

# 新規フォトクロミック阻害剤を利用した 有糸分裂キネシン Eg5 の高効率光制御に関する研究

Study on the highly efficient photoregulation of mitotic kinesin Eg5  
using novel photo-chromic inhibitor

11D5607 貞包 慧

指導教授 丸田晋策

## SYNOPSIS

Living cell is composed of millions of densely packed biomolecules that perform so many tasks to constitute life. Recently, the structure and function of the biomolecules that have a key role in cell motility have been clarified. ATP driven molecular motor kinesin is one of the functional biomolecules and have roles in mitosis, meiosis and transport of cellular cargo, such as in axonal transport. Kinesin Eg5 is a microtubule plus-end directed homotetrameric molecular motor that is essential for the formation of bipolar spindle during eukaryotic cell division. Interestingly, Eg5 have a unique pocket at near the ATP binding site at where specific inhibitors of the Eg5 binds. S-trityl-L-cysteine (STLC) and monastrol are well known as potent Eg5 specific inhibitors. Inhibition of Eg5 with the inhibitors results in inducing cytostasis and apoptosis. In this study, novel photochromic inhibitors of Eg5 composed of spiropyran or azobenzene derivatives were designed and synthesized in order to control the function of Eg5 photo-reversibly with high efficiency. The inhibitors exhibited photoisomerization upon ultraviolet and visible light irradiations. The Eg5 inhibitors composed of single spiropyran derivative exhibited low efficient photoregulation. On the other hand, the compound (S)-2, 3-dispiropyran propionic acid (DSPPA) which contains two photochromic spiropyran moieties showed significant alteration of inhibitory activity accompanied by photo-isomerization. Furthermore, the function of Eg5 was regulated photo-reversibly by the double azobenzene derivative, 2, 3-bis[(2,5-dioxo-1-{4-[(E)-2-phenyldiazen-1-yl]phenyl}pyrrolidin-3-yl)sulfanyl] butanedioic acid (BDPSB) with extremely high efficiency. It was demonstrated that the novel Eg5 inhibitors containing double photochromic molecules enable highly efficient photoregulation of mitotic kinesin Eg5.

## 1. 緒言

生物個体の最小単位である細胞は、多種多様なタンパク質をはじめとする生体分子から構成されている。刺激を伝達する神経細胞、酸素の運搬を行う赤血球など、細胞固有の特徴は構成される生体分子の多種多様性によって形成されている。細胞自体はあたかも、生体分子間の複雑な相互作用によって制御された巨大な精密機械であると捉えられる。したがって、個々の生体分子の理解と制御が可能であれば、細胞の様々な機能を人為的に管理できることが示唆される。遺伝子工学的手法などの発展によって、一分子解析などを用いた細胞機能の分子レベルでの解析が可能となった。また、生体分子の活性と構造変化などの研究も飛躍的に進み、様々な細胞機能と生体分子の関係性が明らかとなっている。その中で、ATP の化学的エネルギーを運動エネルギーに変換するモータータンパク質が、細胞分裂、細胞運動、細胞小器官の輸送などの様々な細胞機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

モータータンパク質は主にミオシン、ダイニン、キネシンの3つに分類され、それぞれがスーパーファミリーを形成しており、非常に多くの種類が存在している。キネシンは、細胞骨格を形成する微小管上を移動することで、細胞内の物質輸送など様々な細胞機能に関与している。数あるキネシンファミリーの中で、キネシン 5 ファミリーに属するキネシン Eg5 は双極性の四量体を形成し、逆平行状態にある微小管 2 本と同時に結合するユニークな特徴を持つ(1, 2)。Eg5 は細胞周期の M 期において、逆平行状態にある微小管 2 本と架橋し、運動することで、細胞分裂に必要な紡錘体の

形成を行っている。Eg5 はその機能から、紡錘体形成タンパク質とも呼ばれ、欠損は細胞分裂の異常や細胞死の原因となる。細胞分裂時に特異的にはたらくことから、抗ガン剤の標的タンパク質としても注目されている。実際、STLC、Ispinesib、PVZB1194 といった Eg5 特異的な阻害剤が報告されている(図 1A-C)。また、Eg5-STLC 複合体の結晶構造解析や MD シミュレーションによって、その結合部位を含めた阻害機構の詳細が明らかとなっている(図 1D)。Eg5 阻害剤は様々な化学構造が報告されているが、興味深いことに、ほとんどが Eg5 に対する結合部位を共有している。Eg5 の阻害剤結合部位は、 $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ヘリックスと loop L5 で構成されており、阻害剤が結合したときに loop L5 構造が折りたたみとアロステリック変化が生じ、ADP 放出が抑制される(3, 4)。さらに、PVZB1194 などの一部の Eg5 阻害剤では、スクレオチド結合部位の反対に位置する  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  ヘリックスで構成された別の結合部位が報告されている(5)。

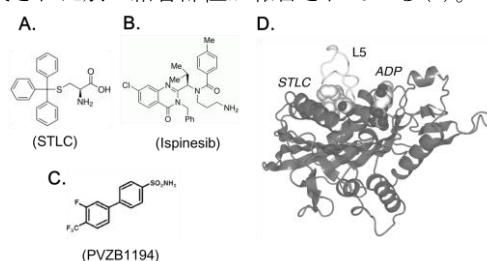


図1 Eg5 阻害剤の構造と結晶構造. (A-C) Eg5 阻害剤の化学構造式. (D) Eg5-ADP-STLC 複合体の結晶構造

阻害剤は、特定の生体分子の機能を不可逆的に制御するが、オプトジェネティクスや光応答性化合物と組み合わせることで、可逆的な制御が可能であると考えられる。オプトジェネティクスや光応答性化合物は、比較的弱い光による外部刺激によって、その構造が変化する。構造の変化は、化合物やタンパク質の活性に直接関わる要素である。したがって、光刺激による可逆的な構造変化は、化合物の活性変化を可能とする。光応答性化合物を阻害剤と組み合わせれば、標的タンパク質の活性を、光可逆的に制御する光応答性ナノデバイスとなりえる。

光応答性化合物(フォトクロミック分子)は可視光または紫外光照射によって可逆的に構造が変化する化合物の総称で、アゾベンゼン、スピロピランなどが知られている(図2)。山田、宍戸らはカルモジュリンやキネシンの機能部位にアゾベンゼンを化学修飾することで、その生理的機能を光制御することに成功している(6, 7)。しかしながら、化学修飾は生体や細胞への応用が難しいという問題がある。石川らは、既知のEg5阻害剤であるSTLCにアゾベンゼンを導入したフォトクロミックSTLCアナログを用いることで、Eg5活性を間接的に光制御することに成功した(8)。光異性体間の阻害活性に有意な差が認められたが、光スイッチング機能としては不十分であった。活性/不活性状態を光制御するためには、フォトクロミックEg5阻害剤の改良が必要である。

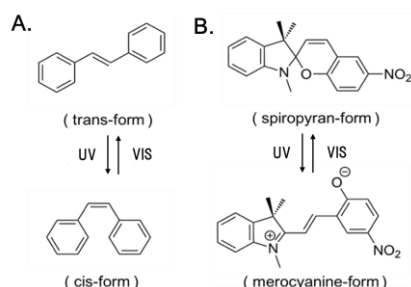


図2 光応答性化合物の光異性化。(A) アゾベンゼンの光異性化。(B) スピロピランの光異性化。

本研究では、新たにフォトクロミックEg5阻害剤を設計/合成して、Eg5活性の高効率な光制御を目指した。光異性体間の阻害活性の差を大きくするため、アゾベンゼンに代えてスピロピランを利用した。スピロピラン(図2B)は可視光照射で疎水性の閉環構造に、紫外光照射で対イオンを有した親水性の開環構造に可逆的に光異性化する。アゾベンゼンなどの光応答性化合物の光異性化が立体配座だけなのに対して、スピロピランは構造と極性が大きく異なる特性を持っている。したがって、阻害剤として利用した場合、光異性体間で効果が劇的に変化すると予想される。また、スピロピラン単体の構造も、Eg5阻害剤の1つであるispinesibに類似している点も最適であると考えた。しかしながら、スピロピラン誘導体からSTLCアナログ、ispinesibアナログとして合成した阻害剤では効果的な差が見られなかった。Ispinesibが疎水性部位を複数持つことから、スピロピランを2つ導入したフォトクロミックEg5阻害剤DSPPAを検証した。その結果、阻害活性も光制御の効率も向上した。アゾベンゼンに関しても、石川らのSTLCアナログとは異なるアプローチを検討した。Eg5阻害剤の1つであるPVZB1194(図1D)がアゾベンゼンと類似した構造を持つことから、2つのアゾベンゼンを両端に付加したBDPSBを合成した。ATPase活性、モーター活性評価を行った結果、BDPSBはtrans-cis体の光異性体間でほぼ完全に近い効率で、Eg5活性を光制御した。

## 2. 材料と方法

**2-1. Eg5及び微小管の調製** Eg5モータードメイン及びKinesin-1は大腸菌培養系から調製した。得られた目的タンパク質はHis-tagを介したコバルトキレートカラムで精製した。チューブリンは豚脳組織からHackneyの方法にしたがって調製した(9)。一部のチューブリンはMAPs(微小管結合タンパク質)の除去と、ローダミンによる蛍光標識処理を行った。GTPを加えて37℃でチューブリンを重合後、タキソール処理で重合の停止と、調製した微小管の安定化を行った。

**2-2. フォトクロミックEg5阻害剤の合成** L-cys-IASPとN-Ac-cys-IASPは、石川らの方法(10)にしたがって合成したチオール基反応性のモノヨードスピロピラン(IASP)にL-システインまたはN-アセチル-L-システインを導入して合成した。L-cys-MASPは、チオール基反応性のマレイミドスピロピラン(MASP)にL-システインを導入して合成した。SP-APA, SP-ABA, SP-lysineは第一級アミンと架橋するスピロピラン-NHS-エステルを利用して調製した。それぞれ、DL-2, 3-ジアミノプロピオン酸、(s)-(+)-2, 4-ジアミノ酪酸、L-lysineを1:2のモル比で混合して合成し、フラッシュカラムと逆走クロマトグラフィーを用いて精製した。DSPPAは第一級アミンと架橋するスピロピラン-NHS-エステルを利用して調製した。スピロピラン-NHS-エステルとDL-2, 3-ジアミノプロピオン酸を1:2で混合し、目的物を逆走クロマトグラフィーとフラッシュカラムで精製した。BDPSBはチオール基反応性のフェニルアゾマレインナニル(PAM)を利用して合成した。meso-2, 3-ジメルカプトコハク酸とPAMを1:3で混合して合成し、逆走クロマトグラフィーとフラッシュカラムで精製を行った。合成の確認はFAB-MSで行った。

**2-3. フォトクロミックEg5阻害剤の光異性化** DMFまたは緩衝液に溶解した各阻害剤の光異性化は、白色LEDによる可視光照射、または366nmの紫外光照射で行った。可逆的な光異性化の確認は、光異性化にともなう吸光スペクトルの変化で測定した。

**2-4. Eg5 ATPase活性の測定** Eg5およびKinesin-1のATPase活性は、光異性化した阻害剤を含む緩衝液中で、ATP加水分解で生じたリン酸イオン濃度から測定した。リン酸イオン濃度はヤングーバーク法で定量した(11)。

**2-5. Eg5微小管滑り運動活性の測定** フローセル表面に固定されたEg5のモーター活性によって運動する蛍光標識微小管を、CCDカメラを搭載した蛍光顕微鏡で解析した。微小管滑り運動速度はNIH Image Jを用いて行った。

## 3. 結果と考察

### 3-1. スピロピラン誘導体由来フォトクロミックSTLCアナログの合成と阻害活性の確認

L-cys-IASP, N-Ac-cys-IASPおよびL-cys-MASPは既知のEg5阻害剤であるSTLCを参考に設計した(図3)。STLCはアミノ酸側鎖を介してトリチル基とシステインが連結した構造を持つ。トリチル基はEg5と強力な疎水性結合を発生させ、システインは周囲のアミノ酸残基と相互作用を起こすことで、ATPaseサイクルにともなうアロステリックな構造変化を抑制する。フォトクロミック分子であるスピロピランはトリチル基に対応し、これにシステインを付加することで阻害活性が付与されることを期待した。Eg5 ATPase活性の阻害効果について、光異性化した各阻害剤を濃度依存的に加えて微小管依存性ATPase活性を測定した。L-cys-IASPは、光可逆的な阻害効果を示したが、構造的に不安定

であった。N-Ac-cys-IASP は構造的に安定となったが、阻害効果は減退した。

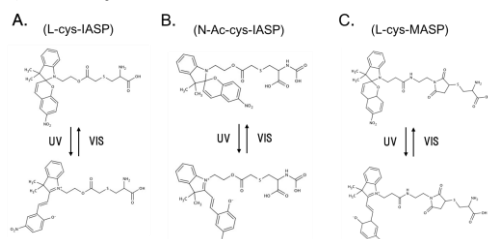


図3 STLCLを参考としたフォトクロミック Eg5 阻害剤の光異性化。(A) L-cys-IASP. (B) N-Ac-cys-IASP. (C) L-cys-MASP.

L-cys-MASP は非常に高い阻害効果を示した。また MC 型の方が SP 型よりも高い阻害効果を示した (図 4A)。しかしながら、L-cys-MASP は微小管非存在下における Basal Eg5 ATPase 活性をほとんど阻害しなかった (図 4B)。微小管滑り運動では有意なモーター活性の阻害効果は確認されず、微小管と Eg5 の相互作用を阻害していたことが明らかとなった。したがって、L-cys-MASP は Eg5 と微小管の相互作用に対して、光可逆的に高い阻害効果を持つが、Eg5 の阻害剤としては機能していないことが示唆された。

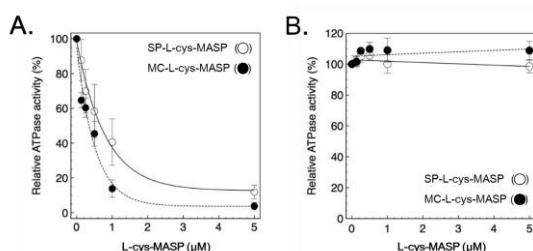


図4 L-cys-MASP 光異性体による Eg5 ATPase 活性の阻害。(A) 微小管依存性 ATPase 活性。(B) Basal ATPase 活性。

**3-2. スピロピラン誘導体由来フォトクロミック *ispinesib* アナログの合成と阻害活性の確認** Eg5 阻害剤は STLCL や Monastrol 以外にも、*ispinesib* (12) や PVZB1194 (5) など数多く報告されている。STLCL に代わるスピロピランと類似した Eg5 阻害剤を検証し、*ispinesib* に注目した。*ispinesib* は、4-キナゾリノン、2つのベンゼン環、1つのイソプロピル基を持ち、Eg5 に強力な疎水性相互作用で結合する。また、カルボキシ基とアミノプロピル基が結合部位周辺のアミノ酸残基と相互作用を起こし、阻害活性を促進していると考えられている。MC 型スピロピランは *ispinesib* と類似した構造を持つと予想されたが、SP-COOH には Eg5 ATPase 活性の阻害活性を認められなかった。そこで、SP-COOH にアミド架橋剤を用いて長さの異なるアミノプロピル基を付加して、*ispinesib* アナログを3種類 (SP-APA、SP-ABA、SP-lisine) 合成した (図 5)。

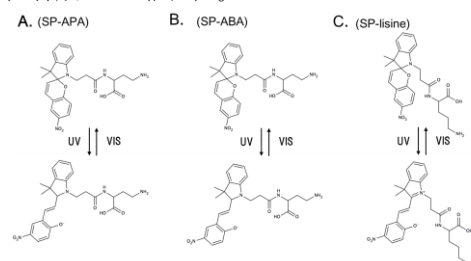


図5 *ispinesib* を参考としたフォトクロミック Eg5 阻害剤の光異性体。(A) SP-APA. (B) SP-ABA. (C) SP-lisine.

SP-lisine ではほとんど阻害活性は確認されず、SP-APA はわずかに阻害活性を示したが、光可逆的な阻害活性の変化は見られなかった。SP-ABA は SP-APA に近い阻害活性であったが、光異性体間で阻害活性に差が見られた。しかしながら、これらのフォトクロミック *ispinesib* アナログは Eg5 活性の光制御に利用するための、十分な阻害活性を獲得できなかった。

**3-3. 2つのスピロピランを持つ Eg5 阻害剤: DSPPA による Eg5 活性の光制御** *ispinesib* の構造を参考に、スピロピラン誘導体による Eg5 阻害活性の向上と光異性体間での広げるために、2つのスピロピラン部位を導入した DSPPA を新たに合成した (図 6)。

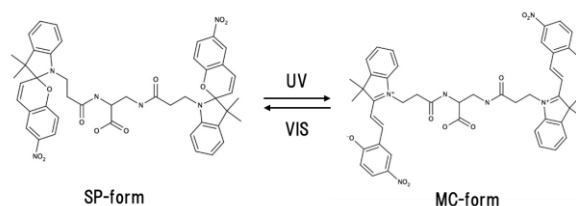


図6 2つのスピロピランを持つフォトクロミック Eg5 阻害剤; DSPPA の構造と光異性体。

DSPPA は微小管依存性 Eg5 ATPase 活性に対して阻害活性を示し、また SP 型が MC 型よりも効果的であった (図 7A)。半数阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は、SP 型で  $3.77 \pm 0.27 \mu M$ 、MC 型で  $7.97 \pm 0.31 \mu M$  となり、光異性化による阻害活性の変化も確認された。微小管の存在しない条件、Basal Eg5 ATPase 活性についても同様に DSPPA の阻害活性を検証した (図 7B)。微小管依存性 ATPase 活性と比較して、アフィニティが向上したが、光異性体間の差は少なくなった ( $IC_{50}$ ; SP =  $2.09 \pm 0.10 \mu M$ , MC =  $3.67 \pm 0.12 \mu M$ )。また、微小管濃度依存性を検証した結果、DSPPA 存在下では  $V_{max}$  の減少が見られ、SP 型は MC 型よりも  $K_{mt}$  が低いことも確認された。微小管滑り運動を用いて、光異性化した DSPPA 存在下における Eg5 モーター活性も測定した。コントロールと  $5.0 \mu M$  DSPPA 光異性体の速度分布を比較した結果、顕著な差は認められなかった (平均速度; コントロール,  $23.2 \pm 0.4 \text{ nm/s}$ . SP-DSPPA,  $24.6 \pm 0.5 \text{ nm/s}$ . MC-DSPPA,  $21.0 \pm 0.4 \text{ nm/s}$ )。

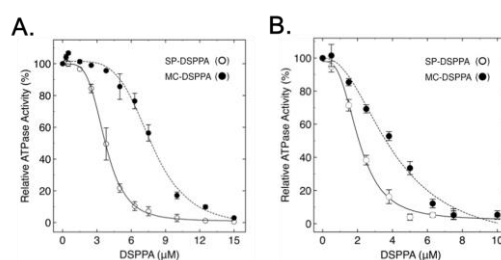


図7 DSPPA 光異性体による Eg5 ATPase 活性の阻害。(A) 微小管依存性 ATPase 活性。(B) Basal ATPase 活性。

**3-4. 2つのアゾベンゼンを持つ Eg5 阻害剤: BDPSB による Eg5 活性の光制御** 石川らが報告したアゾベンゼン誘導体由来 STLCL アナログである ACTAB は、cis-体でも Eg5 活性の阻害効果を示した (8)。アゾベンゼンの構造は PVZB1194 などの Eg5 阻害剤と類似していると推測し、スピロピラン同様、アゾベンゼン自体をアナログとした設計を試みた。DSPPA が Eg5 に対する阻害活性、光制御効率の向上が見られたことから、アゾベンゼンを2つ導入した BDPSB を新たに合成した (図 8)。

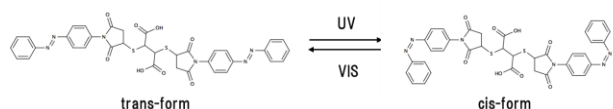


図8 2つのアゾベンゼンを持つフォトクロミック Eg5 阻害剤；BDPSB の構造と光異性体。

BDPSB の Eg5 ATPase 活性に対する阻害効果は、微小管依存性において DSPPA よりも低かったが、光異性体間で大きな差が認められた (図 9A)。 $IC_{50}$  は trans-BDPSB で  $74.2 \pm 2.5 \mu\text{M}$  となり、cis-BDPSB では測定できなかった。アゾベンゼンの Cis-体は約 25% の trans-体を含むことから (13)、純粋な cis-BDPSB 濃度における阻害曲線を計算した (図 9A の破線)。その結果、cis-体の阻害活性はほぼ見られず、Eg5 活性は完全に光制御されていた。一方、Basal ATPase 活性は BDPSB によって促進された (図 9B)。特に、trans-BDPSB は  $25 \mu\text{M}$  で ATPase 活性の促進効果が極大となり、そこから濃度依存的に減少して  $100 \sim 150 \mu\text{M}$  の範囲では阻害効果を示した。微小管濃度に対する BDPSB の阻害効果を検証したところ、trans-BDPSB について  $K_{mt}$  の減少が見られた。したがって、STLC などの Eg5 阻害剤と異なり、BDPSB は微小管アナログ、または微小管結合状態を模倣するように、Eg5 と結合していると示唆された。

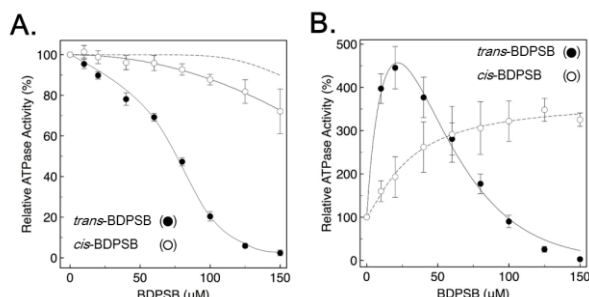


図9 BDPSB 光異性体による Eg5 ATPase 活性の阻害. (A) 微小管依存性 ATPase 活性. (B) Basal ATPase 活性.

DSPPA 同様に、モーター活性に対する BDPSB の阻害活性を検証した (図 10)。コントロールと比較して、cis-体は分布がやや広がった程度で、モーター活性の阻害効果は見られなかった。一方、trans-BDPSB は、フローセル内に固定した Eg5 と結合した微小管が著しく減少したと同時に、モーター活性はほとんど停止していた。

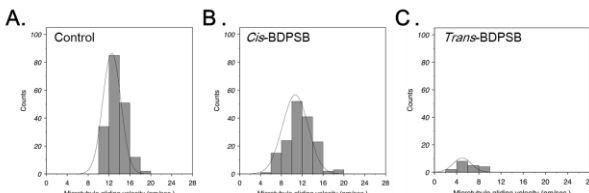


図10 BDPSB 光異性体による Eg5 モーター活性の阻害. (A) 5.0% DMF. (B)  $100 \mu\text{M}$  cis-BDPSB. (C)  $100 \mu\text{M}$  trans-BDPSB.

#### 4. 総括

スピロピラン誘導体から各種 Eg5 阻害剤を合成、検証した結果、2つのフォトクロミック分子を導入することで阻害活性と、その光制御の効率が向上した。DSPPA は ispinesib と類似した構造を持つことから、Eg5 の阻害剤結合部位を STLC などと共有していると予想される。BDPSB は、Eg5 の阻害剤結合の反対側にある  $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$  ヘリックスで構成された結合部位を標的していると推測された。この結合部位に

は、アゾベンゼンと類似した構造を持つ PVZB1194 などの比較的新しく報告された阻害剤が結合する (5)。興味深いことに、これらの阻害剤は STCL と異なる阻害メカニズムが示唆されている。DSPPA、特に BDPSB は Eg5 活性を光制御するための、ナノデバイスとして十分な活性を有することは明らかである。このフォトクロミック Eg5 阻害剤を哺乳類細胞の *in vivo* 培養系へ応用できれば、有糸分裂及び細胞分裂を光可逆的に制御できる可能性は高い。今後は、細胞培養系への応用を進めると同時に、*in silico* シミュレーション等を用いて、これらの阻害剤が Eg5 にどのように結合しているか、解明していく必要がある。また、阻害機構について、ATP アナログなどを用いた速度論的解析によって、ATPase サイクルのどの段階を阻害しているか明らかにしていく。これらの知見をもとに、BDPSB のような高効率に阻害活性を光制御できる、光応答性ナノデバイスのさらなる展開を進めていく。

#### 参考文献

1. Cole DG, et al. (1994) A "slow" homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. *J Biol Chem.* 269:22913-6.
2. Blangy A, et al. (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell.* 83:1159-69.
3. Brier S, et al. (2006) Molecular dissection of the inhibitor binding pocket of mitotic kinesin Eg5 reveals mutants that confer resistance to antimetabolic agents. *J Mol Biol.* 360: 360-76
4. Kaan HY, et al. (2009) An allosteric transition trapped in an intermediate state of a new kinesin-inhibitor complex. *Biochem J.* 425:55-60
5. Yokoyama H, et al. (2015) Structural basis of new allosteric inhibition in Kinesin spindle protein Eg5. *ACS Chem Biol.* 10:1128-36
6. Yamada MD et al. (2007) Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *J Biochem.* 142:691-8
7. Shishido H, et al. (2009) Photocontrol of calmodulin interaction with target peptides using azobenzene derivative. *J Biochem.* 146:581-90
8. Ishikawa K, et al. (2014) Photocontrol of the mitotic kinesin Eg5 using a novel S-trityl-L-cysteine analogue as a photochromic inhibitor. *J Biochem.* 155:257-63.
9. Hackney DD, et al. (1988) Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6314-8.
10. Ishikawa K, et al. (2014) Photocontrol of mitotic kinesin Eg5 facilitated by thiol-reactive photochromic molecules incorporated into the loop L5 functional loop. *J Biochem.* 155:195-206
11. Youngburg, G.E. and Youngburg, M.V. (1930) A system of blood phosphorous analysis *J. Lab. Clin. Med.* 16. 158-166
12. Lad L, et al. (2008) Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry.* 47:3576-85.
13. Behrendt R, et al. (1999) Photomodulation of the Conformation of Cyclic Peptides with Azobenzene Moieties in the Peptide Backbone. *Angew Chem Int Ed Engl.* 38(18):2771-2774.

