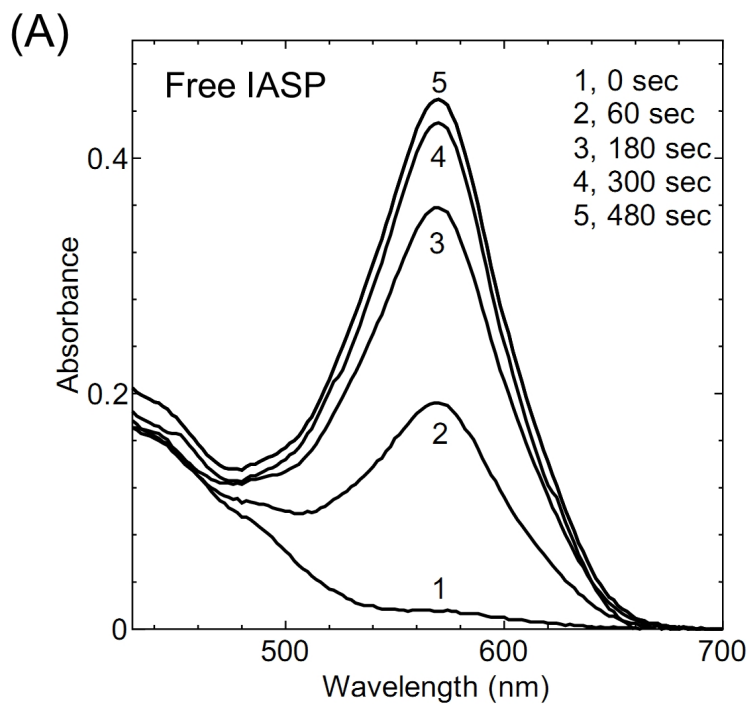


図 3-8 チオール基反応性フォトクロミック分子 IASP の光異性化

(A)SP-IASP(15 μ M)は 300 秒間の紫外線(366 nm)照射により MC-IATAB に光異性化した。

(B)MC-IASP(15 μ M)は, 90 秒間の可視光線照射により SP-IATAB に光異性化した。

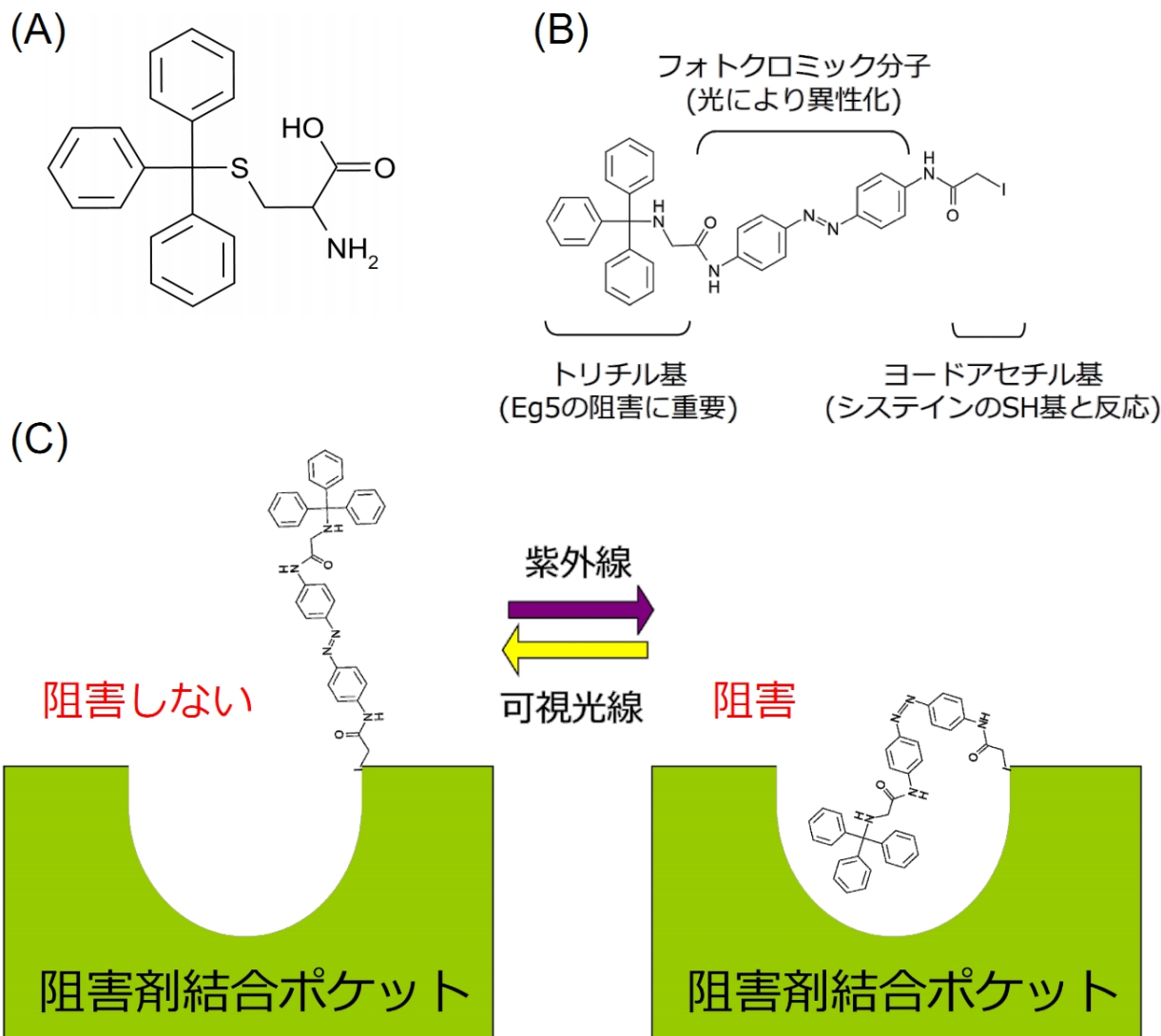


図 3-9 チオール基反応性フォトクロミック分子 IATAB

(A)Eg5 特異的阻害剤 STLC, (B)チオール基反応性フォトクロミック分子 IATAB, (C)IATAB の光異性化に伴う光制御のモデル光照射によるアゾベンゼンの構造変化に伴い, :IATAB のトリチル基が阻害剤結合ポケットに入り込むこみ, Eg5 を阻害する状態と, 阻害剤結合ポケットに入り込まない状態を作り出せる。

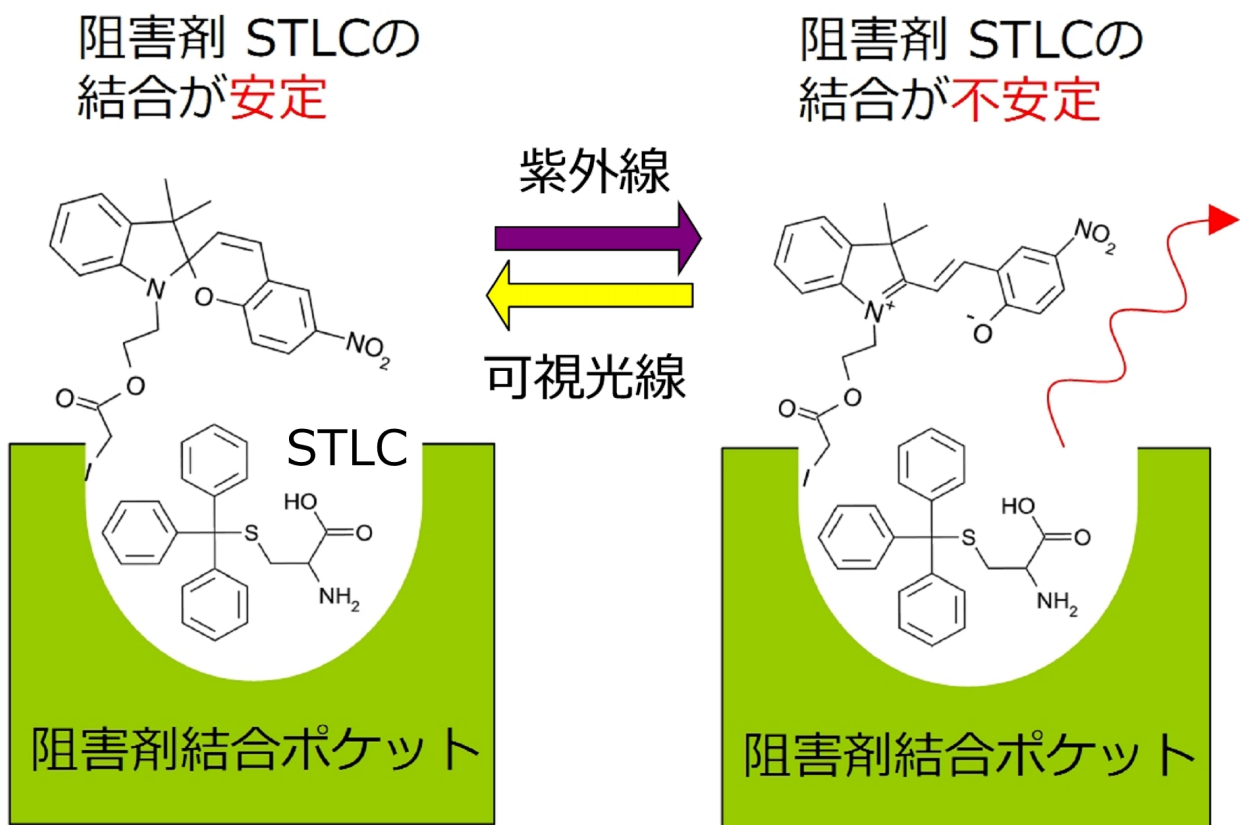


図 3-10 チオール基反応性フォトクロミック分子 IASP の光異性化に伴う光制御のモデル
 IASP の光異性化に伴い、阻害剤 STLC の阻害剤結合ポケットへの結合安定性を変化させる

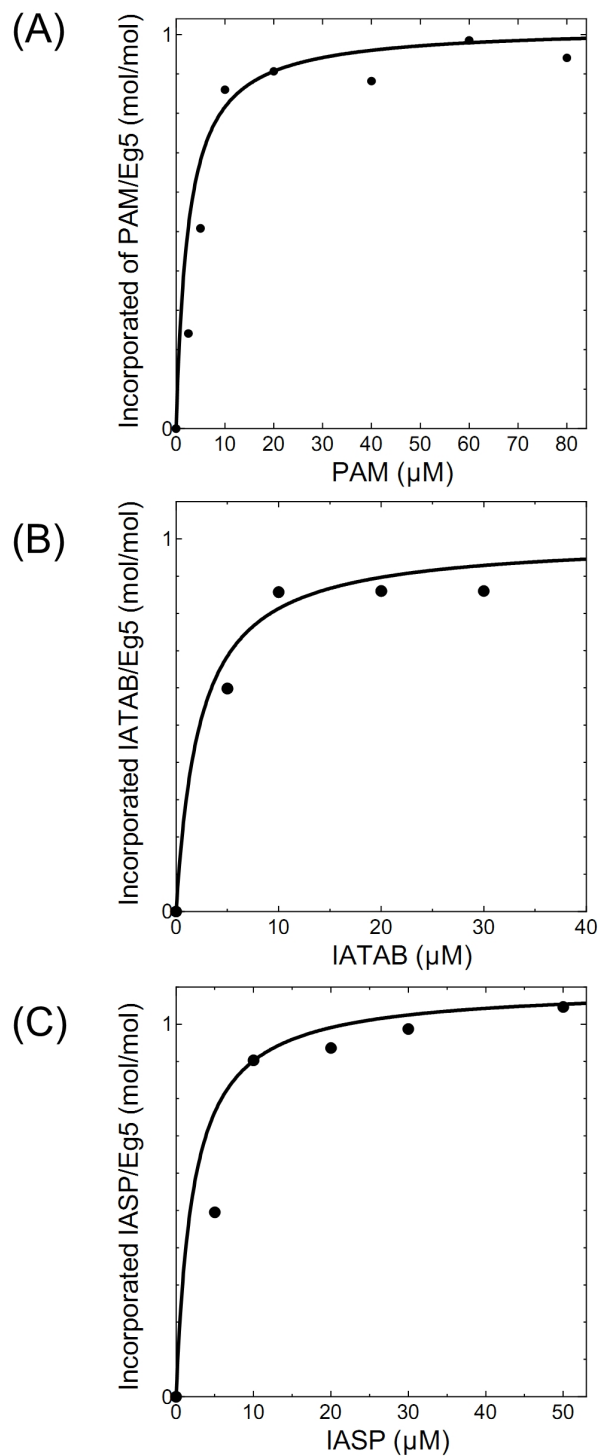


図 3-11 チオール基反応性フォトクロミック分子の濃度依存性修飾効率

(A)Eg5 変異体 D130C (10 μM) を PAM (0–80 μM)と修飾バッファー中で, 15 分間, 25°C で反応させた. (B)Eg5 変異体 W127C (10 μM)を IATAB (0–30 μM) と修飾バッファー中で, 30 分間, 25°C で反応させた. (C) Eg5 変異体 E118C (10 μM) を IASP (0–50 μM)と修飾バッファー中で, 3 時間, 25°C で反応させた. 修飾反応は 5 mM DTT を加えて停止させた.

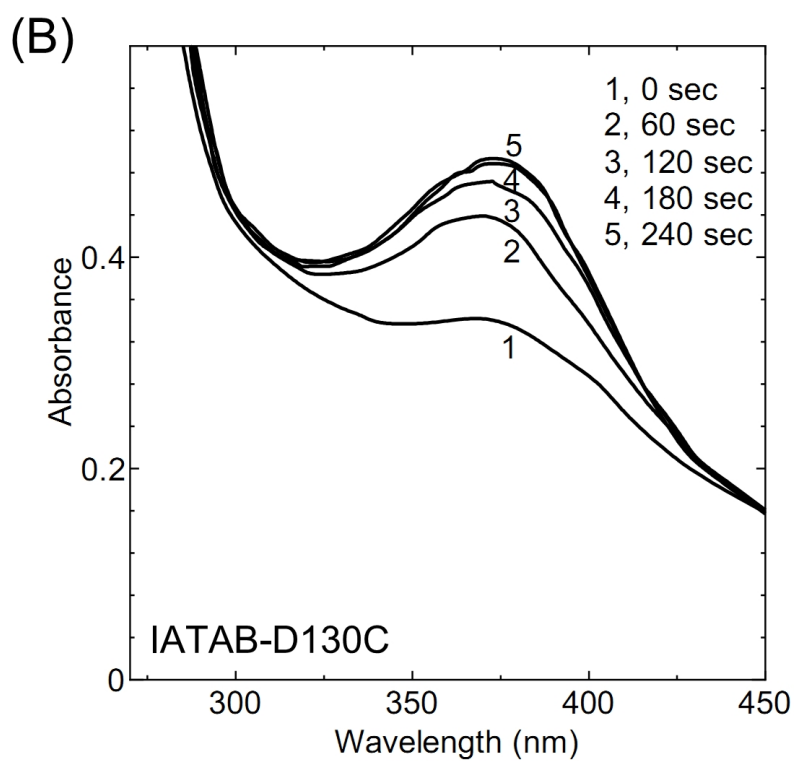
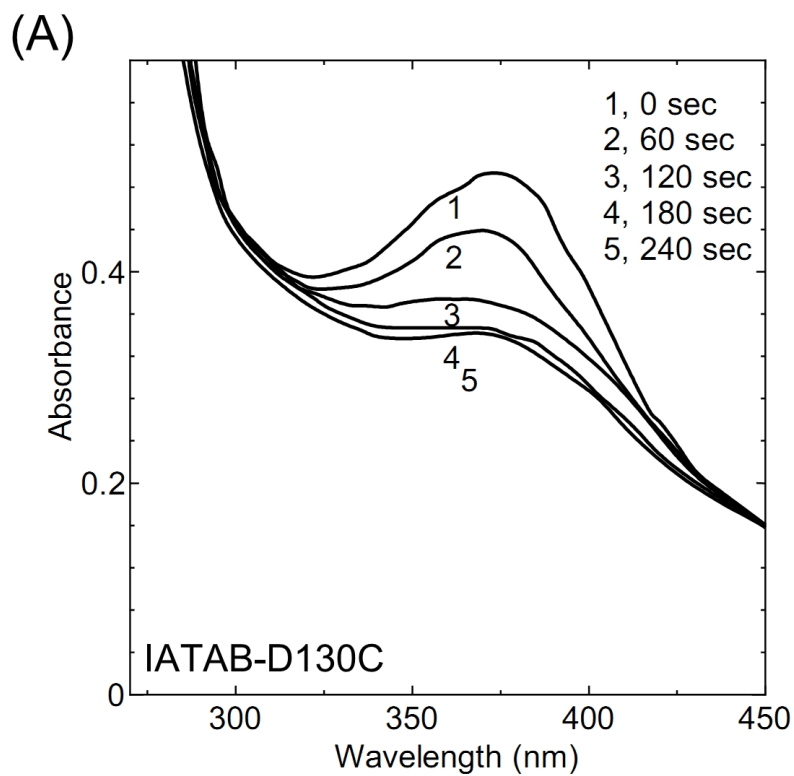


図 3-12 IATAB-D130C の光異性化

(A) *trans*-IATAB-D130C (25 μ M) は 180 秒間の紫外線 (366 nm) 照射により *cis*-IATAB-D130C に光異性化した. (B) *cis*-IATAB-D130C (25 μ M) は, 180 秒間の可視光線照射により *trans*-IATAB-D130C に光異性化した

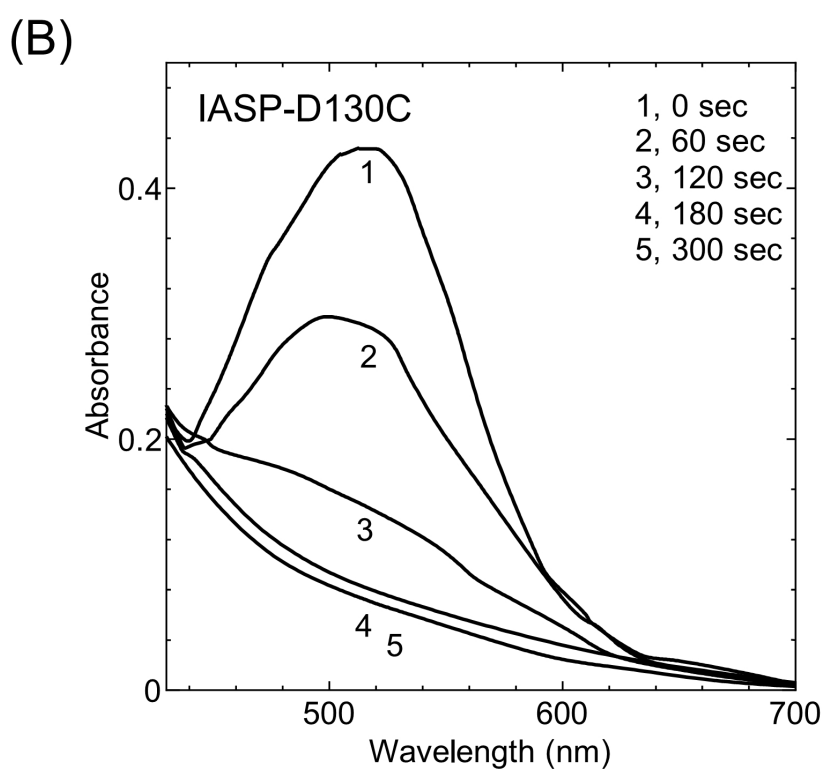
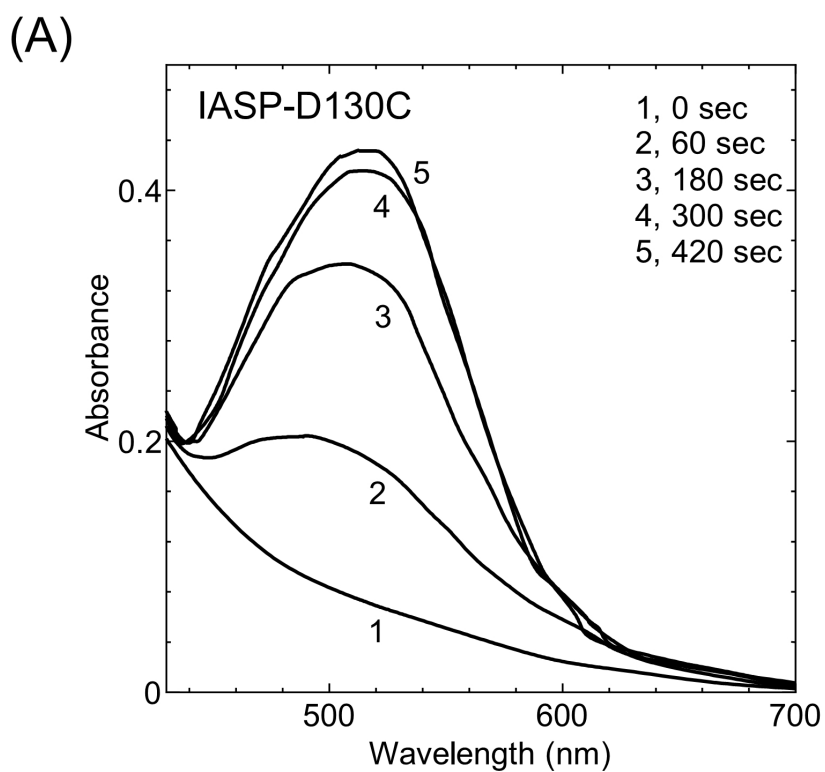


図 3-13 IASP-D130 の光異性化

(A)SP-IASP-D130C(15 μ M)は 300 秒間の紫外線(366 nm)照射により MC-IASP-D130C に光異性化した。(B)MC-IASP-D130C(15 μ M)は, 180 秒間の可視光線照射により SP-IASP-D130C に光異性化した。

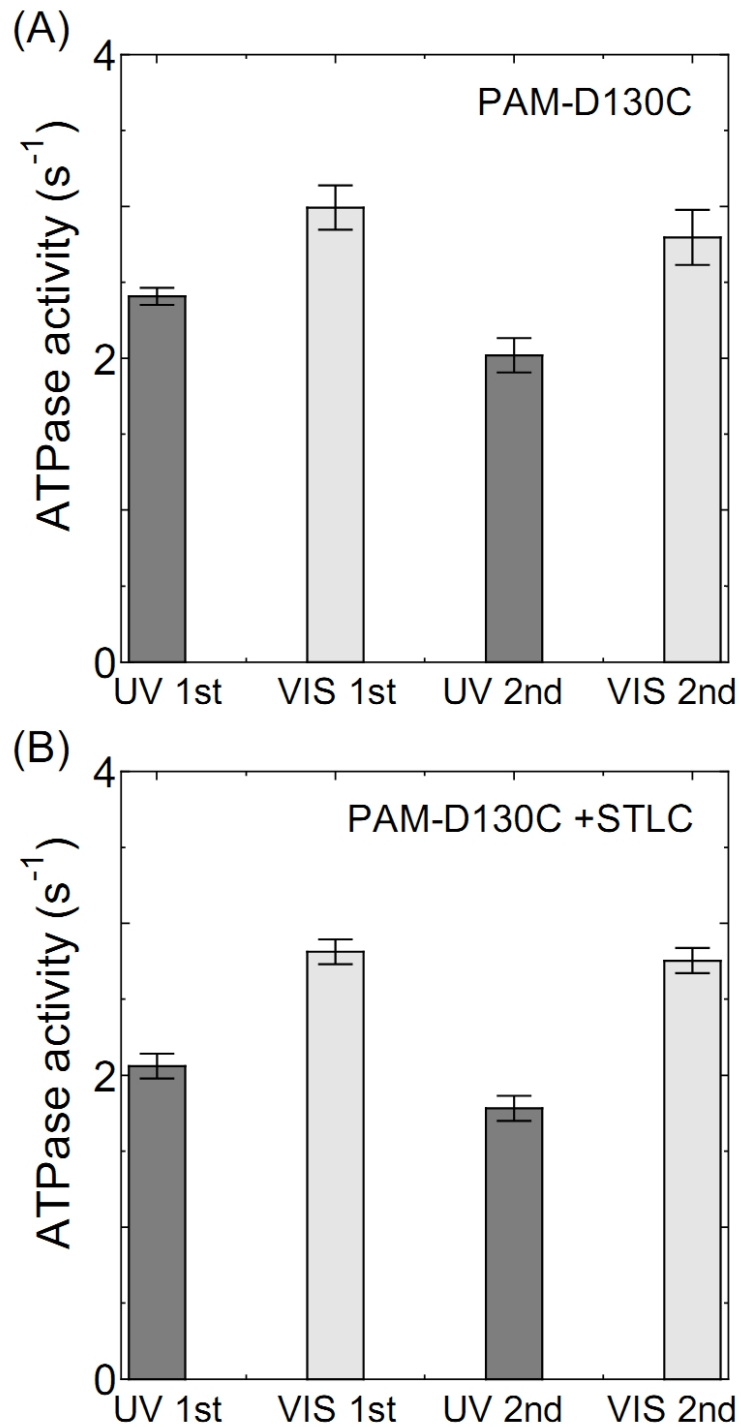


図 3-14 PAM-D130C の ATPase 活性および STLC による阻害効果の可逆的光制御
 (A) 0.1 μM *cis, trans*-PAM-D130C の ATPase 活性を 3 μM 微小管存在下で測定した. (B) STLC による阻害効果を調べるために, 0.1 μM *cis, trans*-PAM-D130C の ATPase 活性を 3 μM 微小管, 50 μMSTLC 存在下で測定した.

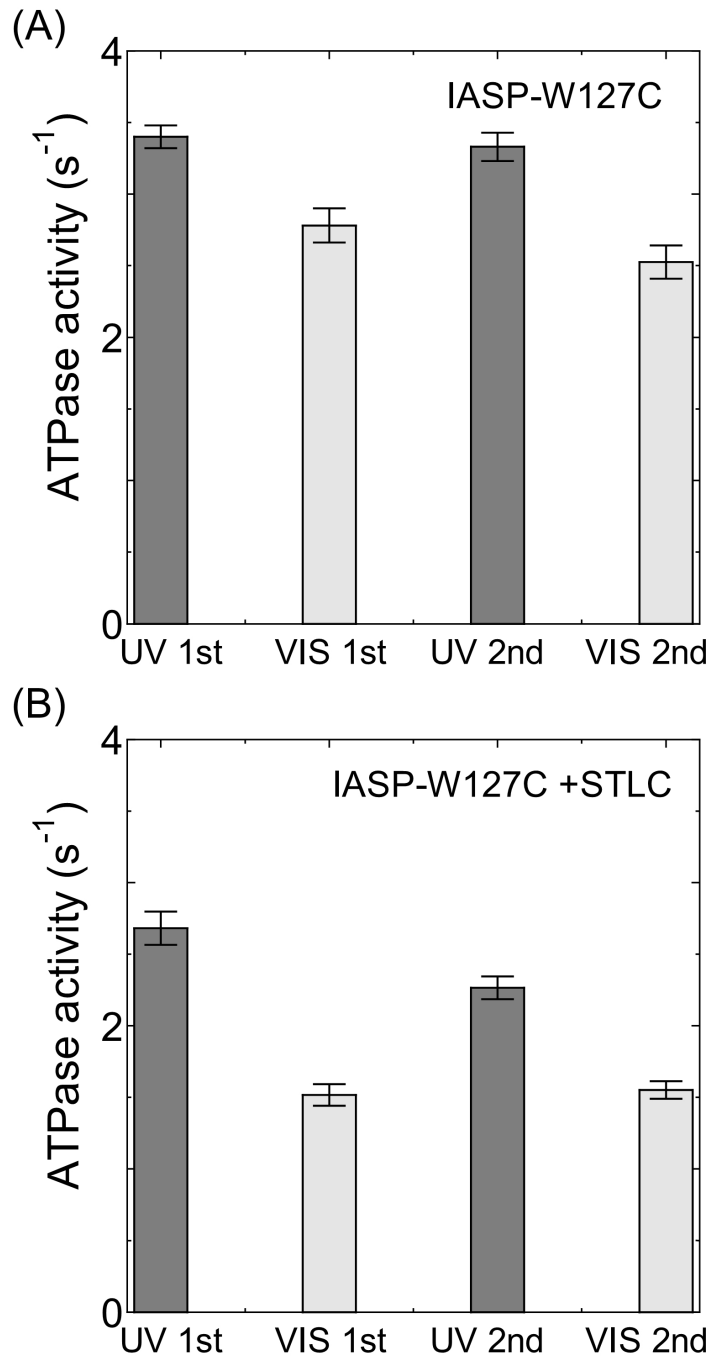


図 3-15 IASP-W127C の ATPase 活性および STLC による阻害効果の可逆的光制御

(A) 0.1 μM MC, SP-IASP-W127C の ATPase 活性を 3 μM 微小管存在下で測定した. (B) STLC による阻害効果を調べるために, 0.1 μM MC, SP-IASP-W127C の ATPase 活性を 3 μM 微小管, 50 μM STLC 存在下で測定した.

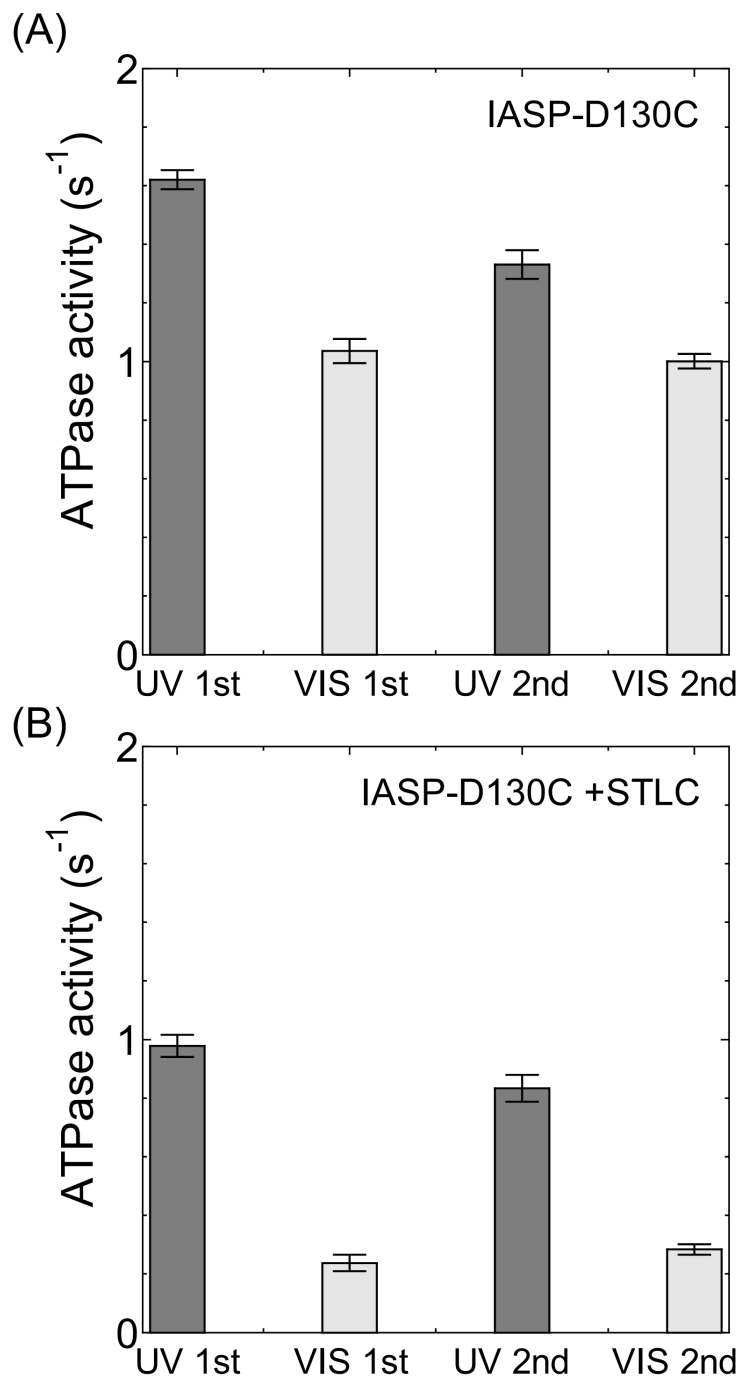


図 3-16 IASP-D130C の ATPase 活性および STLC による阻害効果の可逆的光制御

(A) 0.1 μM MC, SP-IASP-D130C の ATPase 活性を 3 μM 微小管存在下で測定した. (B) STLC による阻害効果を調べるために, 0.1 μM MC, SP-IASP-D130C の ATPase 活性を 3 μM 微小管, 50 μM STLC 存在下で測定した.

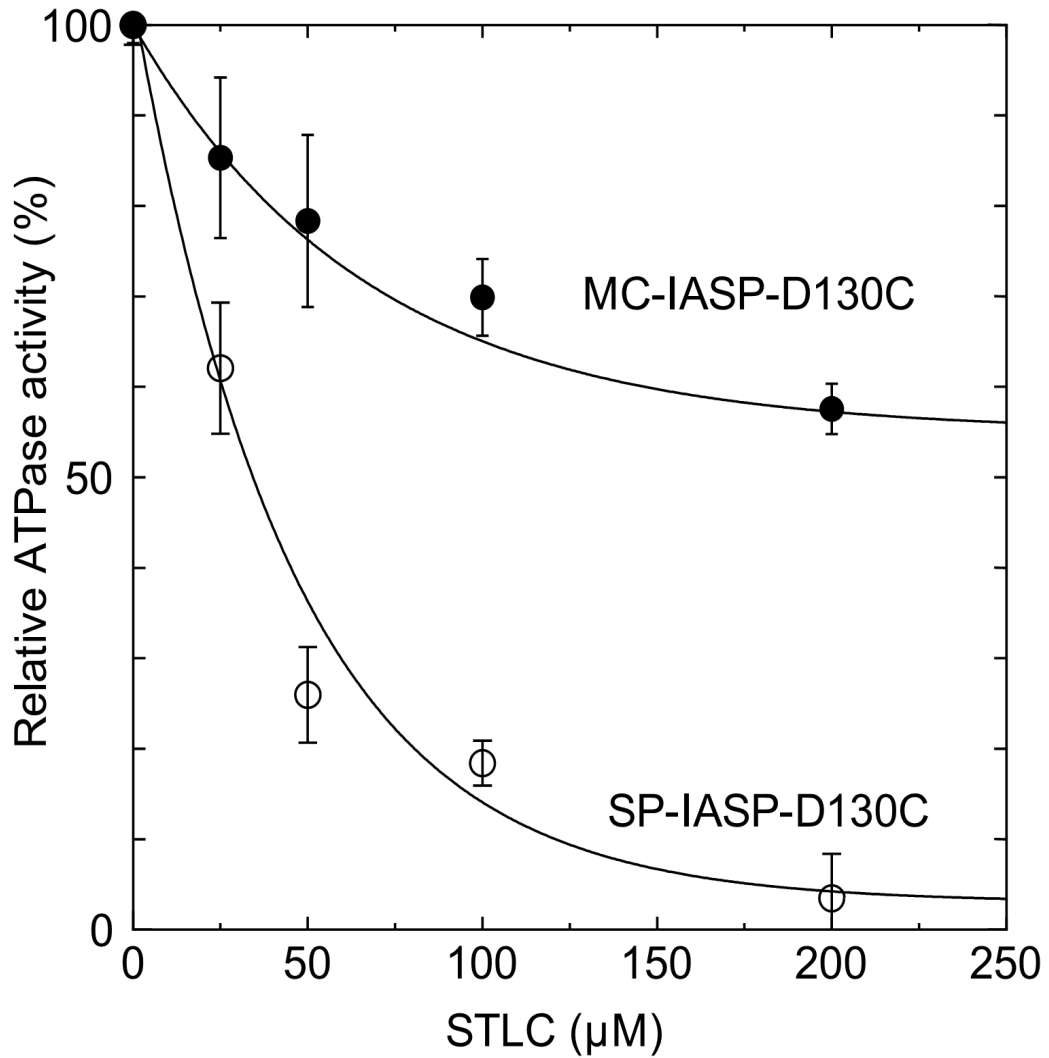


図 3-17 ISAP-D130C の STLC による阻害効果の光制御.

0.1 μM SP-IASP-D130C (○) と MC-IASP-D130C (●) の ATPase 活性を 3 μM 微小管, 0–200 μM STLC 存在下で測定した.

表 3-1 チオール基反応性フォトクロミック分子の Eg5 への修飾効率

Mutants	PAM/Eg5 (mol/mol)	IATAB/Eg5 (mol/mol)	IASP/Eg5 (mol/mol)
E116C	0.70	0.65	0.82
E118C	0.73	0.95	0.82
Y125C	0.83	0.76	0.84
W127C	0.88	0.62	0.76
D130C	0.86	1.09	1.14

表 3-2 フォトクロミック分子を修飾した Eg5 変異体の ATPase 活性

Mutants	unmodified (S ⁻¹)	PAM (S ⁻¹)		IATAB (S ⁻¹)		IASP (S ⁻¹)	
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	SP	MC
E116C	6.70±0.46	4.09±0.30	4.22±0.63	3.71±0.31	3.69±0.31	4.39±0.23	4.48±0.1
E118C	14.15±0.34	5.54±0.31	5.84±0.59	6.26±0.51	6.53±0.02	7.67±0.33	7.60±0.45
Y125C	8.43±0.28	3.94±0.34	4.30±0.1	4.81±0.36	4.7±0.04	4.78±0.18	4.93±0.13
W127C	6.66±0.23	3.90±0.06	3.81±0.53	3.89±0.23	3.83±0.33	2.65±0.18	3.37±0.05
D130C	6.94±0.33	2.89±0.13	2.21±0.27	3.33±0.22	3.08±0.07	1.02±0.024	1.48±0.2

0.1 μM Eg5, 3 μM MT 存在下で ATPase 活性を測定した.

表 3-3 Eg5 の 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
<i>trans</i> -PAM-D130C	4.05±0.29	2.82±0.46
<i>cis</i> -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

V_{max} と K_{MT} は以下の式により求めた.

$$V = V_{max} / (1 + K_{MT} / [\text{microtubules}]).$$

表 3-4 Eg5 に修飾したフォトクロミック分子の光異性化による STLC の阻害定数への影響

<i>K_i</i> (μM)							
<u>W127C</u>	<u>IASP-W127C</u>		<u>D130C</u>	<u>PAM-D130C</u>		<u>IASP-D130C</u>	
	SP	MC		<i>trans</i>	<i>cis</i>	SP	MC
52.0	184.5	555.6	102.2	101.0	194.2	22.2	302.9

第四章

光制御型阻害剤による Eg5 の光制御

4.1 本章の要旨

第四章では、Eg5の特異的阻害剤に、光制御スイッチであるフォトクロミック分子を導入して、光照射により阻害剤による阻害効果を光制御できる光制御型 Eg5阻害剤を開発した。フォトクロミック分子を導入した光制御型阻害剤は、既存の阻害剤 STLC の構造を基に設計、合成した。STLC が有するトリチル基は Eg5 の阻害に重要な部位であるため、トリチル基を基本骨格に、フォトクロミック分子アゾベンゼンを導入した2種類の光制御型阻害剤(BTBA, ACTAB)を合成した。BTBA はアゾベンゼンの両端にトリチル基を有した化合物で、ACTAB はアゾベンゼンの方端にトリチル基を、もう片端に N-acetyl-L-cysteine を有した化合物である。共に、アゾベンゼンを有しているため、光照射によって、その構造を変化させることができる。BTBA も ACTAB も *trans* 体の時により大きな阻害効果を示し、*cis* 体で阻害効果の減少を示し、光制御型阻害剤によって ATPase 活性および Eg5-微小管滑り運動速度を光制御することができた。また、ACTAB は400 nm の可視光線照射で *trans* 体から *cis* 体に、480 nm の可視光線照射で *cis* 体から *trans* 体に光異性化させることができる。可視光線領域の光のみで光制御が可能のため、紫外線照射による生体分子損傷の心配なく細胞への応用が期待できる。

4.2 緒言

有糸分裂キネシン Eg5は、真核生物の細胞分裂の間に、双極紡錘体の形成に必須である (Blangy et al., 1995; Cole et al., 1994)。Eg5の特異的阻害剤が多数発見されており、monastrol は最初に発見された Eg5阻害剤である(Mayer et al., 1999)。S-トリチル-L-システイン(STLC)は、monastrol よりも Eg5に強く結合することが知られている阻害剤である(Skoufias et al., 2006)。これら Eg5の阻害剤の多くは、構造が異なるにもかかわらず、ヌクレオチド結合部位近傍の L5, $\alpha 2$ および $\alpha 3$ から構成された阻害剤結合ポケットに結合することが報告されている(Tcherniuk et al., 2010)。これらの阻害剤は、ヌクレオチド結合部位から ADP の放出を遅く、もしくは阻害し、最終的にはアポトーシスを誘導する(Skoufias et al., 2006)。第三章で、阻害剤結合ポケットを構成する L5にフォトク

ロミック分子を導入することにより、阻害剤 STLC による阻害効果の光制御ができることを明らかにした。鍵穴(L5)の構造が鍵(阻害剤)との相互作用に影響するならば、鍵自体の構造変化も鍵穴との相互作用に影響を与えると考え、第四章では、Eg5の阻害剤、鍵側にフォトクロミック分子を導入し、阻害剤自体の構造および特性を変化させ、Eg5の機能の制御を試みた(図4-1)。フォトクロミック分子は、光照射により *cis* 体と *trans* 体の光異性化することができるため、フォトクロミック分子を導入した阻害剤は、光照射によって、その構造や特性を変化させ、異なった阻害効果を示すと考えられる。

また、Eg5の阻害剤を人工的に制御することは、副作用の少ない抗がん剤の開発にも繋がると期待している。現在、癌治療では、パクリタキセルやビンカアルカロイドなどキネシンが細胞内を移動する際のレールとなる微小管を標的とした抗がん剤が利用されている(Horwitz et al., 1994; Schiff et al., 1980)。しかしながら、細胞形状の維持や細胞内輸送、有糸分裂など生体内において重要な役割を担っている微小管は、増殖細胞、そして非増殖細胞にも存在するため、微小管を標的とした抗がん剤は、がん細胞のように増殖している細胞だけでなく、非増殖細胞に存在する微小管にも影響を与え、神経毒性副作用など、重篤な副作用を伴ってしまう(Cavaletti et al., 1997)。一方、Eg5は、非増殖細胞および成体末梢神経系では発現していないため、神経毒性副作用を伴わない新たな抗がん剤の標的として注目されている(Mayer et al., 1999; Sakowicz et al., 2004; Zhang et al., 2008)。実際に、38種類以上の Eg5阻害剤の第 I, 第 II 相臨床試験が行われ(Rath and Kozielski, 2012), Eg5阻害剤は単剤療法として有効であることが示されている。しかし、Eg5も正常に増殖している細胞には発現している。そこで、人工的に阻害効果を制御できる Eg5阻害剤が開発できれば、さらに副作用の少ない抗がん剤になり得ると考えた。

アゾベンゼンは通常、紫外線、可視光線照射によって光異性化することが知られているが、アゾベンゼンのベンゼン環に結合させた官能基によって、可視光線領域の光のみで光異性化することが可能である(Beharry et al., 2011a)。今回開発した Eg5の光制御型阻害剤を生体内で用いる場合、紫外線照射は生体分子の損傷などの問題が考えられる。そのため、可視光線領域の光で光異性化できる光制御型阻害剤の開発を目指した。

4.3 実験材料と方法

4.3.1 試薬

試薬類は特にことわりのない限り、和光純薬工業(株)の試薬特級を使用した。オリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジー株式会社を利用して合成したものを使用した。制限酵素およびその他の酵素は東洋紡株式会社またはタカラバイオ株式会社のものを使用した。pET21a ベクターおよび大腸菌 BL21(DE3)株は Novagen 社 (Medison, WI) のものを使用した。有機合成に使用した試薬は、和光純薬工業(株)、東京化成工業株式会社、関東化学株式会社、同仁化学研究所のものを使用した。

4.3.2 キネシン Eg5 wild-type の調製法

キネシン Eg5 WT は 2.3.5 と同様の方法で行った。

4.3.3 光制御型阻害剤の合成

4,4'-bis(*N*-(2-(triphenylmethylamino)acetyl)amino)azobenzene [BTBA]は、4,4'-azodianiline と *N*-Tritylglycineのカップリング反応より合成した(図4-2A, 図4-3)。まず、4,4'-azodianiline (158 μmol) と *N*-Tritylglycine (948 μmol) をEDC/HOAt法によって、10 mL DMF中で結合させた。この溶液を室温で24時間、攪拌し反応を進行させた。翌日、一日攪拌した反応液に40 mLの冷水を加え、高速遠心(30,000 $\times g$, 20 min, 4°C)し、合成できたBTBAを沈殿、回収した。回収したBTBAをDMFにとかし、シリカゲルを詰めた(ultra-pure Wakogel C-200)オープンカラムクロマトグラフィーにアプライし溶出buffer (1% methanol, 99% chloroform)で、溶出、精製した。精製後、薄層クロマトグラフィー(Silica gel 70 F254, Wako, 溶媒:1% methanol 99% chloroform)を用いて純度を確認した。BTBAのRf値は0.17である。溶出したBTBAは、ロータリーエバポレーターを使用して、溶媒を

飛ばし, 乾燥させた.

4-(*N*-(2-(*N*-acetylcystein-*S*-yl)acetyl)amino)-4'-(*N*-(2-(*N*-(triphenylmethyl)amino)acetyl)amino)azo benzene [ACTAB]は, 4,4'-azodianiline と *N*-Tritylglycine, iodoacetic anhydride として *N*-acetyl-L-cysteine のカップリング反応により合成した(図4-2B, 図4-4). まず, 4,4'-azodianiline (158 μmol) と *N*-Tritylglycine (158 μmol) を EDC/HOAt 法によって, 2.5 mL DMF 中で結合させた. この溶液を室温で24時間, 攪拌し反応を進行させた. 翌日, 一日攪拌した反応液に32.5 mL の冷水を加え, 高速遠心(30,000 $\times g$, 20 min, 4°C)し, 4,4'-azodianiline と *N*-Tritylglycine が結合した化合物Aを沈殿, 回収した. 回収した化合物AをDMFにとかし, シリカゲルを詰めた(ultra-pure Wakogel C-200)オープンカラムクロマトグラフィーにアプライし精製した. 化合物Aは, 溶出buffer (1% methanol, 99% chloroform)で溶出させた. 溶出した化合物Aは, ロータリーエバポレーターを使用して, 溶媒を飛ばし, 乾燥させた. 次に, 乾燥した化合物A(100 μmol) と iodoacetic anhydride (250 μmol), 触媒である2% *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine を 5.8 mL THF に加え, 室温で24時間, 攪拌し結合させた. 翌日化合物Aと iodoacetic anhydride が結合して完成した化合物B(第三章の IATAB と同一化合物)を分取用薄層クロマトグラフィー(PLC Silica gel 60 2mm, Merck Millipore, 溶媒: 5% methanol 95% chloroform)を用いて, 精製した. 乾燥させた化合物B (20 μmol) を DMF に溶かし, 200 mM tetraethylammonium hydrogen carbonate (pH7.5)に溶かした iodoacetic anhydride (200 μmol) と 500 μl ethanol 中で反応させた. この溶液を室温で24時間, 攪拌し反応を進行させた. 翌日, 合成された ACTAB を分取用薄層クロマトグラフィー(PLC Silica gel 60 2mm, Merck Millipore, 溶媒: 20% methanol 80% chloroform)を用いて, 精製した. 精製後, 薄層クロマトグラフィー(Silica gel 70 F254, Wako, 溶媒: 20% methanol 80% chloroform)を用いて純度を確認した. ACTAB の R_f 値は 0.29 である.

4.3.4 光制御型阻害剤の光異性化

DMF に溶かした BTBA と ACTAB に, アーク光源とバンドパスフィルター(Lambda DG-5 Plus, Sutter Instrument, Novato, CA, USA)を用いて, 溶媒表面から 7 cm の位置から, 室温で光照射し,

光異性化を行った。BTBA は、380 nm と 480 nm の光を、ACTAB は 400 nm と 480 nm の光を一定時間照射した後、吸収スペクトルを測定し、光異性化を確認した。DMF 中で光異性化した光制御型阻害剤を、ATPase 活性および *In vitro* motility assay の系に加えて、阻害効果を確認した。

4.3.5 光制御型阻害剤の阻害効果測定法

光制御型阻害剤の阻害効果を調べるために、光制御型阻害剤濃度依存性の Eg5ATPase 活性を測定した。BTBA による阻害効果の測定は、微小管非存在下では、0.25 μM の Eg5 と 0-100 μM の光異性化した BTBA を ATPase assay buffer (20 mM HEPES pH 7.2, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, and 1 mM β -mercaptoethanol) 中で室温で 5 分インキュベートしてから反応を開始した。微小管存在下での測定は、0.1 μM の Eg5 を 3 μM の微小管と ATPase assay buffer 中で室温で 5 分インキュベートしたあと、0-100 μM の光異性化した BTBA を加えてから反応を開始する方法と、0.1 μM の Eg5 を 0-100 μM の光異性化した BTBA と ATPase assay buffer 中で室温で 5 分インキュベートしたあと、3 μM の微小管を加えてから反応を開始する方法の 2 通り行った。いずれも、ATP の加水分解は、2 mM ATP を加えることにより開始し、10% trichloroacetic acid を加えて停止した。キネシンによって加水分解された ATP の濃度は、加水分解によって放出された遊離リン酸の濃度を Youngburg 法により定量した (Youngburg and Youngburg, 1930)。

ACTAB による阻害効果の測定は、微小管非存在下では、0.5 μM の Eg5 と 0-50 μM の光異性化した ACTAB を ATPase assay buffer 中で室温で 5 分インキュベートしてから反応を開始した。微小管存在下での測定方法は BTBA と同様である。

ACTAB 存在下での K_{MT} and V_{max} を求めるために、15 μM *cis*-ACTAB もしくは *trans*-ACTAB 存在下で、微小管濃度依存性 ATPase 活性(0-10 μM 微小管) を測定した。

4.3.6 蛍光標識微小管調製法

キネシンが微小管を移動させる現象を顕微鏡で観察するため、蛍光色素であるローダミンを標識した蛍光標識微小管を調製した。まず、ローダミンが標識できるように、豚脳から調製した微小管に結合した微小管結合蛋白質 (MAPs) を取り除き、MAPs free tubulin を調製した。微小管を R-PEM Buffer (0.1M PIPES, 1.0mM EGTA, 0.5mM MgCl₂, pH 6.9, 1mM GTP, 10% DMSO) で 10-20 mg/mL に希釈し、37 °C で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、超遠心 (37 °C, 20,000×g, 20 min) を行い、MAPs を含んでいる上澄みを取り除いた。沈殿量を見積もって、沈殿量の 2-4 倍量の氷冷 R-PEM Buffer で懸濁し、0 °C で 10 分間インキュベートした。その後、1mM GTP, 10% DMSO を加えて、37 °C で 10 分間インキュベートし、MAPs free tubulin を調製した。

調製した MAPs free tubulin を Rhodamine-NHS (Thermo Scientific) と 1:20 (mol/mol) で混ぜ、37 °C で 10 分間インキュベートし反応させた。反応は 5 mM potassium glutamate を加えて止めた。蛍光標識微小管精製工程 (超遠心 (37 °C, 20,000×g, 20 min) を行い、上澄みを取り除いた後、沈殿量の 5 倍量の氷冷 R-PEM Buffer で再懸濁し、0 °C で 10 分間インキュベートした。さらに、超遠心 (4°C, 20,000×g, 20 min) を行い、沈殿した不溶性蛋白質と非反応ローダミンを取り除いた。上澄みに 1mM GTP, 10% DMSO を加えて、37 °C で 10 分間インキュベートし、超遠心 (37 °C, 20,000×g, 20 min) を行った。) を 2 回繰り返す。最後に上澄みを取り除いた後、沈殿量の 5 倍量の氷冷 R-PEM Buffer で再懸濁して、0 °C で 10 分間インキュベートした。最後にローダミンの標識効率を決定した。ローダミンの濃度を 575 nm のモル吸光係数 80,000 M⁻¹cm⁻¹ から求め、微小管の濃度を Biuret 法を用いて求め、標識効率が 30-50% の範囲であることを確認し、急速凍結した後、-80 °C で保存した。

蛍光標識微小管を使用する際は、1 µl のローダミン標識 tubulin と 5 µl の MAPs free tubulin を混ぜ、1 mM GTP を加えて、遮光条件のもと、37 °C で 40 分間インキュベートして重合させてから使用した。重合反応は 120 µl PM buffer (100 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) に 20 M の taxol を加えた溶液 120 µl を静かに加えて、ピペッティングして止めた。重合完了後も使用する直前まで、遮光して 37°C で保存した。

4.3.7 微小管-キネシン間の滑り速度測定 (*In vitro* motility assay)

微小管-キネシン間の滑り速度測定は, Howard らの手法(Howard et al., 1989)にしたがって測定した. あらかじめ assay buffer A(10 mM Tris-acetate (pH7.5), 50 mM K-acetate, 2.5 mM EGTA, 4 mM MgSO₄)で 30 倍希釈した 6 × histidinen monoclonal antibody (clone No.21-48) をフローチャンバーに流し入れ, 5 分, 室温でインキュベートした. その後, 0.1 μM Eg5 MD を含む assay buffer A をフローチャンバーに流し入れ, 5 分, 室温でインキュベートし, 6 × histidinen monoclonal antibody の上に Eg5 MD を結合させた. assay buffer A でフローチャンバーを洗い流し, 蛍光標識微小管を含む assay buffer B (assay buffer A, 20 μM taxol) を流し入れ, 2 分, 室温でインキュベートした. assay buffer B でフローチャンバーを洗い流し, 1 mM ATP を含む assay buffer C (assay buffer B, 1.5 mg/mL glucose, 0.01 mg/mL catalase, 0.05 mg/mL glucose oxidase)を流し入れ, 蛍光標識微小管を Olympus BX50 蛍光顕微鏡(オリンパス, Tokyo, JPN)と 3CCD カメラ JK-TU53H (東芝, Tokyo, JPN)を用いて観察した. 阻害実験の場合は, 光異性化した光制御型阻害剤を 1 mM ATP を含む assay buffer C に加えて, フローチャンバーに流し入れ測定した. DMF の最終濃度は BTAB 測定時は 3%, ACTAB 測定時は 3.8%である.

4.3.8 統計分析

In vitro motility assay 統計的有意性は, Welch's t test もしくは Student's t test のいずれかを用いて分析した. P 値が 0.05 未満の場合, 統計的に有意性があると考えられる.

4.4 結果と考察

4.4.1 光制御型 Eg5 阻害剤の設計と合成

Eg5の阻害剤である STLC の構造を基に, 光制御スイッチであるフォトクロミック分子を導入した2種類の光制御型阻害剤(BTBA, ACTAB)を設計, 合成した. STLC はトリチル基部位とシステイン

部位から成る阻害剤で(図3-9A),トリチル基部位とシステイン部位は,それぞれ阻害剤結合ポケットの異なるアミノ酸と相互作用して,ポケットに入り込むことが分かっている.トリチル基部位は,E116, G117, E118, W127, そして D130と(Abualhasan et al., 2012),システイン部位は, Gly117, Glu116 そして Arg221と相互作用する(Wang et al., 2012)ため,それぞれが阻害効果に重要な部位である.特に,STLCトリチル基はEg5を強く阻害するために重要であるという報告がある(Ogo et al., 2007;Wang et al., 2012).そして,STLCのシステイン部位はSTLCの溶解度を増加させ,STLCの阻害剤結合ポケットへの結合を安定化させる作用がある.そこで,フォトクロミック分子であるアゾベンゼンとトリチル基そしてシステイン部位を組み合わせた光制御型STLCアナログ(BTBA, ACTAB)を合成した.

BTBAは,フォトクロミック分子であるアゾベンゼンの両端にSTLCのトリチル基を結合させた化合物である(図4-2A).アゾベンゼンが *trans* 体の時は,両端に結合したトリチル基はそれぞれ離れて位置し,阻害剤結合ポケットにどちらかのトリチル基が入り込み,Eg5の活性を阻害すると考えた.そして,アゾベンゼンが *cis* 体の時は,2つのトリチル基が近接して位置するため,阻害剤結合ポケットに入り込めず,Eg5を阻害しないのではないかと考えた(図4-5).ACTABはアゾベンゼンの片端にトリチル基を,もう片端にシステイン部位としてN-acetyl-l-cysteineを有した化合物である(図4-2B).光照射により,アゾベンゼンの構造変化に伴い,異なる阻害剤結合ポケットへの親和性を示すと考えた.合成は,いずれも実験材料と方法に記載した通り行った.

4.4.2 光制御型 Eg5阻害剤の特徴

trans-BTBA と *cis*-BTBA の吸収スペクトルを図4-6に示した.20% DMF に溶かした BTBA は 380 nm に吸収極大を有するため,光異性化の確認には,380 nm 付近の波長を観察して行った.40分間の380 nm の紫外線照射により,*trans*-BTBA は *cis*-BTBA へ,10分間の480 nm の可視光線照射により,*cis*-BTBA は *trans*-BTBA への光異性化が完了した.

trans-ACTAB と *cis*-ACTAB の吸収スペクトルを図4-7に示した.100% DMF に溶かした ACTAB は380 nm に吸収極大を有するため,光異性化の確認には,380 nm 付近の波長を観察し

て行った. 100秒間の400 nm の可視光線照射により, *trans*-ACTAB は *cis*-ACTAB へ, 100秒間の480 nm の可視光線照射により, *cis*-ACTAB は *trans*-ACTAB への光異性化が完了した.

BTBA は水への溶解度が低いため, あらかじめ水を含んだ溶媒に溶かしておかなければ, 後の活性測定の際に, 不具合だったため, 20%DMF に溶解させた. ACTAB はシステインを結合させた分, BTBA に比べて水への溶解度が上がった. ACTAB は380 nm の紫外線照射でも *cis* 体へと光異性化するが, 可視光線領域の400 nm でも *cis* 体になった. 可視光線領域の400 nm でも *cis* 体に光異性化する ACTAB は, 光制御型阻害剤を生体内で用いる際に問題となる, 紫外線による生体分子の損傷という点が解決でき, さらに, 水への溶解度も高いため, 細胞や生体内への応用が期待できる.

4.4.3 BTBA による阻害効果の光制御

BTBA が Eg5の阻害剤として機能するかどうか, 調製したマウス Eg5 WT の ATPase 活性を BTBA 存在下で測定した. 光照射によって, *trans* 体, *cis* 体となった BTBA を0-100 μM の濃度になるように加え, 濃度依存的に Eg5の活性が阻害されることを確認した. まず, 微小管非存在下での阻害効果を観察した(図4-8). *trans*-BTBA は, $K_{\min}=0.033 \text{ S}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 15.9 \mu\text{M}$ を, *cis*-BTBA は, $K_{\min} = 0.062 \text{ S}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 11.0 \mu\text{M}$ を示した. K_{\min} は BTBA によって阻害効果が飽和した際の活性値である. 微小管非存在下では, *trans*-BTBA が *cis*-BTBA よりも大きな阻害効果を示した. この阻害効果は, 2度にわたる紫外線, 可視光線照射によって可逆的に起こった(図4-9). これは, BTBA 設計の際に予想したとおり, アゾベンゼンが *trans* 体のときにトリチル基が離れて位置するため, *cis* 体のときよりも, どちらかのトリチル基が阻害剤結合ポケットに入り込みやすく, より強く Eg5の活性を阻害したと考えられる.

次に, 微小管存在下での阻害効果を調べた. 微小管存在下での阻害剤の効果を調べる方法として2通り試した. 1通り目は, まず, Eg5と阻害剤を結合させておき, そのあと微小管を加えて ATPase 活性を測定した. この結果, 図4-10に示すように, *trans*-BTBA は, $K_{\min}= 0.56 \text{ S}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 15.7 \mu\text{M}$ を, *cis*-BTBA は, $K_{\min}= 0.67 \text{ S}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 13.2 \mu\text{M}$ を示した. BTBA は微小管存在下で阻

害剤としては機能したが、光制御には至らなかった。測定方法の2通り目は、まず、Eg5と微小管を結合させておき、そのあと阻害剤を加えて ATPase 活性を測定した。すると、図4-11に示すように、BTBA を100 μM 加えても、ほとんど Eg5の活性は下がらなかった。このことから、BTBA は微小管が結合した Eg5には、結合できないのではないかと考えられる。既存の阻害剤 STLC は、微小管非存在下、存在下の両方で Eg5を阻害することがわかっており、微小管非存在下では $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ 、微小管存在下では $\text{IC}_{50} = 140 \text{ nM}$ を示す。また、Eg5と微小管を結合させた後、STLC を加えても阻害した。これらの結果から、BTBA は阻害剤として、また光制御型阻害剤としては不十分であった。しかし、L5と Eg5の微小管結合部位が正反対に位置することから、微小管と結合した Eg5に対して、阻害効果を示さなかった結果は、BTBA が L5ではなく Eg5の微小管結合部位に結合するタイプの阻害剤となった可能性を秘めている。最近になって、L5から成る阻害剤結合部位にも、微小管結合部位近傍の $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ にも結合する阻害剤が発見されており(Ulaganathan et al., 2013), 大変興味深い結果となった。今後、結合部位の同定を行う必要がある。

4.4.4 ACTAB による阻害効果の光制御

BTBAと同様に、ACTAB が Eg5の阻害剤として機能するかどうか、第一章で調製したマウス Eg5 WT の ATPase 活性を ACTAB 存在下で測定した。光照射によって、*trans* 体、*cis* 体となった ACTAB を0-50 μM の濃度になるように加え、濃度依存的に Eg5の活性が阻害されることを確認した。まず、微小管非存在下での阻害効果を観察した(図4-12)。*trans*-ACTAB は $\text{IC}_{50} = 8.1 \mu\text{M}$ を、*cis*-ACTAB は $\text{IC}_{50} = 16.5 \mu\text{M}$ で、微小管非存在下では、*trans*-ACTAB が *cis*-ACTAB よりも大きな阻害効果を示した。この阻害効果は、3度にわたる紫外線、可視光線照射によって可逆的に起こり、25 μM ACTAB 存在下で、*trans*-ACTAB は *cis*-ACTAB より63.8%大きな阻害効果を示した(図4-13)。

次に、微小管存在下での阻害効果を調べた。微小管存在下では、*trans*-ACTAB は $\text{IC}_{50} = 5.2 \mu\text{M}$ を、*cis*-ACTAB は $\text{IC}_{50} = 9.1 \mu\text{M}$ を示した(図4-14)。この阻害効果は、3度にわたる紫外線、可視光線照射によって可逆的に起こり、15 μM ACTAB 存在下で、*trans*-ACTAB は *cis*-ACTAB より

44.2%大きな阻害効果を示した(図4-15). ACTAB は STLC と同様, 微小管が結合した Eg5 にも阻害効果を示した.

光制御型阻害剤 ACTAB によって, 微小管非存在下, 存在下での Eg5 の活性を光制御することができることが明らかになった. また, ACTAB は Eg5 との親和性も高く, 既存の Eg5 阻害剤 monastrol の微小管存在下での $IC_{50} = 17\mu M$ 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(Brier et al., 2006).

ACTAB は, 親和性も高く, 光異性化によって大きな差が見られたため, *cis*-ACTAB, *trans*-ACTAB 存在下での V_{max} と K_{MT} を求めた(表4-1). *cis*-ACTAB と *trans*-ACTAB は同程度の K_{MT} を示したが, *trans*-ACTAB の V_{max} は *cis*-ACTAB の V_{max} と比較して明らかに減少した(図4-16). これらの結果から, ACTAB の光異性化によって ATP 最大加水分解速度が光制御できることが明らかになった.

4.4.5 光制御型阻害剤による Eg5-微小管滑り運動の光制御

蛍光顕微鏡下で, 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 BTBA, ACTAB をそれぞれ, 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, 微小管滑り速度の変化を測定した. BTBA 非存在下での微小管滑り速度は 40.0 ± 3.8 nm/s であった. 図4-17に示すように, BTBA は滑り速度の減少はもたらしたものの, *trans*, *cis* 体で滑り速度に変化は見られなかった. *trans*-BTBA は平均速度 37.5 ± 5.2 nm/s, *cis*-BTBA は平均速度 38.2 ± 5.7 nm/s を示した. これは, Eg5 の活性で観察された結果と一致しており, 微小管存在下では BTBA の光異性化にかかわらず, Eg5 の活性は同程度の阻害効果を示した. これらの結果から, BTBA は Eg5 の阻害剤としては有効であるが, 光制御型阻害剤としては不十分であることが分かった.

次に, 光異性化した ACTAB による微小管滑り速度への影響を調べた. ACTAB 非存在下での微小管滑り速度は 31.5 ± 1.8 nm/s であった. 図4-18に示すように, *trans*-ACTAB と *cis*-ACTAB で

異なる滑り速度が観察された。ACTAB 非存在下に比べて、滑り速度が減少した微小管が観察され、*trans*-ACTAB は平均速度 24.6 ± 2.2 nm/s, *cis*-ACTAB は平均速度 31.6 ± 4.2 nm/s を示した。ACTAB は微小管存在下での Eg5 活性測定でも、*trans* 体のときにより大きな阻害効果を示しており、さらに微小管滑り運動も大きく阻害することが確認できた。BTBA と ACTBA で光制御型阻害剤非存在下での速度が異なるのは DMF 最終濃度の影響である。

4.5 第四章のまとめ

Eg5 の阻害剤にフォトクロミック分子を導入し、光照射によって阻害効果が制御可能な光制御型阻害剤の開発を行った。既存の Eg5 阻害剤 STLC の構造を基に、フォトクロミック分子であるアゾベンゼンを導入した 2 種類の光制御型 STLC アナログ (BTBA, ACTAB) を合成した。ACTAB は光照射によって、Eg5 の活性および微小管滑り運動を制御できることを明らかになった。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必要であり、タンパク質は **native** なものを使用できることが利点である。また、ACTAB は 400 nm と 480 nm の可視光線領域の光でのみ光制御可能なため、紫外線による生体分子損傷の心配がない。今後、*in vivo* でのナノデバイスとしての利用だけでなく、細胞内への応用が期待できる。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。

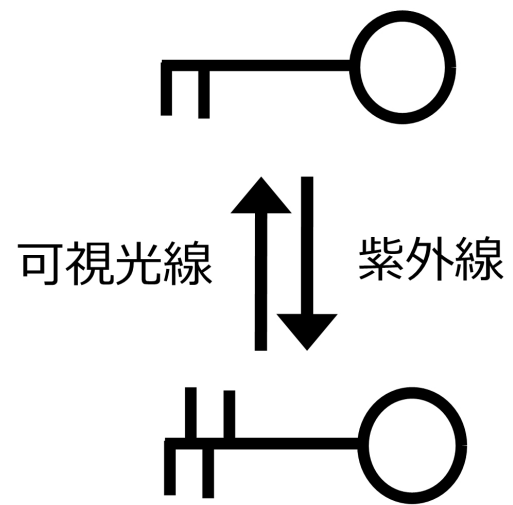
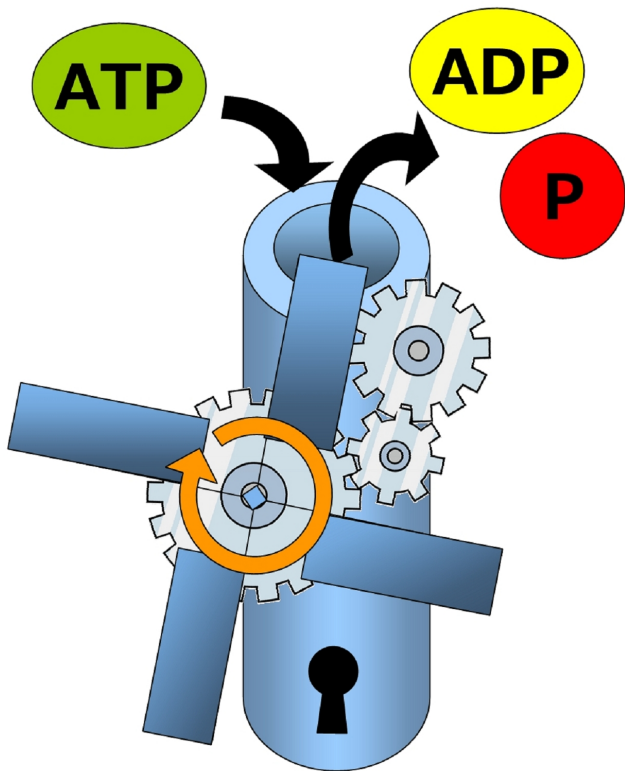


図 4-1 「阻害剤 = 鍵」を利用した Eg5 の制御

Eg5 の阻害剤にフォトクロミック分子を導入し、阻害剤自体の構造および特性を光照射により変化させ、Eg5 の機能の光制御を試みた

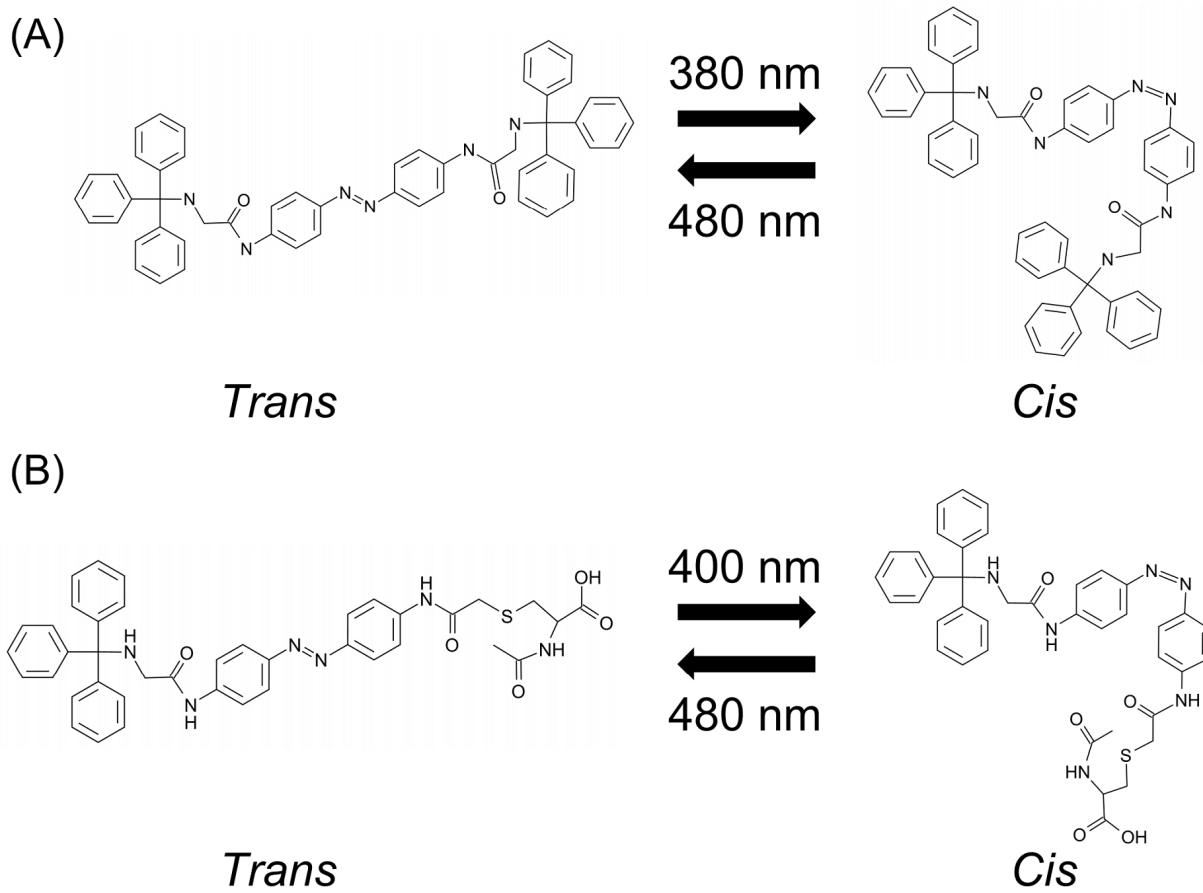


図 4-2 光制御型 Eg5 阻害剤の構造式
 (A) BTBA, (B) ACTAB

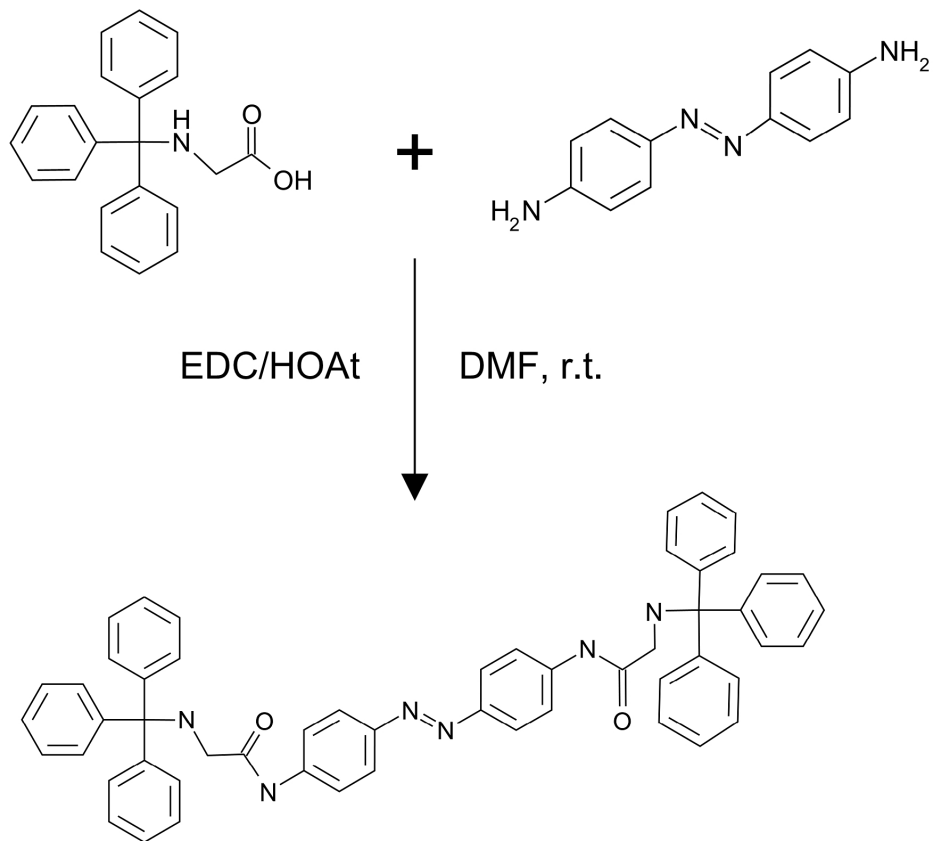


図 4-3 光制御型 Eg5 阻害剤 BTBA の合成法

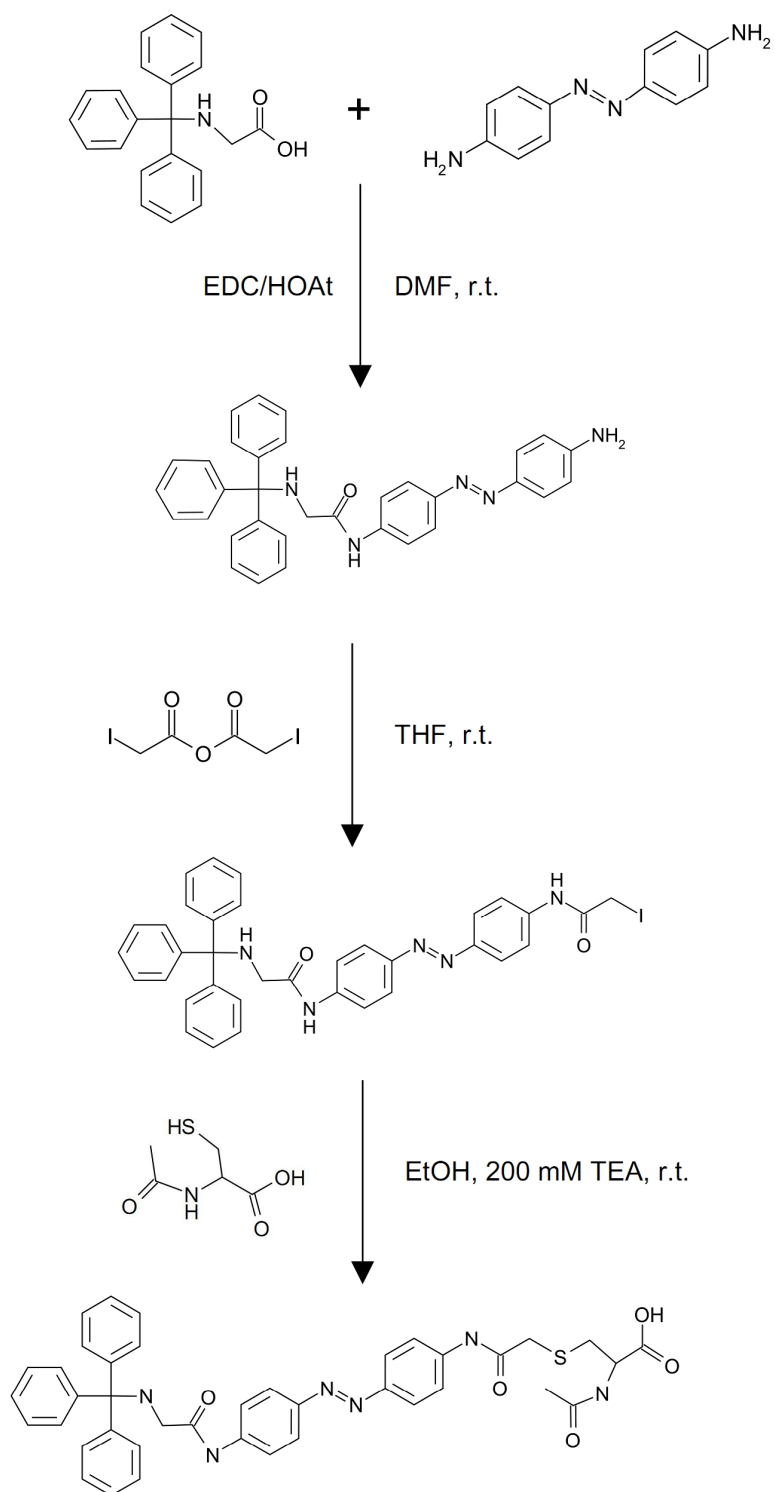


図 4-4 光制御型 Eg5 阻害剤 ACTAB の合成法

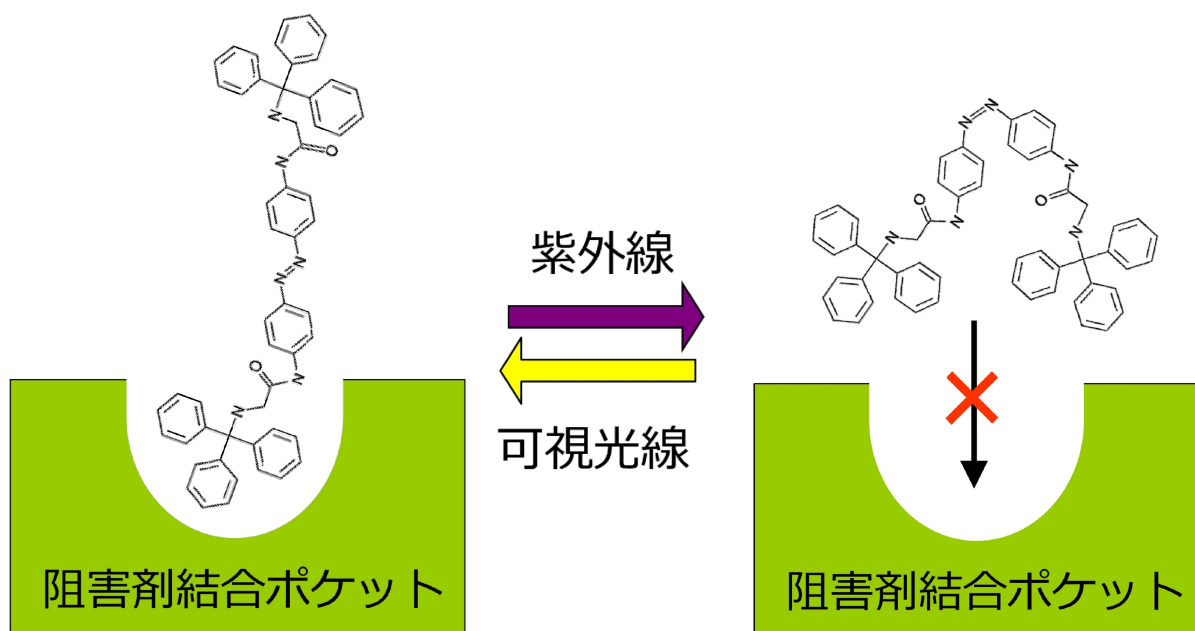


図 4-5 BTBA の光異性化に伴う光制御のモデル

アゾベンゼンが *trans* 体の時は、両端に結合したトリチル基はそれぞれ離れて位置し、阻害剤結合ポケットにどちらかのトリチル基が入り込み、Eg5 の活性を阻害する。反対に、アゾベンゼンが *cis* 体の時は、2 つのトリチル基が近接して位置するため、阻害剤結合ポケットに入り込めず、Eg5 を阻害しない。

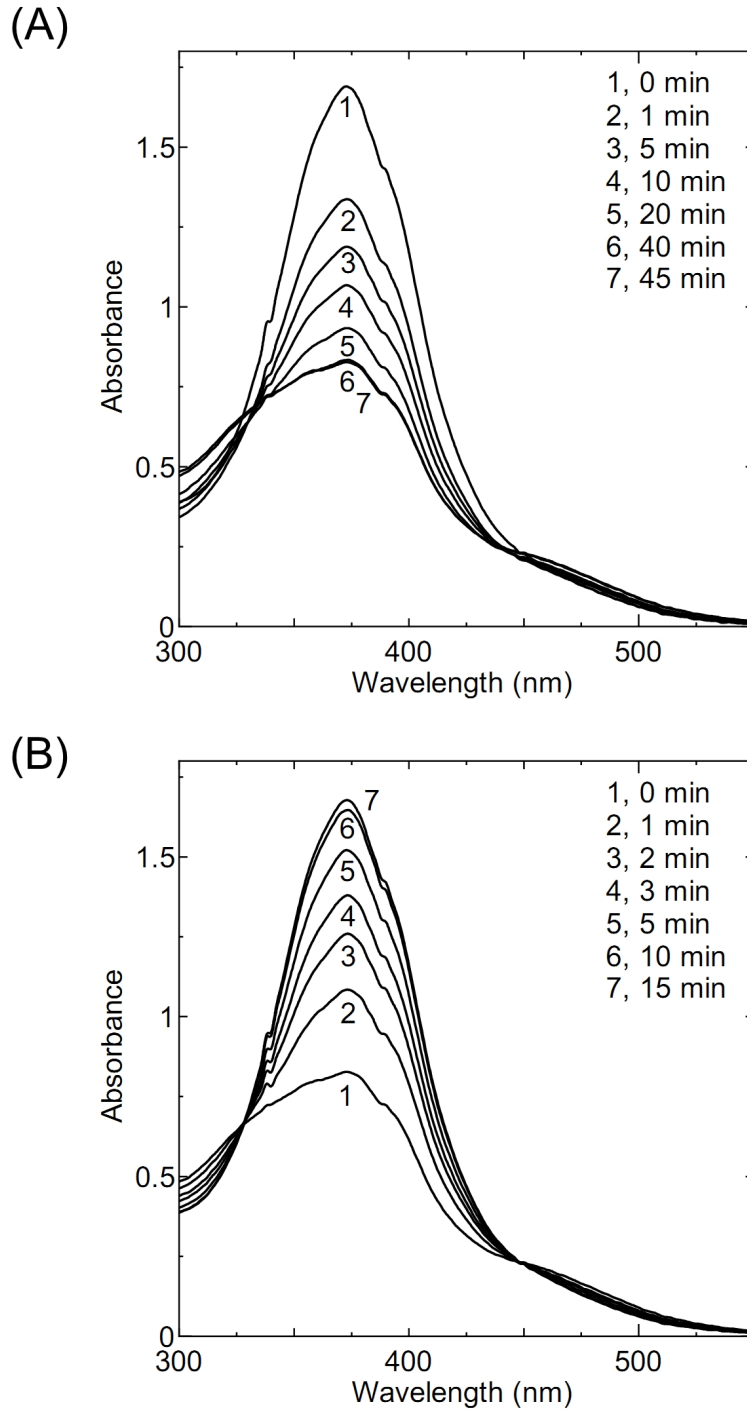


図 4-6 光制御型 Eg5 阻害剤 BTBA の光異性化

(A) *trans*-BTBA (75 μ M) は 40 分間の紫外線 (366 nm) 照射により *cis*-BTBA に光異性化した。

(B) *cis*-BTBA (75 μ M) は、10 分間の可視光線照射により *trans*-BTBA に光異性化した。

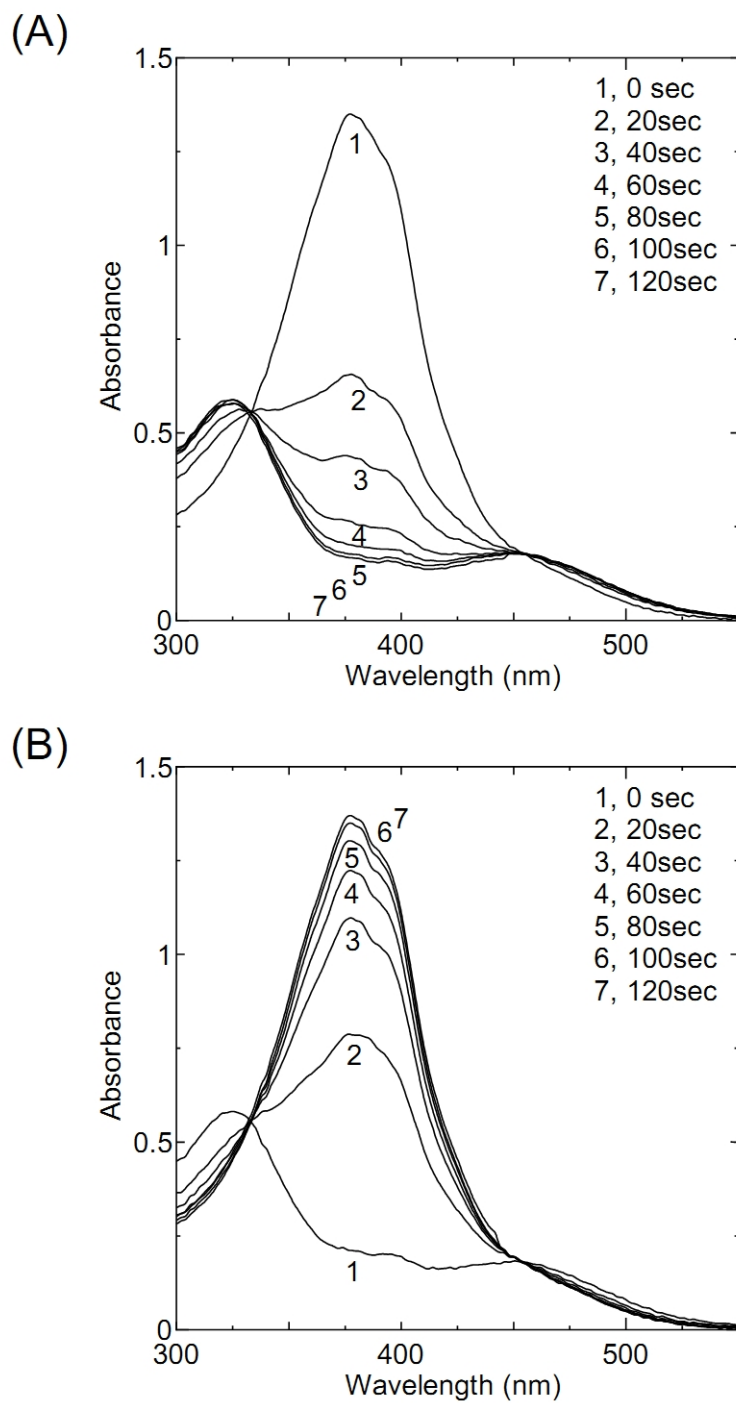


図 4-7 光制御型 Eg5 阻害剤 ACTAB の光異性化

(A) *trans*-ACTAB(60 μ M)は 100 秒間の紫外線(366 nm)照射により *cis*-ACTAB に光異性化した。

(B) *cis*-ACTAB(60 μ M)は, 100 秒間の可視光線照射により *trans*-ACTAB に光異性化した。

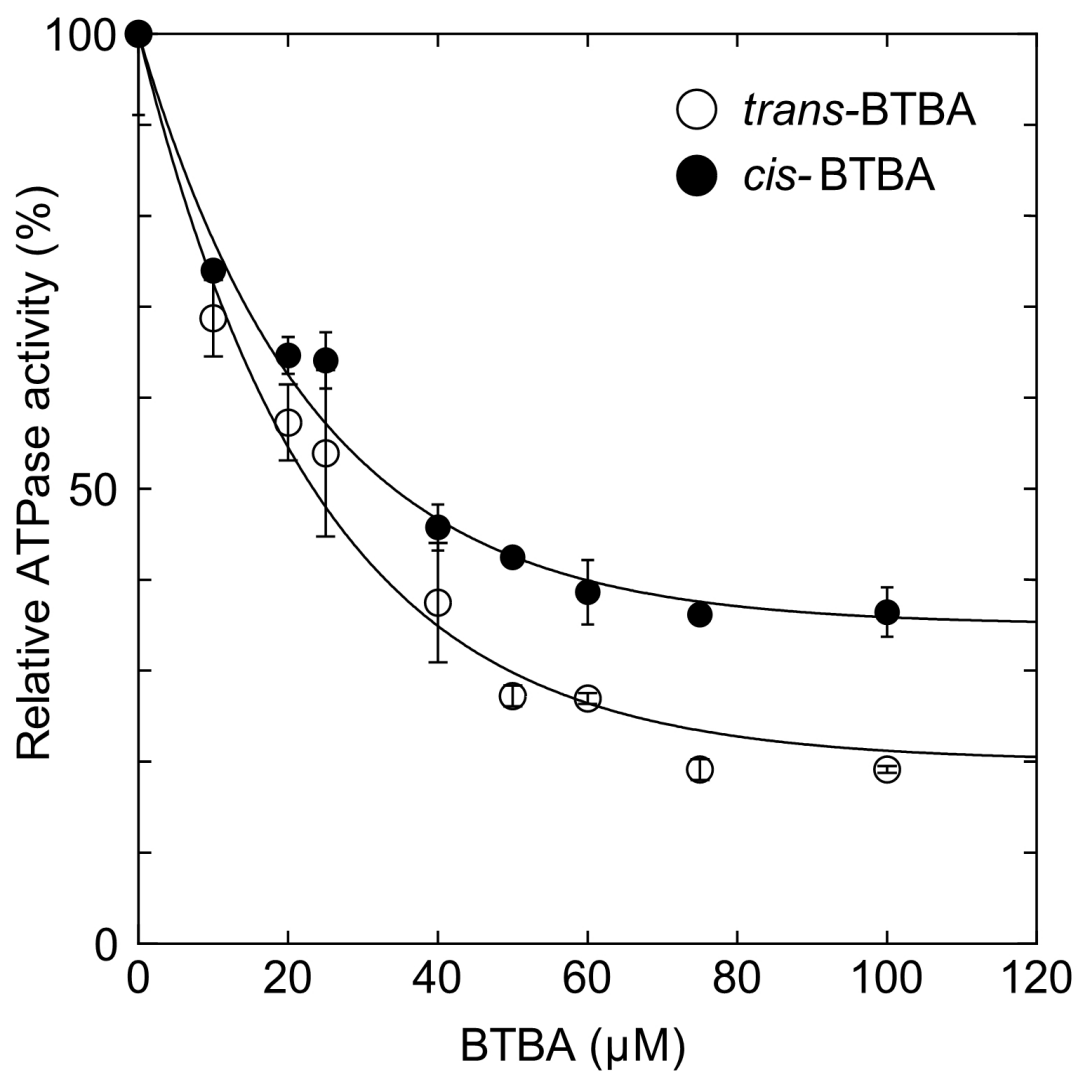


図 4-8 BTBA による Eg5 basal ATPase 活性の光制御.

0.25 μM Eg5 の basal ATPase 活性を, 0-100 μM の *trans*-BTBA(○) もしくは *cis*-BTBA (●)存在下で測定した.

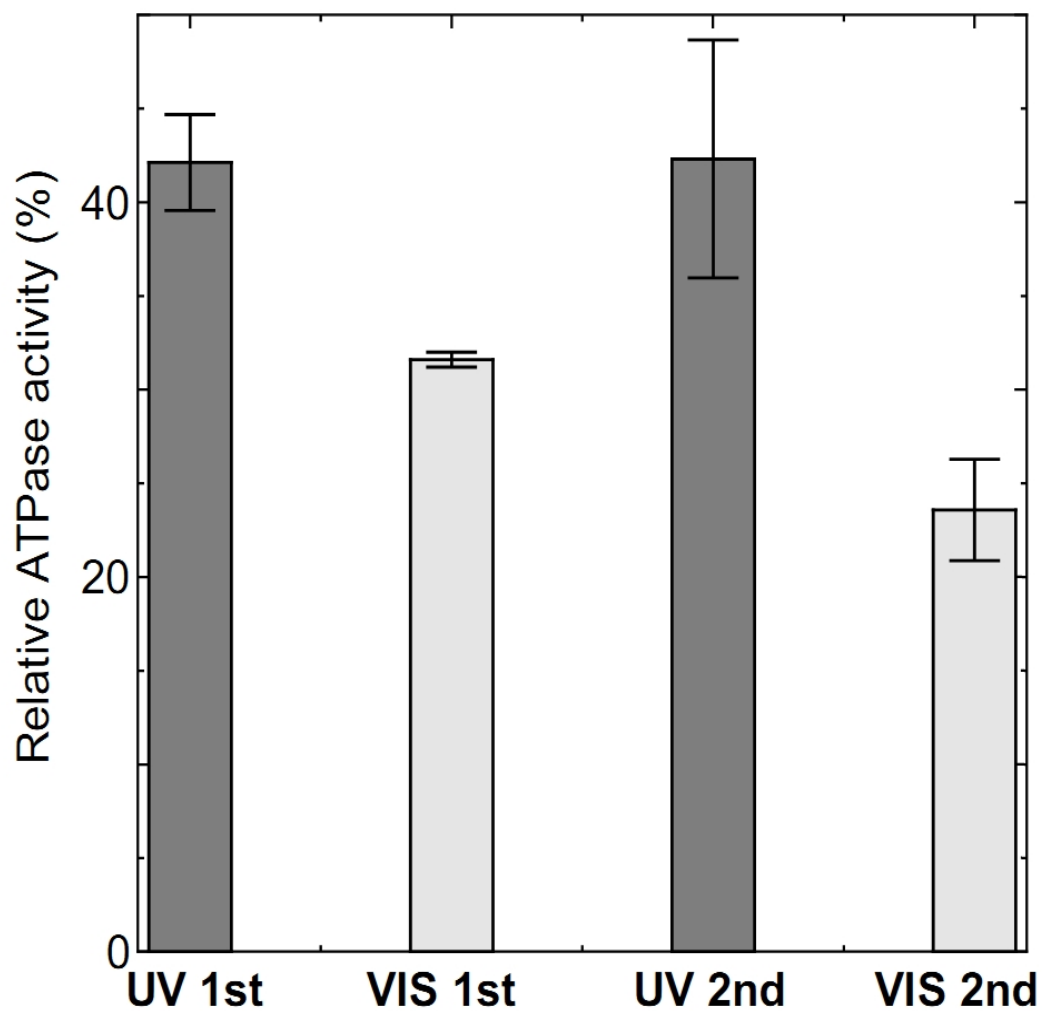


図 4-9 BTBA による Eg5 basal ATPase 活性の可逆的光制御。
0.25 μ M Eg5 の basal ATPase 活性を, 50 μ M の *trans*-BTBA もしくは *cis*-BTBA 存在下で測定した。

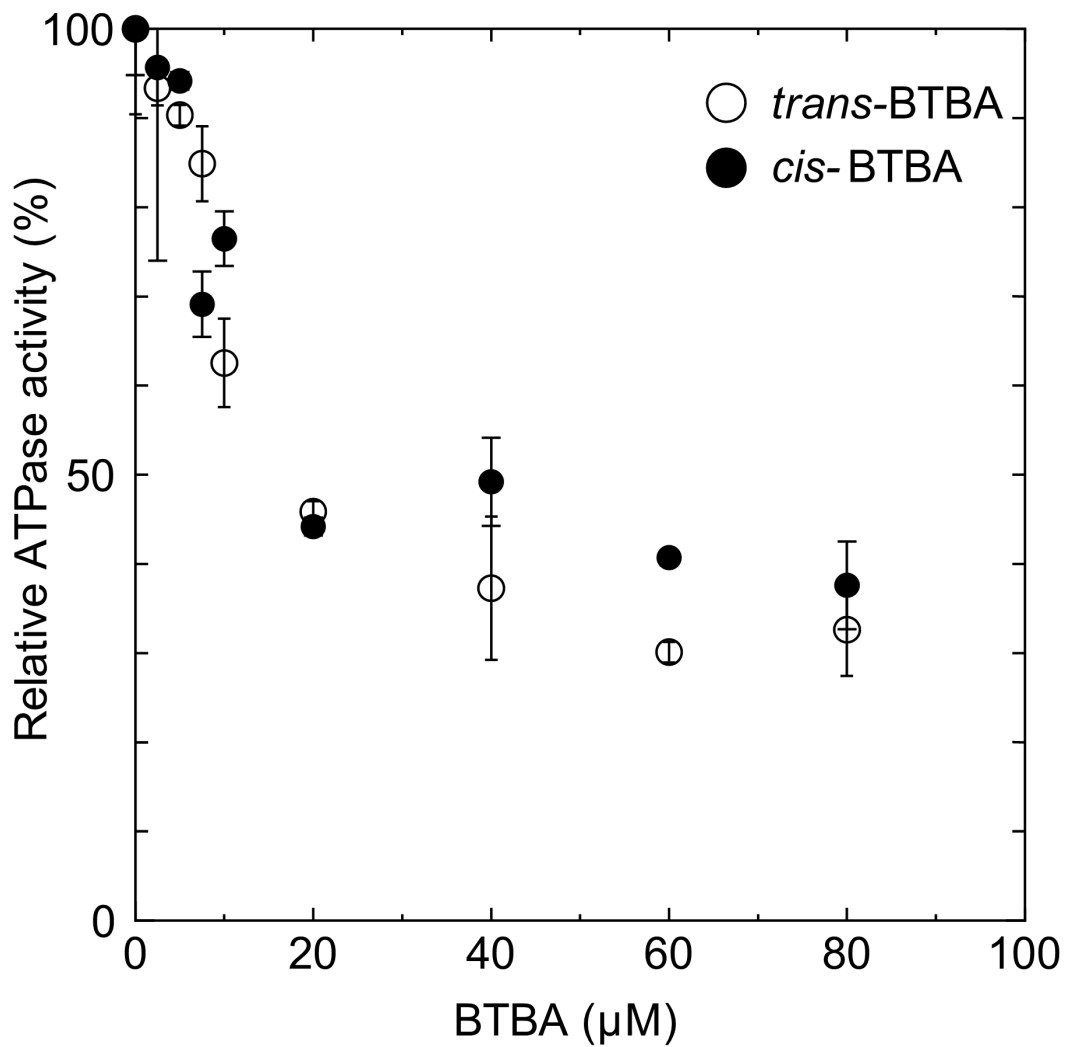


図 4-10 BTBA による Eg5 ATPase 活性の光制御.

0.1 μM Eg5 の ATPase 活性を, Eg5 と 0-100 μM の *trans*-BTBA(○) もしくは *cis*-BTBA (●)をインキュベートした後, 3 μM 微小管を加えて測定した.

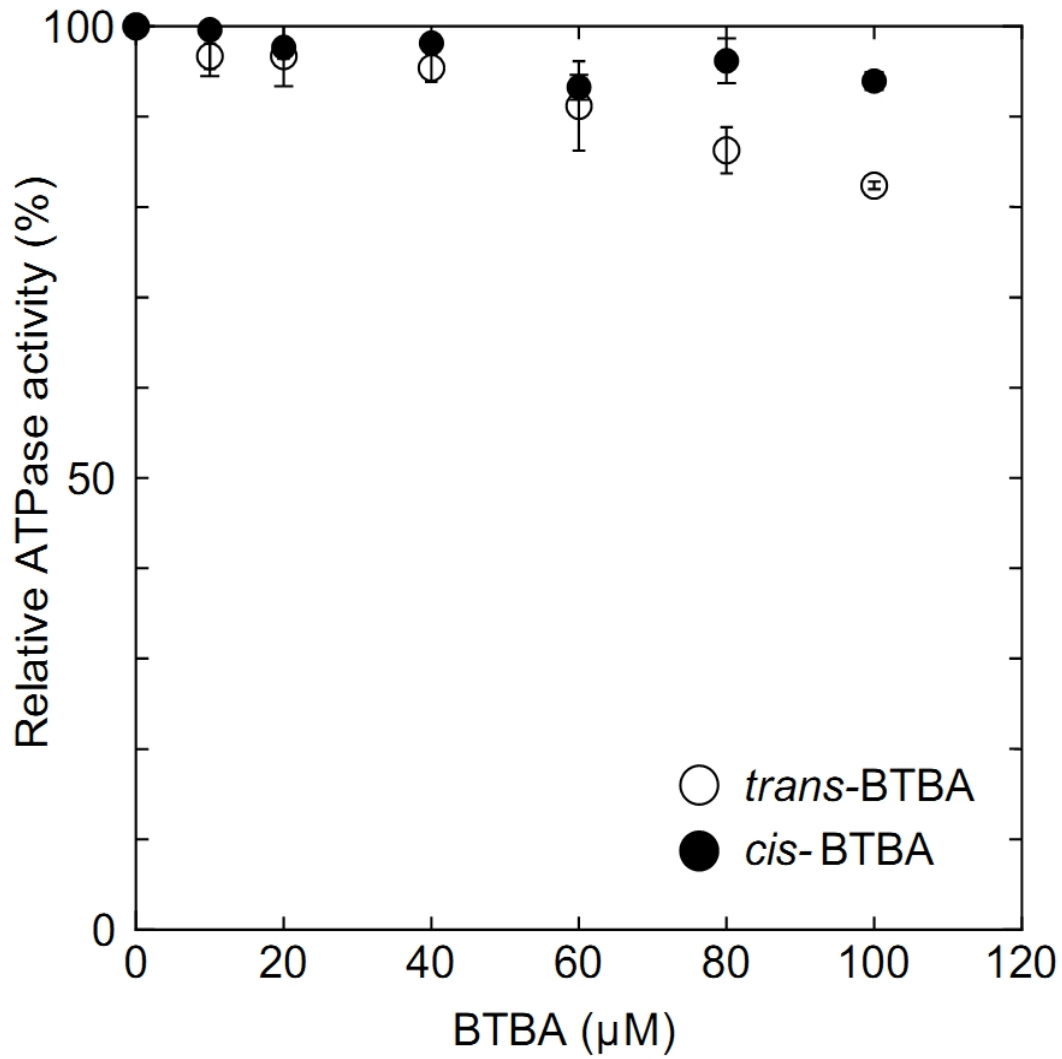


図 4-11 BTBA による Eg5 ATPase 活性の光制御。
 0.1 μM Eg5 の ATPase 活性を, Eg5 と 3 μM 微小管をインキュベートした後, 0-100 μM の *trans*-BTBA(○) もしくは *cis*-BTBA (●)を加えて測定した。

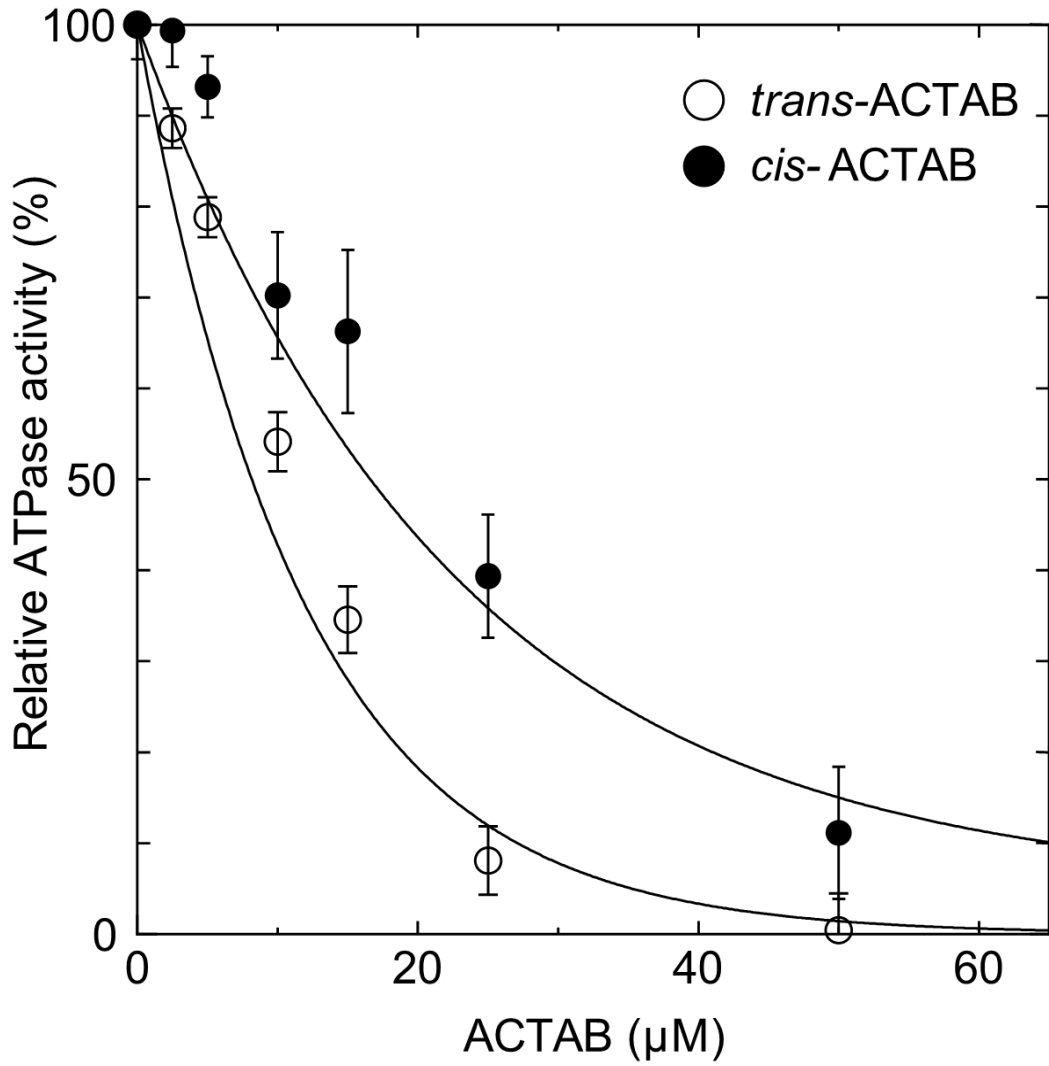


図 4-12 ACTAB による Eg5 basal ATPase 活性の光制御.

0.5 μM Eg5 の basal ATPase 活性を, 0-50 μM の *trans*-ACTAB(○) もしくは *cis*-ACTAB (●)存在下で測定した.

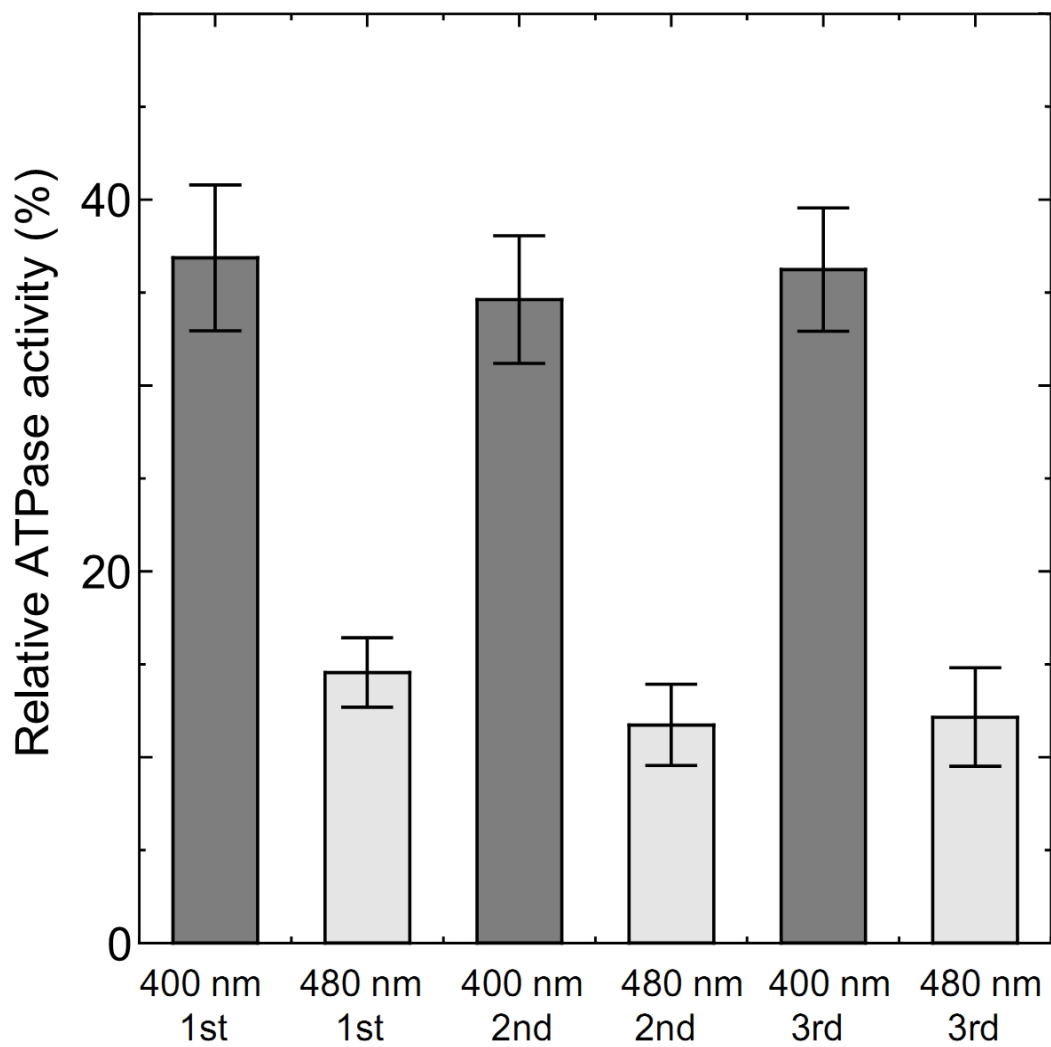


図 4-13 ACTAB による Eg5 basal ATPase 活性の可逆的光制御.

0.5 μ M Eg5 の basal ATPase 活性を, 25 μ M の *trans*-ACTAB もしくは *cis*-ACTAB 存在下で測定した.

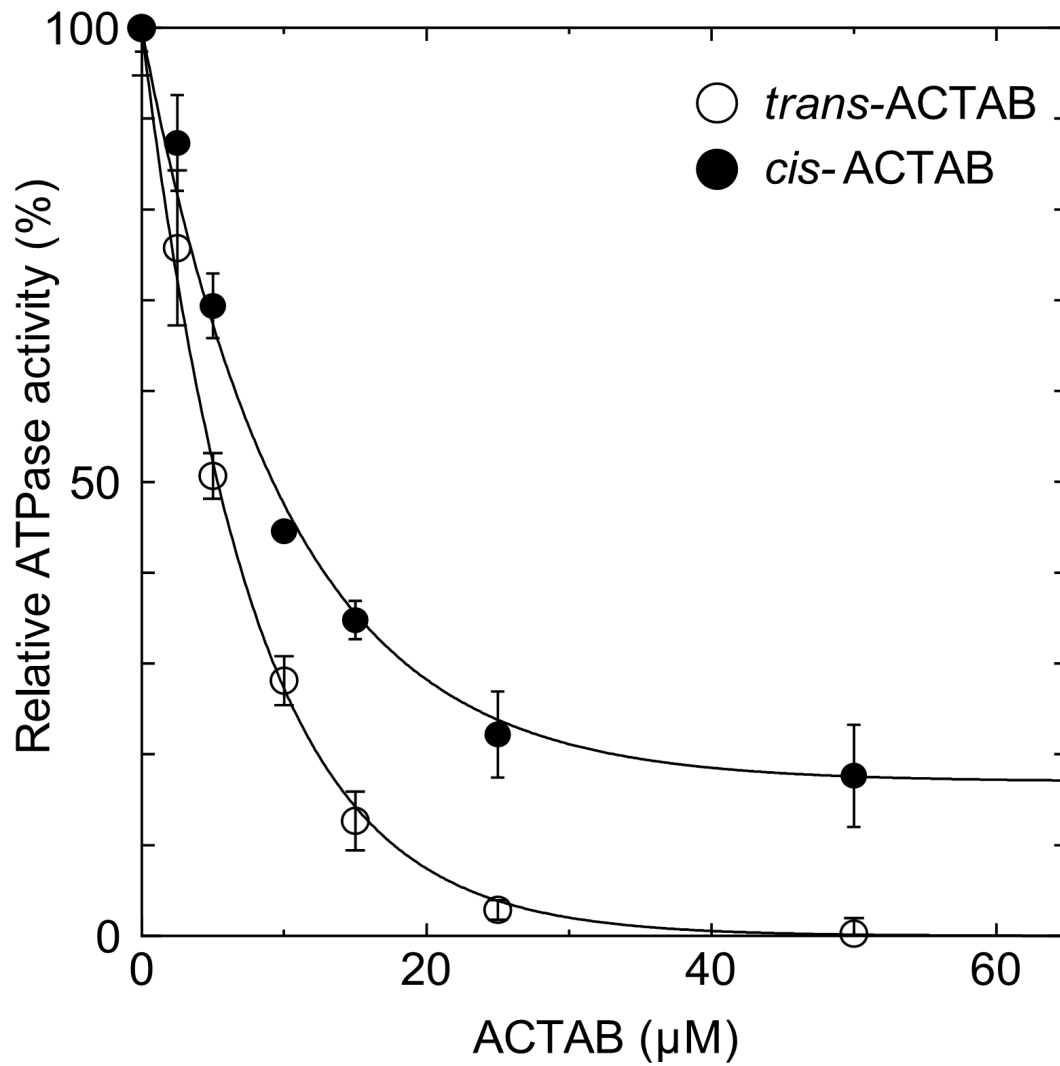


図 4-14 ACTAB による Eg5 ATPase 活性の光制御.

0.1 μM Eg5 の ATPase 活性を, 3 μM 微小管, 0-50 μM の *trans*-ACTAB(○) もしくは *cis*-ACTAB(●) 存在下で測定した.

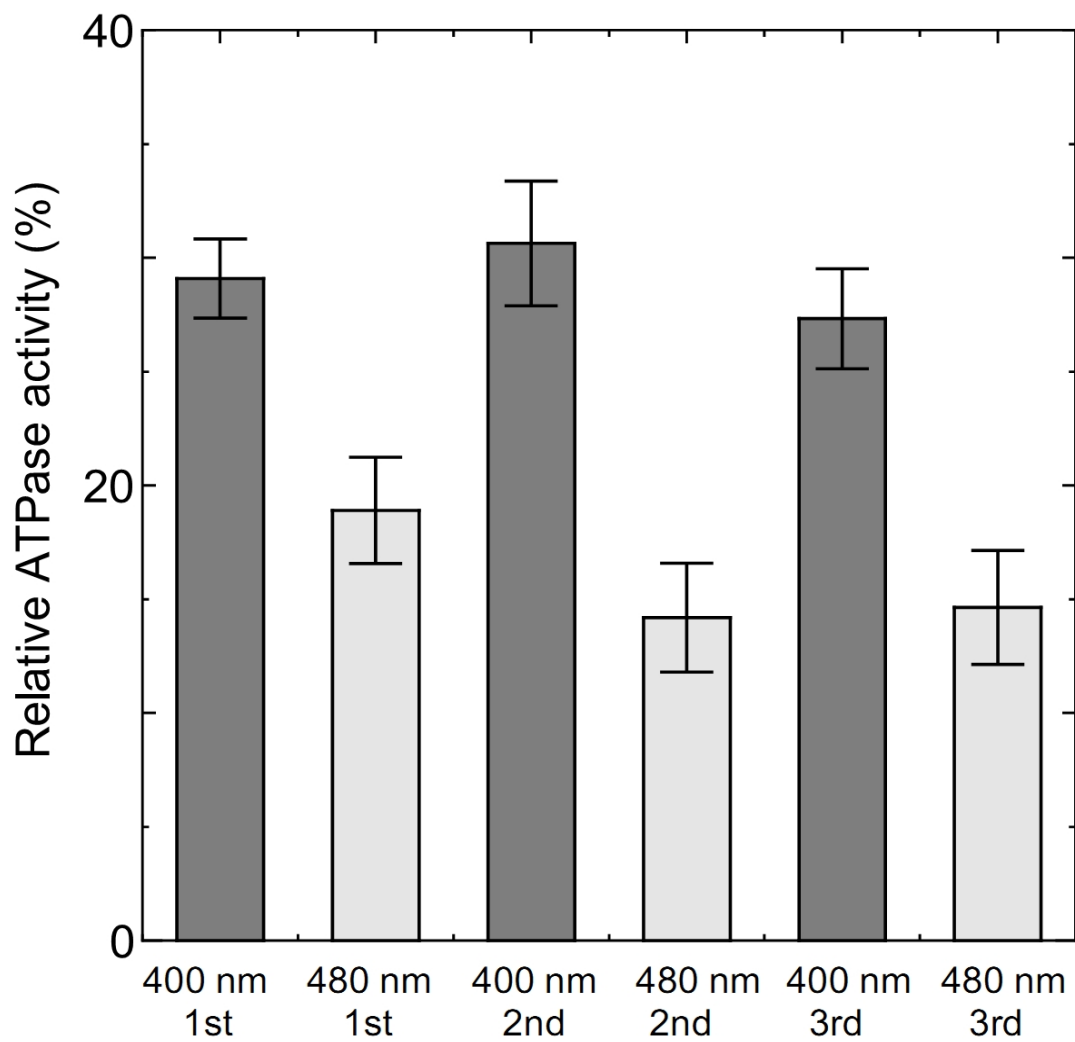


図 4-15 ACTAB による Eg5 ATPase 活性の可逆的光制御.

0.1 μM Eg5 の basal ATPase 活性を, 15 μM の *trans*-ACTAB もしくは *cis*-ACTAB 存在下で測定した.

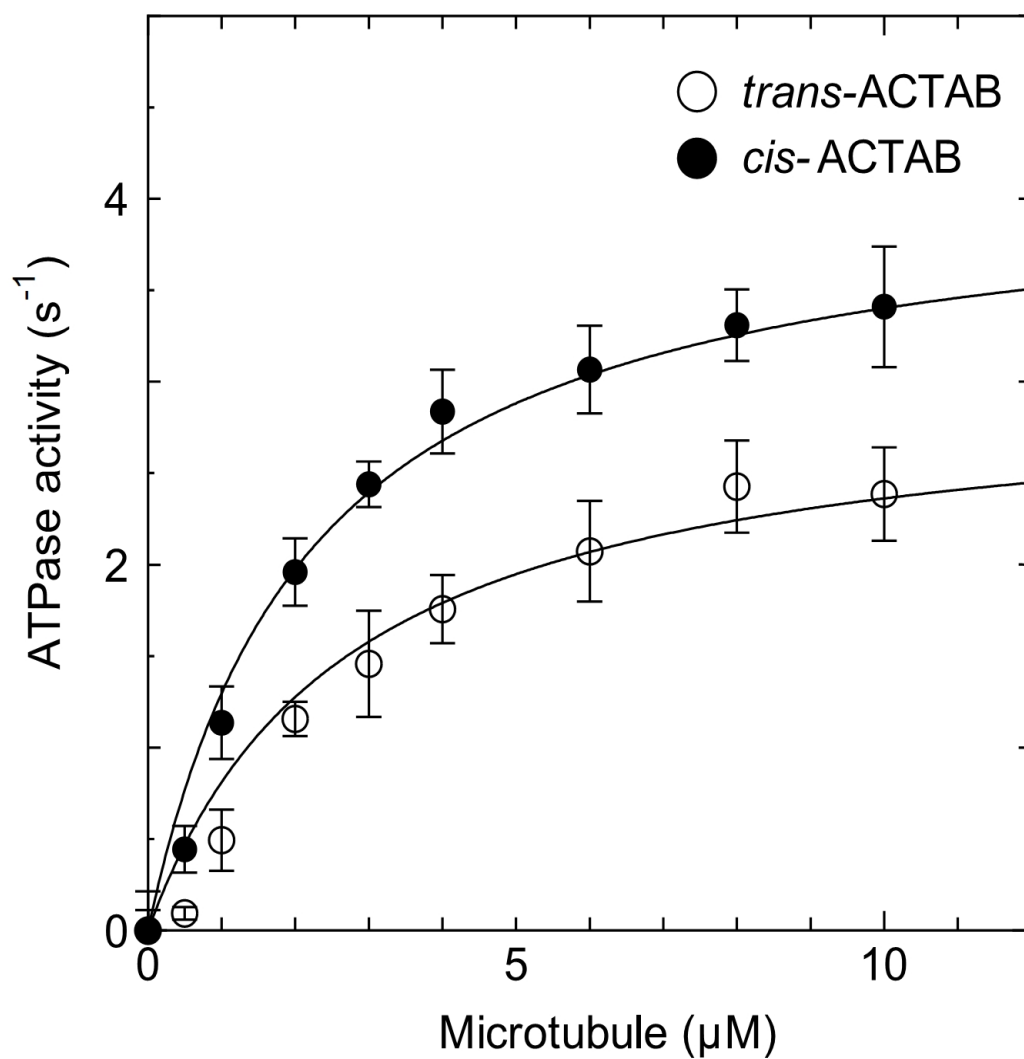


図 4-16 ACTAB による Eg5 ATPase 活性の光制御

15 μM の *trans*-ACTAB(\circ) もしくは *cis*-ACTAB(\bullet)存在下で, 0.1 μM Eg5 の ATPase 活性を 0-10 μM 微小管存在下で測定した。

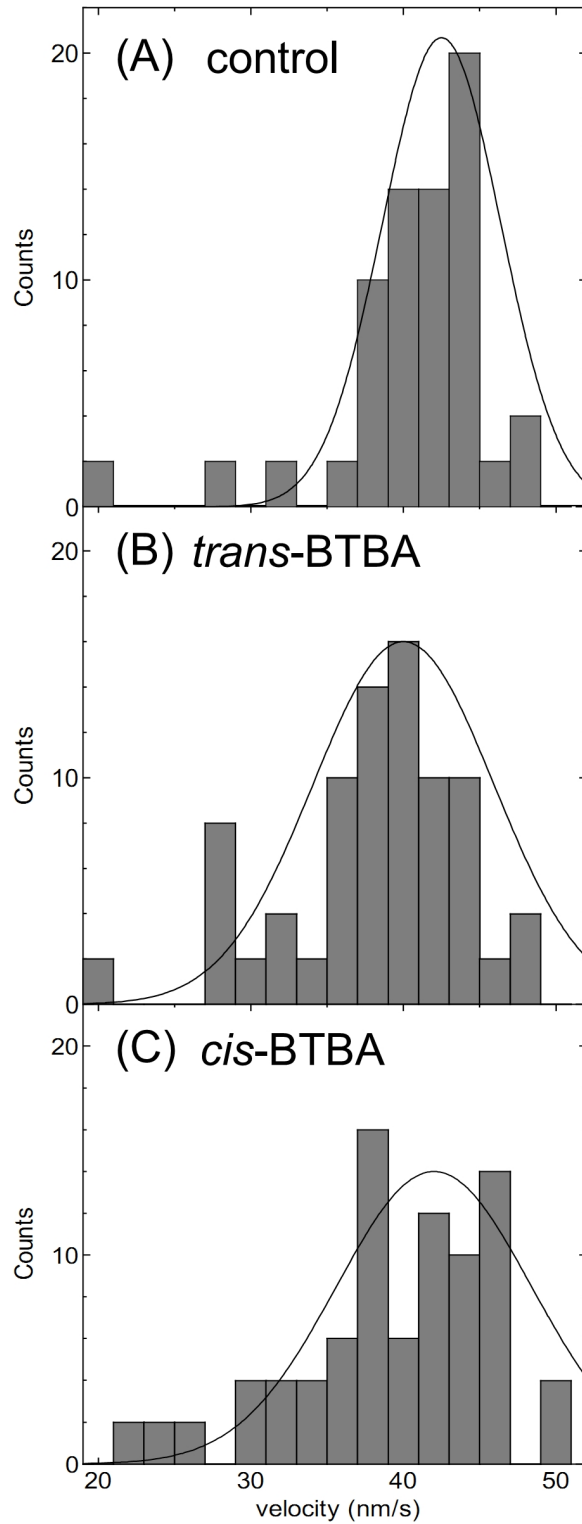


図 4-17 BTBA による Eg5-微小管滑り運動の光制御

100 μM の *trans*-BTBA もしくは *cis*-BTBA 存在下で, Eg5-微小管滑り運動を測定した.

BTBA 非存在下での平均速度は 40.0 ± 3.8 nm/s, 100 μM *trans*-BTBA 存在下での平均速度は 37.5 ± 5.2 nm/s, 100 μM *cis*-BTBA 存在下での平均速度は 38.2 ± 5.7 nm/であった.

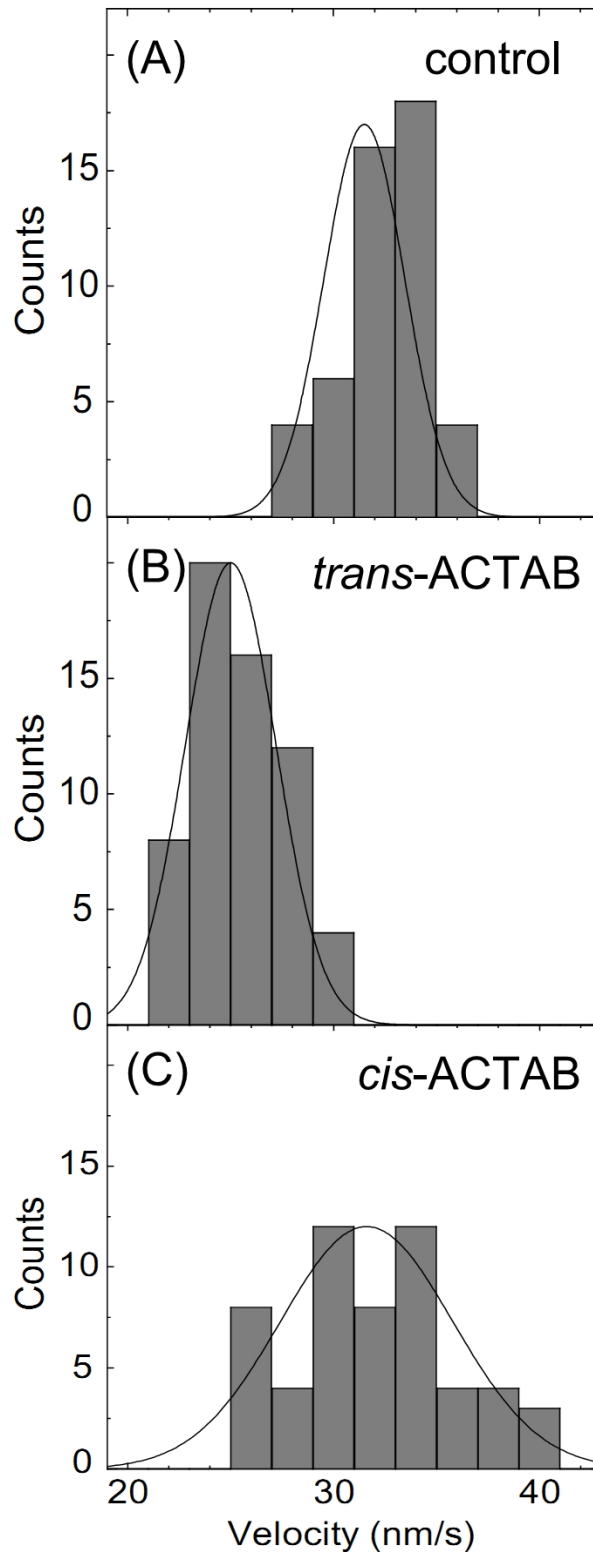


図 4-18 ACTAB による Eg5-微小管滑り運動の光制御

60 μM の *trans*-ACTAB もしくは *cis*-ACTAB 存在下で, Eg5-微小管滑り運動を測定した. ACTAB 非存在下での平均速度は $31.5 \pm 1.8 \text{ nm/s}$, $n = 48$, 60 μM *trans*-ACTAB 存在下での平均速度は $24.6 \pm 2.2 \text{ nm/s}$, $n = 60$, 60 μM *cis*-ACTAB 存在下での平均速度は $31.6 \pm 4.2 \text{ nm/s}$, $n = 55$ であった.

表 4-1 *cis*-ACTAB もしくは *trans*-ACTAB 存在下での Eg5 の ATPase 活性の V_{max} と K_{MT}

Inhibitor	V_{max} (S ⁻¹)	K_{MT} (μM)
<i>cis</i> -ACTAB	4.46±0.21	2.67±0.35
<i>trans</i> -ACTAB	3.12±0.31	2.38±0.45

V_{max} と K_{MT} は以下の式により求めた.

$$V = V_{max} / (1 + K_{MT} / [\text{microtubules}]).$$

第五章

総括と展望

5.1 総括

本研究では、有糸分裂に必須のキネシン Eg5 の機能を光応答性スイッチであるフォトクロミック分子を利用して光制御した。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(Turner et al., 2001)。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 の機能の効率的な制御が可能であることを明らかにした。

まず、第二章では、機能部位である L5 に変異を入れ、Eg5 の ATPase 活性および Eg5 特異的阻害剤の 1 つである STLC による阻害効果への影響を調べた。L5 の変異部位は、結晶構造解析から STLC と相互作用しているアミノ酸を中心に選択し、各アミノ酸をシステインに置換した。いくつかの変異体において、ATPase 活性および STLC による阻害効果に変化が見られた。特に、変異体 E116C, W127C, D130C では、STLC のによる阻害効果が著しく減少した。阻害効果に大きな影響を与えたアミノ酸はいずれも、結晶構造解析で STLC が阻害剤結合ポケットに結合することにより、近傍のアミノ酸と相互作用する部位である。L5 は Eg5 の機能部位であるが、L5 全体が活性や阻害剤の結合に関与している訳ではなく、特定のアミノ酸の性質そして位置が関係が重要であると考えられる。L5 の変異によって、活性および阻害効果が変化した部位は、光応答性スイッチの導入により、Eg5 の機能の光制御が期待できる。しかし、Eg5 はモータードメイン部分にはもともと 4 つのシステインを有しているため、そのまま用いると L5 以外の部位にもフォトクロミック分子が導入されてしまう。そこで、もともと存在するシステインを別のアミノ酸に置換し、L5 にのみ単一のシステインを有した変異体を調製した。4 つのシステインは、すべて L5 のような機能に直接関与した部位ではない位置に存在したため、それらの変異は ATPase 活性にも STLC による阻害効果にも影響しなかった。したがって、光応答性スイッチの導入部位も機能に関与した部位に導入することが望ましいと考えられる。

第三章では、第二章で調製した L5 にのみ単一のシステインを有する 5 種類の変異体にフォトク

ロミック分子を導入し, Eg5 の機能の光制御を試みた. 過去に yamada ら, そして shishido らによってフォトクロミック分子の 1 つであるアゾベンゼンを用いて, キネシンそしてカルモジュリンの光制御が行われた(Yamada et al., 2007; Shishido et al., 2009). 本研究では, アゾベンゼンに加え, 新規チオール基反応性フォトクロミック分子として IATAB と IASP を設計, 合成した. IASP は異なる種類のフォトクロミック分子スピロピラン誘導体であり, 異なる種類のフォトクロミック分子は, それぞれ異なる作用をもたらすと考えた. PAM, IATAB, IASP を L5 に修飾し, 紫外線, 可視光線照射によって, Eg5 の ATPase 活性および STLC による阻害効果を光制御を試みた. 予想通り, 異なる種類のフォトクロミック分子, アゾベンゼンとスピロピランは異なる作用を示し, アゾベンゼンは紫外線照射時に活性および阻害効果の減少をもたらし, スピロピランは可視光線照射時に活性および阻害効果の減少をもたらした. そして, IASP を修飾した D130C と STLC を組み合わせた光制御により, ON/OFF といった効率の良い制御が可能となった. また, これらの結果から Eg5 の L5 と阻害剤など, 各タンパク質特有の性質を利用することにより, 効率的な制御が可能であることが明らかになった. PAM, IATAB, IASP を修飾し, フォトクロミック分子を光異性化しても, 全く変化のない変異体もあったが, フォトクロミック分子は, アゾベンゼン, スピロピラン以外にも, ジアリールエテンやフルギドなど他の種類も存在するため, さらに他の種類のフォトクロミック分子によって, より効率の良い光制御が実現可能であると考えられる. 過去に yamada らが行った従来型キネシンの光制御に関する研究では, 機能部位近傍に人工的な制御機構を導入する必要があるという考えが提唱されたが, Eg5 に関しては, 阻害剤の結合と直接関与している部位への導入が制御に適していることが分かった. しかし, 阻害剤と直接関与しているアミノ酸へのフォトクロミック分子でも, 制御ができなかった変異体もあり, 制御ができた変異体のフォトクロミック分子導入部位を比較すると, すべて L5 の C 末端であることが分かった. ゆえに, Eg5 の L5 を利用した人工的な制御には, L5 の C 末端に, 制御機構を導入することが望ましいと考えられる.

第四章では, STLC の構造を基に, フォトクロミック分子アゾベンゼンを導入した, 光照射によって構造が変化する光制御型阻害剤を開発した. 第三章において, 阻害剤結合ポケットの構造および特性の変化が阻害効果に影響することが明らかになった. そこで, 阻害剤自体の構造変化も阻害効果に影響すると考え, 第四章では, 阻害剤にフォトクロミック分子を導入し, Eg5 の阻害効

果の光制御を試みた. STLC はトリチル基部位とシステイン部位から成る阻害剤であるため, フォトクロミック分子アゾベンゼンを導入することにより, トリチル基部位やシステイン部位の位置関係を光照射によって変化させることができる化合物を設計, 合成した(BTBA, ACTAB). 光制御型阻害剤によって, Eg5 の阻害効果を光照射によって制御できた. さらに, 通常アゾベンゼンは紫外線, 可視光線によって光異性化するが, ACTAB は 400 nm で *trans* 体から *cis* 体に, 480 nm で *cis* 体から *trans* 体に光異性化することが確認でき, 可視光線領域の光でのみ Eg5 の機能を制御することが可能となった. 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, 細胞内への応用が期待できる.

5.2 展望

本研究では, 光応答性スイッチであるフォトクロミック分子を利用して, キネシン Eg5 の機能を光制御した. キネシンは生体分子機械の 1 つであり, 大腸菌による発現系も確立しているため, 生体分子を応用したナノデバイスへの材料に適している. また, キネシン Eg5 には最長の L5 と阻害剤という特有の性質があり, その特徴を利用することにより, ON/OFF といった非常に効率の良い制御が可能であることを示した.

第三章では, Eg5 の特徴の 1 つである最長の L5 に, フォトクロミック分子を導入することにより, ATPase 活性および STLC による阻害効果を光制御できることを明らかにした. L5 はヌクレオチドの結合やネックリンカーのドッキング, 阻害剤の結合に関与していると考えられている, Eg5 の機能に重要な部位である. この L5 の 5 箇所にも 3 種類のフォトクロミック分子(PAM, IATAB, IASP)をそれぞれ修飾することにより, 異なる光制御効率ができることを見出した. また, L5 へのフォトクロミック分子修飾と阻害剤による阻害効果を組み合わせることによって, 非常に効率の良い制御ができた. このように, 各生体分子機械特有の性質を利用することにより, 効率よく生体分子機械を制御できる可能性を示した. また, 機能部位の中でも, フォトクロミック分子修飾部位やフォトクロミック分子を工夫することにより, 自身が望む制御効率をもった生体分子が調製できると考えられる.

第四章では, Eg5 の阻害剤にフォトクロミック分子を導入した光制御型阻害剤を開発した. 第三章において, Eg5 の阻害剤結合ポケットを構成している L5 にフォトクロミック分子を修飾することにより, 阻害剤 STLC による阻害効果を光制御することができたため, 阻害剤自体の構造や特性をフォトクロミック分子の光異性化で変化させることにより, 同じように Eg5 の機能を光制御できると考えた. また, Eg5 には STLC だけでなく, monastrol や ispinesib など多数阻害剤が存在し, それぞれが異なった構造をしているにもかかわらず, 興味深いことに, 同じ L5 から成る阻害剤結合ポケットに結合することが分かっている. したがって, フォトクロミック分子を有した Eg5 阻害剤アナログも同様に, L5 から成る阻害剤結合ポケットに結合することが予想された. そのため, 第四章では STLC の構造を基にフォトクロミック分子であるアゾベンゼンを導入した光制御型 STLC アナログ (BTBA, ACTAB) を設計, 合成した. 光制御型阻害剤を利用した光制御は, 遺伝子操作などが不必要であり, タンパク質は native なものを使用できることが利点である. これは, Eg5 だけに限らず, 特異的阻害剤を有する生体分子すべてに応用が可能である. また, ACTAB は 400 nm と 480 nm の可視光線領域の光でのみ光制御可能なため, 紫外線による生体分子損傷の心配なく, 細胞へ応用できる. また, Eg5 阻害剤は, 新たな抗がん剤としても注目されており, 今回開発した光制御型阻害剤は, 阻害効果を外部刺激である光によって制御することができる, より副作用が軽減できる抗がん剤としての利用が期待できる.

本研究で示した, 各タンパク質の特徴を利用した人工制御は, 今後, 効率の良い生体分子機械の制御法として広く応用できると期待できる.

参考文献

- Abualhasan MN, Good JA, Wittayanarakul K, Anthony NG, Berretta G, Rath O, Kozielski F, Sutcliffe OB, Mackay SP.** (2012) Doing the methylene shuffle-further insights into the inhibition of mitotic kinesin Eg5 with S-trityl L-cysteine. *Eur J Med Chem.* 54:483-98.
- Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer RH.** (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci.* 7(12):1381-6.
- Beharry AA, Sadovski O, Woolley GA.** (2011a) Azobenzene photoswitching without ultraviolet light. *J Am Chem Soc.* 133(49):19684-7
- Beharry AA, Wong L, Tropepe V, Woolley GA.** (2011b) Fluorescence imaging of azobenzene photoswitching in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(6):1325-7.
- Behnke-Parks, W. M., Vendome, J., Honig, B., Maliga, Z., Moores, C., and Rosenfeld, S. S.** (2011) Loop L5 acts as a conformational latch in the mi-totic kinesin Eg5. *J. Biol. Chem.* 286, 5242-5253
- Blangy, A., Lane, HA., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, EA.** (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 83, 1159–1169.
- Brier S, Lemaire D, DeBonis S, Forest E, Kozielski F.** (2006) Molecular dissection of the inhibitor binding pocket of mitotic kinesin Eg5 reveals mutants that confer resistance to antimitotic agents. *J Mol Biol.* 360(2):360-76.
- Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA.** (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 83(7):1159-69.
- Brady ST.** (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature.* 317(6032):73-5.

- Bredenbeck J, Helbing J, Kumita JR, Woolley GA, Hamm P.** (2005) Alpha-helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(7):2379-84.
- Brier S, Lemaire D, Debonis S, Forest E, Kozielski F.** (2004) Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochemistry.* 43(41):13072-82.
- Bristol-Myers Squibb Company** (2007) Princeton (NJ). Prescribing information taxol (paclitaxel) injection.
- Cavaletti, G., Cavalletti, E., Montaguti, P., Oggioni, N., De Negri, O., and Tredici, G.** (1997) Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology.* 18, 137–145.
- Chambers JJ, Banghart MR, Trauner D, Kramer RH.** (2006) Light-induced depolarization of neurons using a modified Shaker K(+) channel and a molecular photoswitch. *J Neurophysiol.* 96(5):2792-6.
- Cole, DG., Saxton, WM., Sheehan, KB., and Scholey, JM.** (1994) A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from Drosophila embryos. *J. Biol. Chem.* 269, 22913-22916.
- DeBonis S, Skoufias DA, Lebeau L, Lopez R, Robin G, Margolis RL, Wade RH, Kozielski F.** (2004) In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimetastatic and antitumor activities. *Mol Cancer Ther.* 3(9):1079-90.
- Desai A, Mitchison TJ.** (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117.
- Dixon, M., and Webb, E. C.** (1979) *Enzymes.* pp. 345-353. Academic Press, New York.
- Dong SL, Lowenack M, Schrader TE, Schreier WJ, Zinth W, Moroder L, Renner C.** (2006) A photocontrolled beta-hairpin peptide. *Chemistry.* 12(4):1114-20.
- El-Nassan HB.** (2013) Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents. *Eur J Med Chem.* 62:614-31.

- Endow SA.** (1999) Microtubule motors in spindle and chromosome motility. *Eur J Biochem.* 262(1):12-8.
- Ferhat L, Cook C, Chauviere M, Harper M, Kress M, Lyons GE, Baas PW.** (1998) Expression of the mitotic motor protein Eg5 in postmitotic neurons: implications for neuronal development. *J Neurosci.* 18(19):7822-35.
- Fischer E. and Hirshberg Y.** (1952) Formation colored forms of spirans by low-temperature irradiation. *J. Chem. Soc.* 11, 4522-4530
- Guerrero L, Smart OS, Woolley GA, Allemann RK.** (2005) Photocontrol of DNA binding specificity of a miniature engrailed homeodomain. *J Am Chem Soc.* 127(44):15624-9.
- Hackney, D.D.** (1988) Kinesin ATPase: Rate-limiting ADP release. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 85(17):6314-8.
- Han M, Honda T.** (2011) Correlation between the molecular structure and trans ↔ cis isomerization characteristics of azobenzenes. *Science China Chemistry.* 54(12):1955-1961
- Hartley G. S.** (1937) The Cis-form of Azobenzene. *Nature.* 140, 281-281
- Hegde PS, Cogswell J, Carrick K, Jackson J, Wood KW, Eng WK, Brawner M, Huang PS, Bergsma D.** (2003) Differential gene expression analysis of kinesin spindle protein in human solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 22:535.
- Hilf RJ, Bertozzi C, Zimmermann I, Reiter A, Trauner D, Dutzler R.** (2010) Structural basis of open channel block in a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nat Struct Mol Biol.* 17(11):1330-6.
- Hirokawa N.** (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 279(5350):519-26.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S** (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:682-696
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y.** (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron.* 68(4):610-38.

Hohsaka T., Kazuo Kawashima K., Sisido M.(1994) Photoswitching of NAD⁺-mediated enzyme reaction through photoreversible antigen-antibody reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1), 413-414

Horwitz, SB. (1994) Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol.* 5, S3–6.

Howard J, Hudspeth AJ, Vale RD. (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature.* 342(6246):154-8.

Mayer, TU., Kapoor, TM., Haggarty, SJ., King, RW., Schreiber, SL., and Mitchison, TJ. (1999) Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science.* 286, 971–974

Indorato RL, DeBonis S, Kozielski F, Garcia-Saez I, Skoufias DA. (2013) STLC-resistant cell lines as tools to classify chemically divergent Eg5 targeting agents according to their mode of action and target specificity. *Biochem Pharmacol.* 86(10):1441-51.

Irie M.(2000) Photochromism: Memories and Switches. *Chem. Rev.* 1683-1684

Itamar Willner , Shai Rubin , Azalia Riklin (1991) Photoregulation of papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 113 (9), 3321-3325

Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. (2007) Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer.* 7(2):107-17.

Jiang C., You Q., Li Z., Guo Q.(2006) Kinesin spindle protein inhibitors as anticancer agents. *Expert Opin. Ther. Patents,* 1517-1532

Jordan MA. (2002) Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2:1-17.

Jordan MA, Wilson L. (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 4:253-65.

Joshi HC. (1998) Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol.* 10(1):35-44.

Lane J, Allan V. (1998) Microtubule-based membrane movement. *Biochim Biophys Acta.* 1376(1):27-55.

Kaan HY, Ulaganathan V, Hackney DD, Kozielski F. (2009) An allosteric transition trapped in an intermediate state of a new kinesin-inhibitor complex. *Biochem J.* 425(1):55-60.

- Kaan HY, Major J, Tkocz K, Kozielski F, Rosenfeld SS.** (2013) "Snapshots" of ispinesib-induced conformational changes in the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem.* 288(25)
- Kapoor TM, Mayer TU, Coughlin ML, Mitchison TJ.** (2000) Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol.* 150(5):975-88.
- Kashina AS, Rogers GC, Scholey JM.** (1997) The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. *Biochim Biophys Acta.* 1357(3):257-71.
- Kavallaris, Maria (Ed.)** (2012) Cytoskeleton and human disease, Chapter 3: The Kinesin Superfamily
- Kessel D, Smith G, Blahnik J.** (1976) Effects of S-(trityl)-L-cysteine and its analogs on cell surface properties of leukemia L1210 cells. *Biochem Pharmacol.* 25(16):1893-7.
- Kikkawa M, Sablin EP, Okada Y, Yajima H, Fletterick RJ, Hirokawa N.** (2001) Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature.* 411(6836):439-45.
- Kim ED, Buckley R, Learman S, Richard J, Parke C, Worthylake DK, Wojcik EJ, Walker RA, Kim S.** (2010) Allosteric drug discrimination is coupled to mechanochemical changes in the kinesin-5 motor core. *J Biol Chem.* 285(24):18650-61.
- Kull FJ, Endow SA.** (2002) Kinesin: switch I & II and the motor mechanism. *J Cell Sci.* 115(Pt 1):15-23.
- Larson, A. G., Naber, N., Cooke, R., Pate, E., and Rice, S. E.** (2010) The conserved L5 loop establishes the pre-powerstroke conformation of the kinesin-5 motor, eg5. *Biophys. J.* 98, 2619-2627
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L.** (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.* 167(1):19-22.

- Levitus M. , Aramendia P.F.** (1999) Photochromism and Thermochromism of Phenanthrospiropoaxazine in Poly(Alkyl Methacrylates). *J. Phys. Chem. B*, 1864-1870
- Liu M, Wang X, Yang Y, Li D, Ren H, Zhu Q, Chen Q, Han S, Hao J, Zhou J.** (2010) Ectopic expression of the microtubule-dependent motor protein Eg5 promotes pancreatic tumorigenesis. *J Pathol.* 221(2):221-8.
- Maliga Z, Kapoor TM, Mitchison TJ.** (2002) Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol.* 9(9):989-96.
- Maliga Z, Mitchison TJ.** (2006a) Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol. *BMC Chem Biol.* 6:2.
- Maliga Z, Xing J, Cheung H, Juszczak LJ, Friedman JM, Rosenfeld SS.** (2006b) A pathway of structural changes produced by monastrol binding to Eg5. *J Biol Chem.* 281(12):7977-82.
- Mandelkow E, Mandelkow EM.** (2002) Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 12(12):585-91.
- Marx A, Muller J, Mandelkow E.** (2005) The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem.* 71:299-344
- Masuda A, Maeno K, Nakagawa T, Saito H, Takahashi T.** (2003) Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancers. *Am J Pathol.* 163(3):1109-16.
- Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ.** (1999) Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science.* 286(5441):971-4.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N.** (2005) Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* 15(9):467-76.
- Mourot A, Kienzler MA, Banghart MR, Fehrentz T, Huber FM, Stein M, Kramer RH, Trauner D.** (2011) Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS Chem Neurosci.* 2(9):536-43.
- Nogales E.** (2001) Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Bio-phys Biomol Struct.*

30:397-420

Ogo N, Oishi S, Matsuno K, Sawada J, Fujii N, Asai A. (2007) Synthesis and biological evaluation of L-cysteine derivatives as mitotic kinesin Eg5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 17(14):3921-4.

Pamela R. Westmark , John P. Kelly , Bradley D. Smith (1993) Photoregulation of enzyme activity. Photochromic, transition-state-analog inhibitors of cysteine and serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (9), 3416-3419

Paschal, B. M., and R. B. Vallee. (1987) Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAPIC. *Nature (Lond.)*. 330:181-183.

Paull KD, Lin CM, Malspeis L, Hamel E. (1992) Identification of novel antimetabolic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. *Cancer Res.* 52(14):3892-900.

Perez EA. (2009) Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther.* 8(8):2086-95.

Pieroni O, Fissi A, Angelini N, Lenci F. (2001) Photoresponsive polypeptides. *Acc Chem Res.* 34(1):9-17.

Rath O, Kozielski F. (2012) Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer.* 12(8):527-39.

Rau H. (1990) Photoisomerization of azobenzenes. J.F. Rebek (Ed.), *Photochemistry and Photophysics*, CRC Press, Boca Raton.

Renner C, Kusebauch U, Lowenack M, Milbradt AG, Moroder L. (2005) Azobenzene as photoresponsive conformational switch in cyclic peptides. *J Pept Res.* 65(1):4-14.

Renner C, Moroder L. (2006) Azobenzene as conformational switch in model peptides. *Chembiochem.* 7(6):868-78.

Rosenfeld SS, Xing J, Jefferson GM, King PH. (2005) Docking and rolling, a model of how the mitotic motor Eg5 works. *J Biol Chem.* 280(42)

Rowinsky EK. (2005) Antimicrotubule agents. In: Chabner B, Longo DL, editors. *Cancer*

chemotherapy and biotherapy: Principles and practice. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 237-82.

Russowsky D, Canto RF, Sanches SA, D'Oca MG, de Fatima A, Pilli RA, Kohn LK, Antonio MA, de Carvalho JE. (2006) Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorg Chem.* 34(4):173-82.

Sakowicz R, Finer JT, Beraud C, Crompton A, Lewis E, Fritsch A, Lee Y, Mak J, Moody R, Turincio R, Chabala JC, Gonzales P, Roth S, Weitman S, Wood KW. (2004) Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Res.* 64(9):3276-80.

Sale, W. S., and P. Satir. (1977) The direction of active sliding of microtubules in Tetrahymena cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:2045-2049.

Sanofi-Aventis (2007) U.S. LLC; Bridgewater (NJ). Prescribing information taxotere (docetaxel) injection concentrate.

Sarli V, Giannis A. (2006) Inhibitors of mitotic kinesins: next-generation antimicrotubule inhibitors. *ChemMedChem.* 1(3):293-8.

Schiff, PB., and Horwitz, SB. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1561–1565.

Shishido H, Yamada MD, Kondo K, Maruta S.(2009) Photocontrol of calmodulin interaction with target peptides using azobenzene derivative. *J Biochem,* 146 (4):581-590

Skoufias DA, DeBonis S, Saudi Y, Lebeau L, Crevel I, Cross R, Wade RH, Hackney D, Kozielski F. (2006) S-trityl-L-cysteine is a reversible, tight binding inhibitor of the human kinesin Eg5 that specifically blocks mitotic progression. *J Biol Chem.* 281(26):17559-69.

Stawski P, Janovjak H, Trauner D. (2010) Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. *Bioorg Med Chem.* 18(22):7759-72.

Stawski P, Sumser M, Trauner D. (2012) A photochromic agonist of AMPA receptors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(23):5748-51.

- Tcherniuk S, van Lis R, Kozielski F, Skoufias DA.** (2010) Mutations in the human kinesin Eg5 that confer resistance to monastrol and S-trityl-L-cysteine in tumor derived cell lines. *Biochem Pharmacol.* 79(6):864-72.
- Tochitsky I, Banghart MR, Mourots A, Yao JZ, Gaub B, Kramer RH, Trauner D.** (2012) Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem.* 4(2):105-11.
- Turner J, Anderson R, Guo J, Beraud C, Fletterick R, Sakowicz R.** (2001) Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *J Biol Chem.* 276(27):25496-502.
- Ulaganathan V, Talapatra SK, Rath O, Pannifer A, Hackney DD, Kozielski F.** (2013) Structural insights into a unique inhibitor binding pocket in kinesin spindle protein. *J Am Chem Soc.* 135(6):2263-72.
- Vale, R. D., T. S. Reese, and M. P. Sheetz.** (1985a) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* 42:39-50.
- Vale, R. D., B. J. Schnapp, T. Mitchison, E. Steuer, T. S. Reese, and M. P. Sheetz.** (1985b) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell.* 43:623-632.
- Vale RD, Schnapp BJ, Reese TS, Sheetz MP.** (1985c) Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell.* 40(3):559-69.
- Vale, R. D., and Y. Y. Toyoshima.** (1988) Rotation and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from *Tetrahymena* cilia. *Cell.* 52:459-469.
- van den Heuvel MG, Dekker C.** (2007) Motor proteins at work for nanotechnology. *Science.* 317(5836):333-6.
- Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY, Trauner D.** (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol.* 2(1):47-52.
- Wang F, Good JA, Rath O, Kaan HY, Sutcliffe OB, Mackay SP, Kozielski F.** (2012)

Triphenylbutanamines: kinesin spindle protein inhibitors with in vivo antitumor activity. *J Med Chem.* 55(4):1511-25.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 93(9):2325-7.

Wojcik EJ, Buckley RS, Richard J, Liu L, Huckaba TM, Kim S. (2013) Kinesin-5: cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. *Gene.* 531(2):133-49.

Woolley GA, Jaikaran AS, Berezovski M, Calarco JP, Krylov SN, Smart OS, Kumita JR. (2006) Reversible photocontrol of DNA binding by a designed GCN4-bZIP protein. *Biochemistry.* 45(19):6075-84.

Yamada MD, Nakajima Y, Maeda H, Maruta S. (2007) Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *J Biochem.* 142(6):691-8.

Youngburg, G.E. and Youngburg, M.V. (1930) A system of blood phosphorus analysis. *J. Lab. Clin. Med.* 16, 158-166.

Zee-Cheng KY, Cheng CC. (1970) Experimental antileukemic agents. Preparation and structure-activity study of S-tritylcysteine and related compounds. *J Med Chem.* 13(3):414-8.

Zhang, Y., and Xu, W. (2008) Progress on kinesin spindle protein inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 8, 698–704.

Zhang F, Timm KA, Arndt KM, Woolley GA. (2010) Photocontrol of coiled-coil proteins in living cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 49(23):3943-6.

謝辞

本研究を行うに当たり、終始暖かい激励とご指導を頂いた創価大学工学部教授 丸田 晋策先生に、心より感謝申し上げます。また、本論文の審査に当たり、貴重なご指導とご助言を頂いた創価大学工学部教授 池口 雅道先生、木暮 信一先生に心より感謝申し上げます。

遺伝子操作についてご指導して頂いた創価大学工学部准教授 近藤 和典先生に心より感謝申し上げます。化合物の命名法について、ご指導頂いた創価大学工学部教授 伊藤 真人先生に心より感謝申し上げます。化合物の精製、同定において、数多くのご助言・ご指導を頂いた創価大学卒業生の三橋 進也博士に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご協力頂いた丸田研究室の當山 奏子さん、田村 優樹さんに心より感謝申し上げます。また、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

そして、様々な形で激励をして下さった創立者 池田 大作先生、奥様に深く感謝申し上げます。最後になりますが、大学院入学を快く承諾し、常に応援してくれた祖父母、両親、妹に心から感謝します。