

博士学位請求論文

論文題目 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

専攻名 生命情報工学

学籍番号 11D5607

氏名 貞包 慧

指導教員 丸田 晋策

創 価 大 学 大 学 院
工 学 研 究 科

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 の高効率な光制御に関する研究

2018 年 9 月

貞包 慧

第1章 序論

1.1	はじめに	
1.1.1	本研究の目的と意義	p6
1.1.2	本論文の構成	p9
1.2	モータータンパク質概要	
1.2.1	モータータンパク質	p11
1.2.2	キネシン	p15
1.3	キネシン Eg5 の特徴と生理的機能	
1.3.1	キネシン Eg5	p17
1.3.2	抗ガン剤の標的分子としてのキネシン Eg5	p18
1.4	光応答性分子	
1.4.1	フォトクロミック化合物	p22
1.4.2	ナノスイッチとしての光応答性分子の応用	p23
1.5	第1章総括	p26
	付表・付図	p27

第2章 スピロピラン誘導体由来 Eg5 フォトクロミック阻害剤による Eg5 活性の光制御

2.1	本章の要旨	p64
2.2	緒言	p65
2.3	実験材料と方法	
2.3.1	試薬	p68
2.3.2	Eg5 モータードメインの調製	p68
2.3.3	Eg5 モータードメインの発現と精製	p69
2.3.4	微小管の調製	p71
2.3.5	蛍光標識微小管の調製	p71
2.3.6	L-cys-IASP, N-Ac-cys-IASP の合成	p72
2.3.7	L-cys-MASP の合成	p73
2.3.8	SP-APA, SP-ABA, SP-lisine の合成	p74
2.3.9	光異性化の測定	p75
2.3.10	ATPase 活性の測定	p75
2.3.11	モーター活性の測定 (微小管滑り運動)	p76
2.4	結果と考察	
2.4.1	IASP, MASP 由来 Eg5 フォトクロミック阻害剤による ATPase 活性の光制御	p78
2.4.2	SP-COOH-NHS-Ester 由来 Eg5 フォトクロミック阻害剤による ATPase 活性の光制御	p82
2.5	第2章のまとめ	p85

付図・付表	p86
第3章 2つのフォトクロミック分子を持つ新規阻害剤によるEg5 活性の光制御	
3.1 本章の要旨	p99
3.2 緒言	p102
3.3 実験材料と方法	
3.3.1 試薬	p105
3.3.2 Eg5 モータードメインの調製	p105
3.3.3 Eg5 モータードメインの発現と精製	p105
3.3.4 Kinesin-1 の調製	p105
3.3.5 Kinesin-1 の発現と精製	p105
3.3.6 微小管の調製	p105
3.3.7 蛍光標識微小管の調製	p106
3.3.8 DSPPA の合成	p106
3.3.9 BDPSB の合成	p106
3.3.10 光異性化の測定	p107
3.3.11 ATPase 活性の測定	p107
3.3.12 モーター活性の測定（微小管滑り運動）	p108
3.4 結果と考察	
3.4.1 DSPPA による Eg5 ATPase 活性の光制御	p109
3.4.2 DSPPA による Eg5 モーター活性の光制御	p111
3.4.3 BDPSB による Eg5 ATPase 活性の光制御	p112
3.4.4 BDPSB による Eg5 モーター活性の光制御	p116
3.5 第3章のまとめ	p118
付図・付表	p119
第4章 総括と展望	
4.1 総括	p142
4.2 課題と展望	p144
付図・付表	p148
参考文献	p153
謝辞	p159

略称一覧

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
ADP	adenosine-5-diphosphate
ATP	adenosine-5-triphosphate
BDPSB	2,3-bis[(2,5-dioxo-1-{4-[(<i>E</i>)-2-phenyldiazen-1-yl]phenyl}-pyrrolidin-3-yl)sulfanyl]butanedioic acid
cDNA	complementary DNA
DSPPA	dispiropyran propionic acid
DTT	dithiothreitol
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DNA	deoxyribo nucleic acid
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	<i>O,O'</i> -Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)9-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
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
L-cys	L-cystein
MASP	Maleimide spiropyran
MC(-form)	Merocyanine(-form)
MD	Motor domein
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propane sulfonic acid
MT	microtubule
N-Ac-L-cys	N-acetyl-L-cystein
PAM	<i>N</i> -(4-phenylazophenyl) maleimide
PCR	polymerase chain reaction
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SP(-form)	Spiropyran(-form)
SP-APA	Spiropyran amino-propionic acid
SP-ABA	Spiropiran amino-butyric acid
SP-COOH	Spiropyran-Carboxylic acid
SP-lisine	Spiropyran-lysine
STLC	S-trityl-L-cysteine
THF	tetrahydrofuran
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
WT	wild-type

第 1 章

序論

1.1 はじめに

1.1.1 本研究の目的と意義

生物個体が有する様々な器官・臓器の機能は、どのような細胞で構成されているかで決定する。細胞は生物個体の最小単位であり、様々な機能を持った細胞が複雑に組み合わせることで、器官・臓器は正常な役割を果たしている。細胞自体はタンパク質などの巨大な分子やペプチド、脂質の他に、ATPなどの比較的小さな分子、さらにカルシウムイオンなど様々な化合物の組み合わせによって構成されている。これらの細胞構成物質の中で、特に細胞機能の制御については、多種多様なタンパク質の複雑な相互作用によるものである。例えば、遺伝子発現を支配するヒストンやRNAポリメラーゼ、細胞運動を担うミオシンやアクチン、特定のタンパク質や遺伝子を活性化するシグナル伝達系のRasや各種キナーゼなど、ほとんどの細胞機能はタンパク質の活性によって説明できる。また、ATPやイオン類などの小分子は、これらのタンパク質の活性化、安定化や構造変化に必要となる。したがって、細胞はタンパク質を主とする“生体分子”によって高度に制御された1種の精密機械であると捉えることもできる。生体分子の制御系によって、細胞は様々な機能を発現する。

主な生体分子であるタンパク質はアミノ酸配列からなる一次構造、ヘリックスなどの二次構造を経て、複雑な3次構造を形成して初めて酵素としての機能を発揮する。さらに同種、または異種のタンパク質同士が2個以上集合した四次構造を形成することで、新たな機能を発現する場合もある。タンパク質の複雑な構造は、そのタンパク質がどのような活性を獲得するかを左右する、重要な要素であり、2000年以降、MDシミュレーションの普及にともなって構造変化に関する研究が進展した。特に、アロステリック酵素と呼ばれる、活性部位とは別に自身の構造変化に関わる結合部位を有するタンパク質では、その仕組みを利用した活性の制御が行われている。タンパク質の構造は特異的な活性の獲得以外に、自らの機能を制御するために積極的かつ劇的な構造変化の仕組みが存在するのである。

本研究で扱うモータータンパク質は、外因性化合物によるアロステリック変化や、自身

の酵素活性に基づく構造変化を巧みに利用し、力学的エネルギーを生み出すことができる。モータータンパク質は主にダイニン、ミオシン、キネシンの3種類に分類される[1]。ダイニンはATP合成酵素であるF1-ATPaseも分類される“AAA+タンパク質”の1種であり、微小管のマイナス端方向へ運動する。ミオシンとキネシンは、nucleotide switch タンパク質から派生した Kyosin を共通祖先とするモータータンパク質である[2] (図 1-1)。どちらのモータータンパク質も、ATP 加水分解に関わるヌクレオチド結合部位とその近傍に位置する P-loop 及び Mg 結合部位、Switch I、Switch II が高度に保存されている。これらの共通部位は ATP 加水分解の過程で、タンパク質全体の構造変化を促し、微小管またはアクチン上を運動するためのエネルギーを生み出す[3-4]。タンパク質全体の構造変化は ATP 加水分解サイクルに準じて段階的かつ機械的な連動で生じるが、キネシンの場合は neck-linker と coiled-coil ドメインの変化に、ミオシンの場合は converter 領域とレバーアームの変化に帰結する。

モータータンパク質の活性は、細かな差異はあるが、全て“ATP 加水分解サイクルに伴う段階的かつ機械的な構造変化”によって生じる。このことは、モータータンパク質は ATP 加水分解による化学的エネルギーを効率的に運動エネルギーへと変換できる、極めて微細な機械であると捉えられる。実際に、Martin ら(2007)はモータープロテインが“ナノマシン”として様々な分野へと応用できることを提唱している[5]。ナノマシンとしてのモータータンパク質の応用のためには、本来の機械的な構造変化を外部刺激で、人工的に制御することが不可欠である。リン酸化や補因子を通じたタンパク質同士の相互作用によるモータータンパク質の活性制御に関する研究によって、二次構造やアミノ酸残基レベルで活性化に重要な部位は判明している。その成果の一部は、阻害剤の開発や変異体による不可逆的な制御の成功へと続いている。例えば、ブレビスタチンはミオシン II のモーター活性を特異的に阻害することが報告されている[6]。しかしながら、これらは活性化または不活性化の一方への不可逆的な制御であり、ナノマシンとして応用するのは不可能である。モータータンパク質をナノマシンとして制御するためには、ナノスイッチのような可逆的な制御

機構を組み込む必要がある。

ナノスイッチとして、生体分子への応用が期待される化合物として、“光応答性化合物” “オプトジェネティクス” が注目される。前者は比較的小さな化合物を、後者はタンパク質レベルの巨大な分子を対象としているが、どちらも特定の波長の光照射によって構造が可逆的に制御される。オプトジェネティクスについては、光応答性の Optin 遺伝子などを遺伝子レベルでイオンチャネルなどに導入することで、神経伝達信号の可逆的な光制御が行われている[7]。Optin 以外にも、splitGFP タンパク質[8]や Dronpa[9]などの光応答性タンパク質が利用され、今後さらなる発展が期待される分野である[10]。光応答性化合物はアゾベンゼン、スピロピランやジアリールエテンなどが知られており、工業レベルでは液晶ディスプレイや機能性色素などへの応用が進んでいる[11-12]。生命科学の分野においても、ナノスイッチの 1 つとして、これらの光応答性化合物が注目されている。例えば、アゾベンゼンやスピロピランを DNA や RNA に導入することでタンパク質発現を光制御することや[13-15]、アゾベンゼン架橋によってポリペプチドの二次構造を光制御する試みが既に報告されている[16]。キネシンに対する光応答性化合物の応用として、すでにいくつかの先行研究が報告されている。山田らはキネシンにアゾベンゼンを化学修飾することで、ATPase 活性を制御することにすでに成功した[17]。しかしながら、化学修飾によって直接、光応答性化合物を導入する方法は、生体への応用などが困難である。間接的な阻害する方法として、Nomura らは光応答性ケージド化合物を利用することで、キネシンのモーター活性の光制御に成功している[18]。また、Kumer KR らは、キネシンの微小管結合部位に特異的に結合するポリペプチドにアゾベンゼンを導入し、モーター活性の光制御に成功している[19]。石川らは、抗がん剤の標的タンパク質として注目されるキネシン Eg5 に特異的な阻害剤である STLC にアゾベンゼンを導入したフォトクロミック Eg5 阻害剤 ACTAB を合成した[20]。ACTAB を用いることで間接的に、Eg5 の ATPase 活性とモーター活性の光制御に成功したが、光異性体間における阻害活性の差は小さかった。すなわち、ACTAB による Eg5 に対する阻害活性の光制御の効率は低く、ナノスイッチとしては不十分であった。

本研究は、フォトクロミック Eg5 阻害剤の光異性体間における阻害活性を大きくし、Eg5 活性の光による完全な制御を目的とした。阻害活性の強さは、阻害剤の構造的な特徴に基づく。したがって、フォトクロミック Eg5 阻害剤の光異性体の構造と特徴が劇的に変化すれば、Eg5 阻害活性の光制御効率も劇的に向上することが予想される。光制御効率を向上するために、本研究では2つのアプローチを行った。1つ目は、アゾベンゼンと比較して、光異性化で構造と極性の2つのパラメーターが変化するスピロピランを導入した。スピロピランは疎水性で閉環構造の“スピロ型”と、双性イオンを持つ開環構造の“メロシアニン型”に、光異性化する。2つ目は、光異性化に伴う構造と特徴の変化がフォトクロミック分子を複数連結することで変化することを利用した。結果としてフォトクロミック Eg5 阻害剤の光制御の効率は、スピロピランを導入した場合はたいして向上しなかったが、フォトクロミック分子を2つ導入した場合は向上した。特に、アゾベンゼンを2つ導入したフォトクロミック阻害剤は、trans-体で見られる阻害活性が cis-体ではほとんど現れず、Eg 活性のほぼ完全な光制御に成功した。

1.1.2 本論文の構成

本論文は4つの章から構成される。

第1章の序論では目的と意義、また本研究で重要となる3つのキーワードについて、詳細に紹介した。はじめに、将来的にナノマシンとしての応用が期待される、機械的な仕組みを持つ生体分子モータータンパク質の概要を記載した。次に、多種多様なモータータンパク質の中から、本研究が対象として選択したキネシン Eg5 の特徴と生理的機能について詳細に取り上げた。また、キネシン Eg5 の抗がん剤への応用についても詳細を記載した。最後に、生体分子をナノマシンとして制御するための方法の1つである、光応答性分子について詳細を記述した。光応答性分子の化学的な背景の他に、ナノスイッチとしての応用例などを紹介する。

第2章では、設計/合成した様々なスピロピラン由来のフォトクロミック Eg5 阻害剤につ

いて、キネシン Eg5 の光制御を試みた結果を記載した。第 2 章のフォトクロミック Eg5 阻害剤は、既知の Eg5 阻害剤である STLC や ispinesib の構造を参考として設計したものである。スピロピランの合成法は既知の方法にしたがい、スピロピラン Eg5 阻害剤アナログが Eg5 の光制御に有用であるか検証した。

第 3 章では、第 2 章の知見を元に、スピロピランまたはアゾベンゼンを 2 つ導入したフォトクロミック Eg5 阻害剤による Eg5 活性の制御を試みた結果を示した。2 つのスピロピランを導入することで、Eg5 活性の光制御の効率は増大した。さらに、スピロピランの事例をもとに、2 つのアゾベンゼンを導入したフォトクロミック Eg5 阻害剤も設計/合成し、Eg5 活性の光制御を試みた。2 つのアゾベンゼンを導入したことで、Eg5 活性の光制御の効率は、さらに増大し、ナノスイッチとして実用的なレベルまで改良することに成功した。

第 4 章では、本研究の成果と結論を述べるとともに、細胞への応用に関する予備的研究成果を記載した。また、キネシン Eg5 の制御に関して、フォトクロミック Eg5 阻害剤の今後の展望と、応用へ向けての改良案について考察した。さらにナノマシンとしてのキネシン Eg5 の生体への応用について、他の光応答性化合物なども考慮の上、その応用の可能性も記述した。

1.2 モータータンパク質概要

1.2.1 モータータンパク質

モータータンパク質は、ATP加水分解に伴う機械的な構造変化を利用して、微小管とアクチン繊維から構成された細胞骨格上を運動するタンパク質である[21]。モータータンパク質の概念は、1941～1943年にかけてBangaらによる骨格筋に関する一連の報告で明らかにされ、ミオシンとアクチンが発見された[22-23]。次いで、Gibbonsらは微小管上を運動する別のモータータンパク質であるダイニンを発見した[24]。キネシンの発見はもっとも新しく、Gillber、Valeらによってその存在が確認された[25-26]。また、1990年代にはキネシンとミオシン、2011年にはダイニンの結晶構造解析に成功し、1990年代終わりから普及した光ピンセットや一分子計測による力学的解析結果と合わせて、実際にモーター活性を生み出すための機械的仕組みについて、飛躍的に理解が向上した。その結果、これらのモータータンパク質がどのような機械的仕組みで運動制御しているのか分子レベルで明らかとなり、現在ではナノマシンとしての応用が期待されている[5]。図1-2は各モータータンパク質の構造を比較したものである。全てのモータータンパク質は主に3つのドメインに分けられており、モーター活性を発生するモータードメイン、ストロクドメイン、テイルドメイン (Associated polypeptides) から構成されている。

ダイニンは存在の確認自体はミオシン同様、モータータンパク質の分野では比較的歴史は長いが、2000年代までその機械的仕組みの理解は待たなければならなかった。2003年にダイニンの力学的性質の解析結果がはじめて報告され[27]、2011年に結晶構造解析に成功したことで[28]、2018年現在、ミオシンやキネシンとは大きく異なり、その機械的仕組みが解明されつつある。ATP加水分解に伴う機械的構造変化を利用した運動という点では、ダイニンは明らかにモータータンパク質であるが、そのメカニズムは同じ回転構造を有する分子モーターから発展したものである。分子モーターはF1-ATPase酵素、DNAヘリカーゼなどで知られており、ATP加水分解の化学的エネルギーを利用して、分子構造が回転することができる[29]。ダイニンは、分子モーターの1つであるAAA+タンパク質を構造に取

り込んでおり、これが回転する際の運動で微小管上を動く（図 1-3）。ダイニンは荷物を運ぶための linker-tail 領域、モーター活性を生み出す AAA+領域、微小管上を動かための微小管結合領域（Microtubule-binding domain; MTBD）を含む stalk 領域の 3 つから構成されている（図 1-3A）。このうち、tail 領域を除く部分がモータータンパク質として機能している。ダイニンはホモ二量体を形成し、linker を介して AAA+領域が回転したときの動きが stalk 領域に連動することで微小管上をマイナス端方向へ運動していく [30]。したがって、ダイニンは AAA+領域が生み出す回転エネルギーと連動して、linker 領域がレバーのように動くことで動いている。この linker 領域と AAA+タンパク質の相互作用は ATP 加水分解サイクルと連動しており、さらに MTBD の微小管に対する結合力の変化などにも関与していることが分かっている（図 1-3B） [1]。

ミオシンとキネシンは、ダイニンや分子モーターとは異なる機械的な仕組みを持つ。ダイニンが利用している AAA+領域などの、分子モーターの機械的な仕組みは、分子自体が回転することで生まれる運動である。一方、ミオシンとキネシンの機械的な仕組みは、分子構造の回転には起因しない点で、非常に特殊であるといえる。また、ATP 加水分解過程で生じる構造変化で制御される細胞骨格に対する結合方法も、ミオシンとキネシンでは異なる。図 1-4A はモータータンパク質の細胞骨格に対する結合における、機械的な構造変化サイクルと、エネルギー源となる ATP の加水分解サイクルを比較している。ATP 結合から ADP 放出までには、図で示したような中間体状態が存在し、各中間体は構造変化の各段階と連動している。図 1-4B はミオシンの、図 1-4C はキネシンの ATP 加水分解サイクルの各ステップにおける、モータータンパク質の細胞骨格への相互作用の段階を示している。注目すべきは、ミオシンでは ADP 状態で強くアクチン繊維に相互作用し、キネシンの場合はヌクレオチドフリーの apo 状態と ATP 状態で強く微小管と相互作用している。また、実際の運動エネルギーは、ミオシンの場合は ADP 放出に際して、キネシンの場合は ATP の加水分解に際して発生している。このように、ミオシンとキネシンは似たような構造変化で運動するが、その利用方法は結合する細胞骨格同様、異なっている。

次に、ミオシンとキネシンの構造の共通点について、結晶構造解析を比較したものを図 1-5 に示した[4]。重要な二次構造については、それぞれ色で分けられている。Switch I（黄色）、Switch II（緑色）、P-loop（赤色）はヌクレオチド結合部位を構成し、ATPase 活性に必要不可欠な領域である。P-loop はヌクレオチドの α 、 β 、 γ -リン酸と直接相互作用する部位であり、Walker 型と呼ばれる NTPase 活性を有したアミノ酸配列（GxxxxGK）でもある[31]。また、P-loop の周辺に位置する Switch I、Switch II は γ -リン酸の有無を判別し、P-loop の ATPase 活性に準じたタンパク質全体の構造変化を促すために必要不可欠な存在である[32]。したがって、これらの共通構造がモータータンパク質全体の構造変化に関するイニシエータとして高度に保存されており、そこから機械的に連動していく方法と部位の違いがミオシンとキネシンを特徴付ける要因となっている。

ミオシンの機械的な機構は、キネシンの $\alpha 6$ ヘリックスよりも長大な Relay ヘリックスや、SH1 ヘリックスが Converter 領域の動きを制御し、Lever arm の駆動へと伝達される（図 1-6A）[33]。ATP 加水分解サイクルと、これらの機械的仕組みの連動する様子は図 1-6B に示した。図 1-6B 左上は、ヌクレオチド結合部位がからの状態（apo 状態）を示し、骨格筋ミオシン S1 はアクチンと比較的、弱い結合状態にある。ATP が結合すると、Switch I / II の僅かな変化が機械的に連動し、Converter 領域に伝わりとレバーアームが折れ曲がってアクチンからモータードメインが完全に解離する。ATP 加水分解が進行し、ADP・Pi 状態に遷移するとレバーアームは大きく振られ、さらにモータードメインとアクチンの間には強い相互作用が発生する。ATP 加水分解が終了し、リン酸が放出されて ADP 状態に移行するとレバーアームは apo 状態と同じ位置に戻り、モータードメインはアクチンと強く結合した状態となる。

キネシンの機械的な機構は、モータードメインとストーク領域をつなぐ neck リンカーへと伝達される（図 1-7A）[33]。ATP 加水分解サイクルと、これらの機械的仕組みの連動する様子は図 1-7B に示した。図 1-7B 左上の図は apo 状態を示し、微小管とモータードメイ

ンは比較的弱い力で結合している。ATP が結合すると、loop L11 の構造変化を介して Switch II 領域と $\alpha 6$ ヘリックスが相互作用を起こして安定化する。それと同時に微小管との結合部位を持つ $\alpha 4$ ヘリックスも安定化し、微小管とモータードメインは強く結合する。これらの連続した構造変化によって $\alpha 6$ ヘリックスの先にある neck リンカーは大きく振られる。ATPase 加水分解が進行し、ADP・Pi 状態を経てリン酸が放出されると、Switch II 領域を介した構造によって $\alpha 4$ ヘリックスの二次構造の安定性が崩壊し、モータードメインは ADP と強く結合した ADP 状態へと遷移する。また、微小管との相互作用は非常に弱い状態となるため、モータードメインは解離し、neck リンカーは apo 状態と同じ位置へ戻る。ADP 状態で、微小管とモータードメインの相互作用が発生すると、それに付随してモータードメインの中心に位置する β -シート構造 (図 1-5B) がねじれ、Switch I / II 領域が開いて ADP 放出が起きる。その結果、キネシン ADP 状態が解消されて再び ATP が結合できる apo 状態に移行する。

ミオシン、キネシンともに細胞骨格上を移動する際は、一部の特殊なサブファミリーを除いてホモ二量体を形成している。したがって、前述の機械的な構造変化はダイマー化した状態で繰り返し行われることで、細胞骨格上を動くことができる (図 1-8)。細胞骨格である微小管とアクチンは、細胞全体に広く存在しており、アクチンは細胞膜周辺、微小管は細胞内部にそれぞれ分布している。ミオシンとキネシンのモーター活性を生み出すための機械的な仕組みは、二次構造の呼称や結合する細胞骨格は異なるが、ほぼ同じである。前述のダイニンが回転する分子モーターを力学的エネルギー源とする由来する一方、ミオシンとキネシンのモーター活性はレバーアーム/Converter 領域または neck リンカーの ATP 加水分解サイクルに連動した動きに由来する。仕組みの大きく異なるダイニンとキネシンであるが、どちらも微小管をレールとする。ミオシンは一部のサブファミリーを除いてアクチン繊維をレールとする。ダイニンは主に、tail 領域を介した様々な物質の細胞内輸送を担っている。ミオシンは物質輸送の他に、細胞移動に関わるフィロポーディアの発生や、細胞分裂における収縮環の形成などの細胞機能にも広く関わっている。本研究では扱うキ

ネシンについては、次の項目で機能、生理的役割について詳細に記す。

1.2.2 キネシン

キネシンの基本的な構造については図 1 ですでに示したが、より詳細なものを図 1-9 に示した。ストーク領域は coiled-coiled 領域とも呼ばれ、ポピペプチド鎖がお互いに絡み合うことで安定した二量体を形成している。C 末端側ではさらに特徴的な配列が付与されたテイルドメインが形成されており、荷物となる物質の結合や、モーター活性の制御など他のタンパク質と積極的な相互作用を行う。モータードメインは Head 領域とも呼ばれ、ストーク領域との間には構造変化による運動エネルギーの発生に重要な neck リンカーが存在する。遺伝子及び系統解析によって、哺乳類だけでも、キネシンは 45 種類が同定されており、それらは 15 のサブファミリーに分類される（図 1-10A）[34]。系統学的分類とは別に、モータードメインがどの位置に存在するかで、3 つに分類される場合もある（図 1-10B）。N-kinesin は最も一般的なキネシンタイプで、N 末端側にモータードメインが存在する。C-kinesin は C 末端側、M-kinesin は coiled-coiled 領域の間に、それぞれモータードメインが存在する特殊なキネシンである。キネシンの多くは微小管のプラス端方向（N 末端）へ向かって進行するが、C-Kinesin と一部の N-kinesin はマイナス端方向（C 末端）に進行方向が逆転していることが報告されている。また、一部のキネシンでは C 末端側に特別な機能を持ったドメインを保持しており、キネシンの生理的役割の付与に影響している。キネシンの生理的役割について、サブファミリー毎にまとめたものが表 1-1 である [35]。Kinesin-1³ は主に細胞内の物質輸送に関連し、他の大部分のキネシンは細胞分裂に伴う染色体の移動や紡錘体の形成など、特異的な役割を担っている。スーパーファミリーで見えた場合、14/45 種類が Kinesin-1³ であることから、約 1/3 のキネシンは細胞内での物質輸送を、残りの 2/3 は細胞分裂に関連した物質輸送を担っている。

細胞分裂は、哺乳類細胞をはじめとした全ての細胞において、増殖や分化のために不可

欠な細胞機能である。キネシンの役割は細胞分裂においても、非常に多岐にわたることが、系統解析及び個々のスーパーファミリーの特徴づけで明らかとなった。図 1-1 1 は細胞分裂において活性化しているキネシンを現している[36]。細胞分裂は、細胞周期の M 期で行われ、前期・前中期・中期・後期・終期の 5 段階に分けられる。はじめに、キネシン-5 などが活動して紡錘体が形成され、ある程度進行するキネシン-7、13 といった染色体を微小管上に沿わせて移動するキネシン類が活動を開始する。紡錘体の形成に際して、キネシン-5 以外は基本的に 1 本の微小管と結合し、中心体の位置の調整を行うが、キネシン-5 は 2 本の微小管と結合し、紡錘体の形成とその長さの調製を担っている（第 1 章 1.3 で後述）。中期までに紡錘体は形成され、その後、Kinesin-13 などキネトコアと結合したキネシンのモーター活性によって紡錘体を形成する微小管の分解が起こり、それに沿うように染色体が細胞赤道面から中心体へと移動する。終期になると、ほとんどのキネシンは不活性化して、微小管は静的な状態へと移行する（細胞分裂時は、前述したようにアクチン繊維が細胞赤道面に集中し、アクチン—ミオシン環が収縮することで細胞質の物理的な分離が起きる）。

1.3 キネシン Eg5 の特徴と生理的機能

1.3.1 キネシン Eg5

細胞分裂において、キネシンが重要な役割を果たすことを 1.2.2 の最後に述べた。染色体の輸送、中心体の細胞内での座標調節などに関わるキネシンや、細胞分裂で発現が確認されているダイニンやミオシンを含めた場合、モータータンパク質による細胞分裂の制御機構は非常に煩雑かつ高度に制御されているといえる。多種多様な細胞分裂に関わるモータータンパク質の中でも、非常にユニークな特徴を持つキネシンとして、Kinesin-5 ファミリーに属する Kinesin Eg5 (KIF11) が注目されている。Kinesin Eg5 はホモ二量体が 2 つ、モータードメインをお互いに反対方向に向くように結合してホモ四量体を形成する (図 1-12)。Eg5 ホモ四量体は 2 本の微小管を、お互いにマイナス端方向を逆向きになるように、架橋することが実験的に証明されている (図 1-13) [37]。実際、紡錘体形成時の Eg5 の分布を示したのが図 1-14A である [38]。Eg5 は微小管の紡錘体の形成と安定化に非常に重要である (図 1-14B) [37]。Eg5 四量体で架橋された 2 本の微小管は、Eg5 のモーター活性によって、お互いに離れていくように動かされる。その結果、細胞内の微小管が整理されて紡錘体が現れる。Eg5 活性に異常が起きると、多くの場合、正常な紡錘体が形成されないため細胞死が起きる [39-41]。これは Eg5 の発現が細胞周期と密接に関わっていることが要因である。細胞周期チェックポイントが紡錘体の異常を感知することで、アポトーシスの誘導が起きるためである。

Eg5 はキネシンファミリーの中でも、生化学的に多くの特徴を持つことが知られている。Kinesin-1 と Kinesin-5 (Eg5) の結晶構造を比較した場合、ヌクレオチド結合部位である P-loop などで構成されたスイッチ 1 領域を含め、多くのドメインで目立った違いは見られないが、Loop L5 の大きさが異なることがあきらかである (図 1-15) [42]。また、L5 は Eg5 の機械的な構造変化及び生化学的な特徴について、重要であることも明らかである。ADP 放出に際して、SW1/2 及び P-loop が開くことが重要であることを前述したが、Eg5 の長い loop L5 は Eg5 の ATPase 活性が他のキネシンと異なる一因となっていると考えられている。表

1-2 に示したように、微小管存在下において、1 秒間あたりに 1 分子の Eg5 が加水分解する ATP の量を示す ATPase 活性が 6.25 s/site と、Kinesin-1 の 60 s/site に比べて圧倒的に遅く、またモーター活性も 20.5 nm/s と kinesin-1 の 1/4 以下である[43]。一方で、ADP の放出速度と微小管非存在下における ATPase 活性は、比較的早い。また、多くのキネシンは二量体を形成することでモーター活性が飛躍的に向上するのに対して、Eg5 では 1.5 倍程度しか上昇されない。このような Eg5 の生化学的な特徴は、一分子解析でも見られ、光ピンセットによるモーターの力を測定すると、従来型キネシンよりも高いが、一分子の動きを追うと直進性が非常に悪い” non-processive” 型キネシンであることが明らかになっている[44]。Eg5 の loop L5 の機能については、全体の機械的な仕組みに与える役割に不明瞭な点が多いが、loop L5 を欠損させることで ADP 放出速度が増加することなどが報告されている[45]。Kinesin-1 などでは、loop L5 の構造はあまりに短すぎるため、 α 2 ヘリックスの構造変化にともなって消失することもあるが、Eg5 の場合は ADP 放出に際して何らかの影響を与えていると推測されている。

1.3.2 抗ガン剤の標的分子としてのキネシン Eg5 とその阻害剤

Eg5 は細胞分裂期の紡錘体形成に特異的に機能するタンパク質である。したがって、従来の微小管の脱重合などを利用した抗ガン剤よりも副作用が低減できることが期待されている。ガン細胞は細胞周期の調節機構が崩壊し、無尽蔵に細胞分裂を繰り返すため、Eg5 が絶えず活性化している。一方で、免疫システムに関わる細胞などを除いて、生体内の通常細胞のほとんどが細胞周期は静止期 (G_0 期) にあるため、Eg5 の活性/不活性の影響は受けない。ガン細胞とキネシンの関係性についても、いくつか報告されている(表 1-3) [46]。Eg5 の場合、骨髄性白血球[47]や、大腸ガン[48]などで特に過剰発現していることが明らかとなっている。

Eg5 の阻害剤に関する研究は、1999 年に Mayer らが発見した天然物由来の Monastrol が

最初である[49]。Eg5 モータードメインの結晶構造解析が確立されていたため[50]、monastrolをはじめとして各種阻害剤の結晶構造解析[51]、またはMDシミュレーションによって結合方式についても様々な報告がされている。図1-16はEg5・ADPの結晶構造解析の結果を示す。 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスと挟まれるように、ADPが確認され、この周辺にSw1/2及びP-loopから構成されたヌクレオチド結合部位が存在する。また、ヌクレオチド結合部位の裏側には $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスとNeckリンカーが存在する。また、loop L5は外側にやや開いた構造をとっている。興味深いことに、Eg5は2つの阻害剤結合部位を持ち、アロステリック変化を起こすことが明らかとなっている。図1-16の赤線で囲んだ、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスとloop L5から構成された結合部位と、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスで構成された結合部位がポケットのように存在している。どちらも、前者はヌクレオチド結合部位の近傍に位置し、後者はNeckリンカーと微小管結合ドメインに近接している。

図1-17は天然由来のMonastrolから派生したdihydro-pyrimidine-thione系のEg5阻害剤である。後述のSTLCなどと比較して、*in vitro*における半数阻害濃度は比較的高めである。図1-18はSkoufiasらが報告した人工物由来のEg5阻害剤であるSTLC[52]から派生したトリチルシステイン系阻害剤である。Monastrolと比較して、半数阻害濃度が飛躍的に向上していることが認められる。MonastrolとSTLCはEg5阻害剤として、結晶構造解析や速度論的解析がよく進んでおり、Eg5阻害剤開発における様々な情報の礎となっている。図18にMonastrol、STLCの結晶構造解析結果を示した。MonastrolとSTLCは、化学構造的な類似性は低いにも関わらず、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスとL5で構成された阻害剤結合部位を共有していた。Monastrolの場合、ベンゼン環を含む環状部位がEg5の奥に疎水性結合で強固に結合している(図1-19A)。また、窒素や酸素が周辺のアミノ酸と相互作用を起こしている。一方のSTLCも、トリチル基がEg5の内側に入り込み、疎水性結合を介して強固な結合を保持している(図1-19B)。一方で、外向きに配位されたアミノ基とカルボキシル基は、Monastrolと異なるアミノ酸残基と相互作用を起こしている。この阻害機構の大きな特徴として、さらにLoop L5がEg5側に折りたたまれ、阻害剤結合部位に覆いかぶさるような構造変化が生じている。この形状は、結晶構造に限らず、蛍光標識ATPアナロ

グと loop L5 上に位置するトリプトファンの FRET 解析でも明らかとなっている[53]。これらの阻害剤の結合による Eg5 への構造的影響は、アロステリックに発生し、阻害剤の種類に関わらず、基本的に loop L5 を強く折りたたんだ構造へ誘導し、それと連動して $\alpha 4$, $\alpha 6$ ヘリックスの構造変化が起きることでヌクレオチド結合部位が閉鎖した状態で安定化する。その結果、Eg5 は ADP を放出できなくなり、ATPase 活性とモーター活性を失ってしまうと推測されている。

Eg5 の STLC/Monastrol 結合部位に対する阻害剤の構造は、自由度が高く、図 1-20 に示した Thiophene 構造を含有する阻害剤も報告されている。Eg5 阻害剤の抗がん剤への応用は、いくつかの化合物で NIH の薬物試験段階にある。図 1-21、図 1-22 はその一部を列挙したものである。図 1-21 は Lad らが報告した ispinesib に由来する Eg5 阻害剤であり、認可に向けての各種試験をクリアしている[54]。図 1-22 は製薬会社で公表、発売されている Eg5 阻害剤で、ARRY-S20 の構造を基礎として、各種阻害剤が現在も開発中である。図 1-21, 1-22 で示した一連の阻害剤は、STLC などの比較的初期に報告された化合物との構造的類似性はほとんど見受けられない。しかしながら、STLC と同じ結合部位を共有していることが確認、または示唆されている。図 1-23 は ispinesib と Eg5 複合体の結晶構造解析の結果を示す[55]。Ispinesib は STLC と同じ結合部位に存在しており、アロステリック変化についても、loop L5 と $\alpha 4$, $\alpha 6$ ヘリックスが大きく構造変化している。阻害剤の結合に関しても、イソプロピル基、六員環構造 2 つが奥深くに配位し、疎水性結合を介して安定的な結合を保持している。また、窒素や酸素、アミノプロピル基が周辺アミノ酸残基と相互作用を起こすことも同様である。

Eg5 阻害剤の多くは STLC と同じ結合部位/阻害機構を共有しているが、Ulaganathan らが 2013 年に報告した Eg5 阻害剤 SB743921 (図 1-22) は別の結合部位にも配位することを示唆した[56]。図 1-24 に示したビフェニル構造由来の GSK シリーズや PVAB1194、ベンゾイミダゾール構造由来の BI8 は、Eg5 阻害剤であるが、その結合部位は STLC とは異なる。図 1-25 はビフェニル系阻害剤の PVAB1194 と Eg5 複合体の結晶構造解析の結果である。この

阻害剤は Sw1/2 と連動する $\alpha 4 / \alpha 6$ ヘリックスの間に結合し、neck リンカーや微小管結合部位に関わる構造変化が発生する。また、STLC などの Eg 阻害剤は ATP 非競合型であるのに対して、この阻害機構は ATP 競合型であることも判明している [57]。ベンゾイミダゾール型の BI8 も同様である (図 1-26)。BI8 の結合方式は、STLC などと同様であるが、これらの化合物の結合部位選択制については不明瞭な点が多い。結合部位の選択制が、化合物のどのような構図に基づいているかは、今後さらに解析していく必要がある。

1.4 光応答性分子

1.4.1 フォトクロミック化合物

フォトクロミック化合物は特定の波長の光を照射することで、構造と性質が可逆的に変化する化合物の総称である。照射する波長は、ほとんどの場合は近紫外～可視光領域で十分である。また、照射する光エネルギーもレーザーよりも低出力であり、ほとんどの場合は室内灯などと同程度の 30W 程度で十分である。図 1-27 に代表的なフォトクロミック化合物を示した[58]。アゾベンゼンやスピロピランは機能性色素として液晶画面への工業分野での応用が進んでおり、生命科学の分野でも、光スイッチング機構としての導入が期待されている。アゾベンゼン、スチルベンゼン、hemithioindigos は立体配座が光可逆的に変化するタイプである。近紫外光を照射することで、炭素または窒素間の π - π 結合が回転することで、trans-cis 異性体の変化が生じる。スピロピラン、ジアリールエテン、フルギミドは分子構造の一部で共有結合の切断が起きる。これらの化合物は複雑な環状構造の間で、近紫外光によって電子の移動が誘導されることで、可逆的に光異性化する。環状構造の一部が崩壊するため、吸光スペクトルの変化など機能性色素として応用しやすい。フォトクロミック化合物の光異性化は、構造変化に起因して極性も変化する。極性の変化はフォトクロミック化合物の、どの部位が異性化するかによって、大きく異なる。

本研究で扱うアゾベンゼンとスピロピランは、生体分子への応用が比較的進んでいる。アゾベンゼン (図 1-27 A) は紫外光照射で cis-体、可視光照射で trans-体に光異性化する。Trans 体では 320nm 付近に窒素間の π - π 結合に起因する吸光スペクトルを持ち、cis-体ではこのピークが減少する。また、極性の変化は比較的大きく、trans-体は親水性が強く、cis-体では疎水性へと変化する[59]。また、cis-体の安定性は遮光状態でも熱による影響を受けやすいことも知られており、熱を加えた状態では trans-体へ異性化する。

スピロピラン (図 1-27 C) は紫外光照射で開環構造のメロシアニン型、可視光照射で閉環構造のスピロピラン型に光異性化する。スピロピランはメロシアニン型に光異性化すると、530nm 付近に特有の吸光スペクトルが発生する。また、メロシアニン型は 400nm 付近の励起光によって、650nm 付近にピークを持つ蛍光を発する、1 種の蛍光物質としてもふる

まうことが分かっている[60]。スピロピランはフォトクロミック化合物の中では、最も極性が変化する。これは、閉環構造のスピロピラン型ではインドリンとベンゾピランの2つの平面構造に起因した強い疎水性を持つ一方で、開環状態のメロシアニン型になるとベンゾピランが解裂することで電荷分離が発生し、双性イオンを獲得するためである。メロシアニン型は非常に親水性が高くなり、また溶媒条件によっては、双性イオン同士が相互作用することで会合状態となることも報告されている。スピロピランもアゾベンゼン同様、熱による異性化を受けるが、遮光状態で熱を与えると、紫外光照射で生じるメロシアニン型へと変化する。アゾベンゼンの熱による変化が cis-体の安定性に起因するのに対して、スピロピランの場合は熱によって積極的に不安定な構造へと異性化している。これは逆フォトクロミズムとも呼ばれ、紫外光照射を介さずに熱エネルギーでも可逆的な異性化が可能な特殊な事例である。しかしながら、スピロピランの特徴は溶媒や官能基の影響を非常に受けやすく、全ての特徴を維持または制御するのは困難である。

1.4.2 ナノスイッチとしてのフォトクロミック分子の応用

フォトクロミック分子は生体分子の活性制御を目的としたナノスイッチとして、遺伝子発現や転写、酵素活性の制御、受容体チャンネル、イオンポンプなどに応用されている[58]。フォトクロミック分子を用いたナノスイッチは“光スイッチ機構”として呼称される。タンパク質の二次構造として活性部位などに重要なヘリックス構造は、Woolley らの研究グループによって光制御が可能ながことが報告された[61]。アゾベンゼンの立体配座を利用することで、図 1-28 に示したように、アゾベンゼンが分子内架橋されたポリペプチドのヘリックス構造を物理的に破壊する。実際に、チオール基反応性の官能基を2つ導入したアゾベンゼンを化学修飾したフォトクロミックペプチドを用いて、特定のタンパク質の活性部位に対する競合阻害剤としての応用が期待されている。スピロピランの場合、光異性化による極性変化を積極的に利用したアプローチが報告されている。図 1-29A もポリペプチドのヘリックス構造の光制御に関する概要であるが、アゾベンゼンと異なり、スピロピラン

の極性変化によって制御を行う[62]。メロシアニン型はチロシンやアルギニン酸のような極性アミノ酸としてふるまうが、スピロ型ではフェニルアラニンやトリプトファンのような疎水性アミノ酸としてふるまう。その結果、スピロピランが導入されたペプチド周辺の極性の可逆的变化によってヘリックス構造が生じるか否か光制御される。また、スピロピランの極性変化を光応答性ミセル構造に応用する事例もある[63]。図 1-29 B に示したように親水性のポリエチレングリコール（PEG）とスピロピランを連結した化合物は、可視光照射下ではスピロ型の疎水性によってミセル構造が形成されるが、紫外光照射でメロシアニン型に変化するとバラバラになる。スピロピランと連結するポリマーが疎水性でも、同様にミセル構造の光制御は可能である。

光スイッチ機構の多くは、フォトクロミック分子を生体分子に化学修飾することでスイッチング機構を導入する。その一方で、遺伝子学及び神経系の分野で発達した Optogenetics に由来する光応答性タンパク質の利用も考えられている[64]。すでに、チャネルロドプシン(ChR) などの光応答性タンパク質を神経系のイオンチャネルなどに導入することで、イオン流入による神経伝達を光制御することに成功している（図 1-30）[65]。Optogenetics に関する光応答性タンパク質は、イオンチャネル以外にも応用が可能であることが、LOV や Dronpa などで示唆されている（図 1-31）。これらの光応答性タンパク質は、構造変化に起因した多量体形成が光照射によって可逆的に制御できる。これらの構造に別の活性部位などを分子生物学的手法で組み込むことは十分可能であり、イオンチャネルの開閉以外にも (a) タンパク質の結合、(b) RNA または DNA 発現、(c) 多量体の形成 (d) 四次構造に由来するタンパク質の活性、(e) 単量体の構造と活性などの光制御機構に利用できる[64]。生体分子への応用が最も期待される光応答性タンパク質の Dronpa と LOV ドメインの結晶構造を図 1-32 と図 1-33 に示した。Dronpa は GFP に類似した蛍光タンパク質であるが、光照射による蛍光団の構造変化によって多量体形成と蛍光の有無が光制御される[66]。LOV ドメインは植物由来の青色光に応答するタンパク質構造であり、光照射によって結合状態と解離状態を制御することができる（図 1-33）[67]。Dronpa による多量体の光制御、LOV によ

る結合の光制御を様々な生体分子に付与できれば、機能性光応答タンパク質として細胞への導入や、大腸菌や昆虫細胞系を用いて大量生産が可能である。

1.5 第1章総括

生体分子の中には、モータータンパク質のように機械的な仕組みを持つものが存在する。これらのタンパク質は、分子モーターあるいは連続した機械的構造変化によって、運動することが可能である。ATP 加水分解にともなう化学的エネルギーを、非常に効率よく運動エネルギーに変換する精密機械であり、細胞の様々な機能に重要である。特に、本研究で扱うキネシン Eg5 は、キネシンの中でも稀有な特徴を持ち、細胞分裂という生命に必要な不可欠な機能に大きく関わっている。こうした生体分子の機械的な仕組みは、ナノデバイスとして注目され、Optogenetics やフォトクロミック分子を利用した様々なアイデアが実現している。生体分子機械への光スイッチング機構の導入によって、人工的な制御が可能なナノマシンとして、将来的に医療やナノエンジニアリングへの応用が期待される。

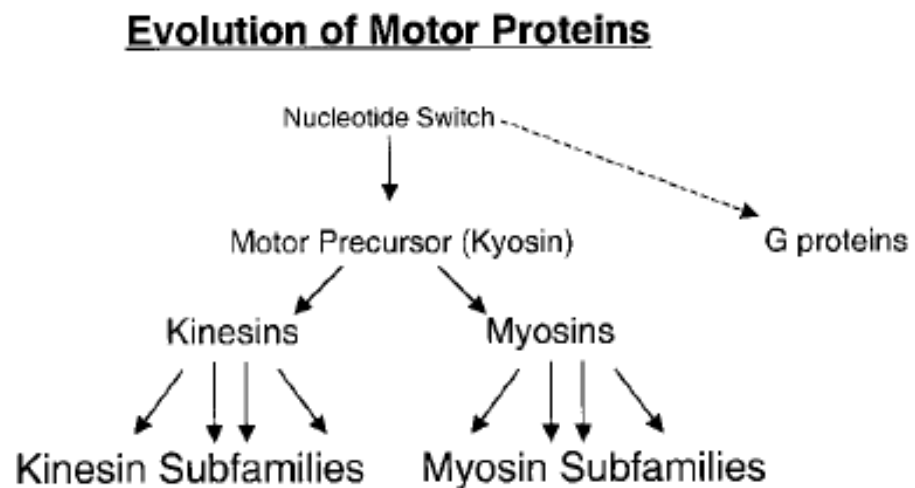


図 1-1 Nucleotide Switch から進化したミオシンとキネシンモータータンパク質.

キネシン, ミオシン, Gタンパク質はNucleotide Swtichを持つ共通のタンパク質から進化発展した。これらのタンパク質のヌクレオチド結合部位の三次構造は高度に保存されている。ミオシン、キネシンはKyosinを祖先として、さらに独自の構造進化が起きている (Vale RD, Milligan RA. 2000 [2]から引用).

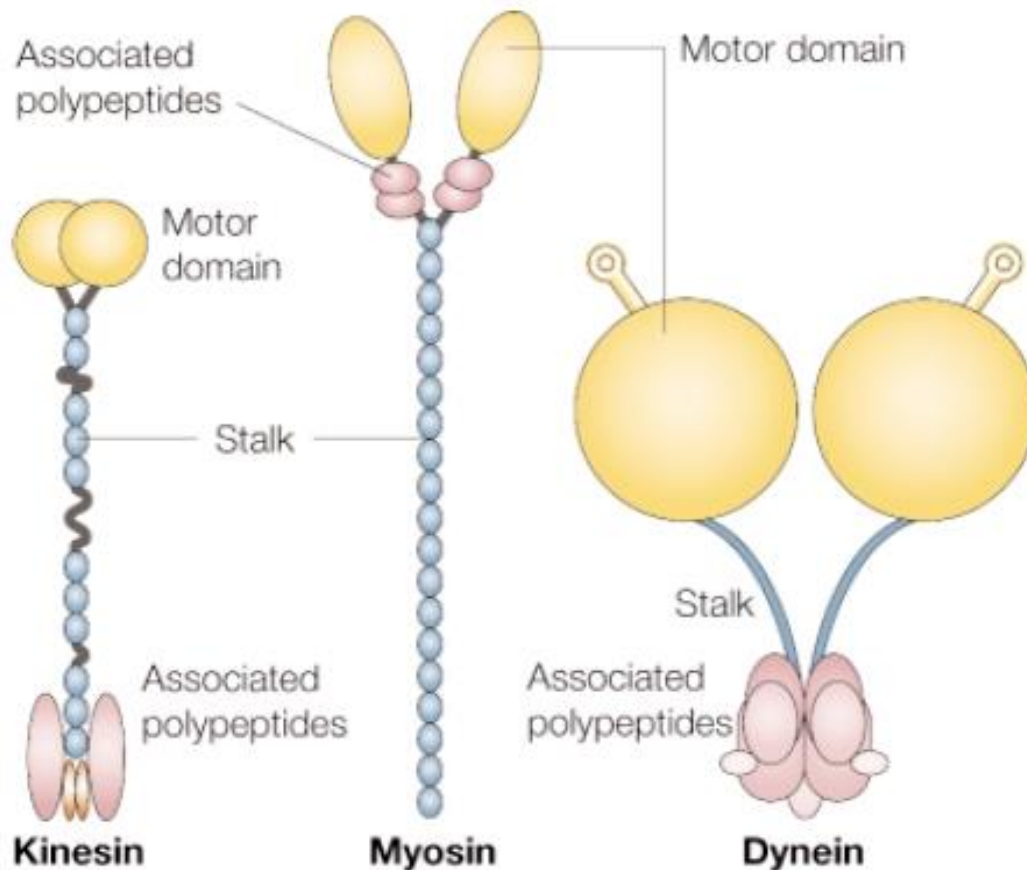


図 1-2 細胞骨格を移動するモータータンパク質のドメイン。

キネシンとダイニンは微小管をレールとするモータータンパク質である。ミオシンはアクチン繊維をレールとするモータータンパク質である。全てのモータータンパク質はモータードメイン、ストークドメイン、テイルドメイン（Associated polypeptides）の3つから構成される。ミオシンとキネシンはストークドメインの coiled-coiled 領域によって二量体化する。ダイニンはテイルドメインによって二量体が形成される（Woehlke G. 2000 [1]から引用）。

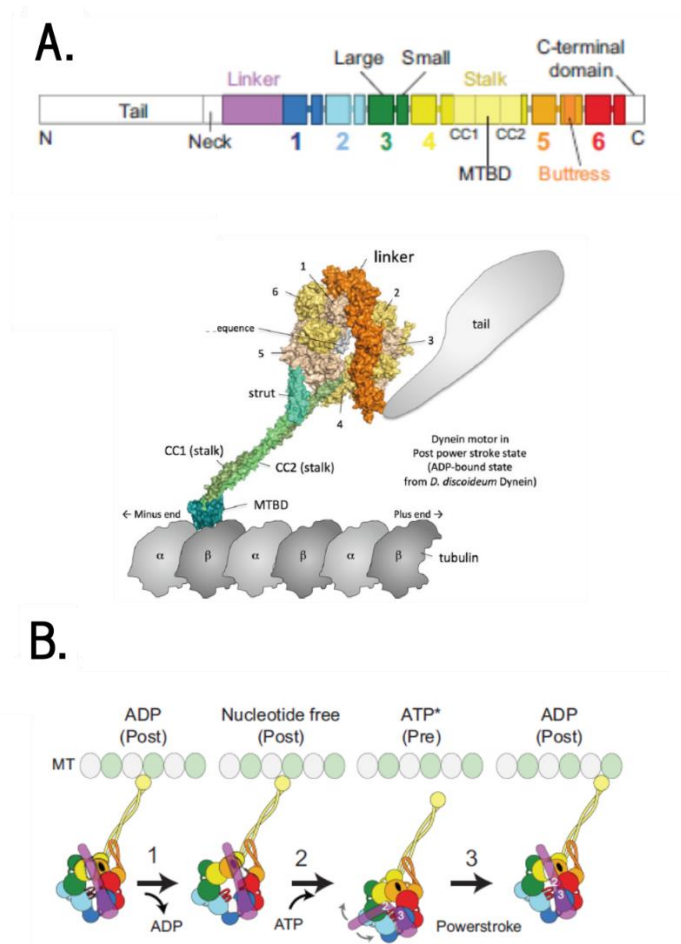


図 1-3 モータータンパク質ダイニンの構造と運動。

(A) ダイニンは1～6のそれぞれ構造の異なるAAA+タンパク質で構成された分子モーターを利用している。テイルドメインとAAA+分子モーターはリンカーによって連結している。ストークドメインの先端には微小管結合部位(Microtubule binding domein; MTBD)が存在する。(B) ダイニンはADP状態とヌクレオチド結合部位が空の状態(apo 状態)で微小管と結合している。ADP放出(1)が起きるとモータードメインの構造が変化し、ATPを受け取るとリンカーが大きく動いて微小管から離れる(2)。ATP加水分解が終了するまでに、分子モーターの回転によってMTBDは微小管のマイナス端方向へ移動する(3)。二量体ダイニンで1～4が連続的に起きることにより、微小管上を移動する。(Bの図は Andrew P. Carter. 2013 [29]から引用。A, Cの図は Kato Y, 2017 [4]から引用)

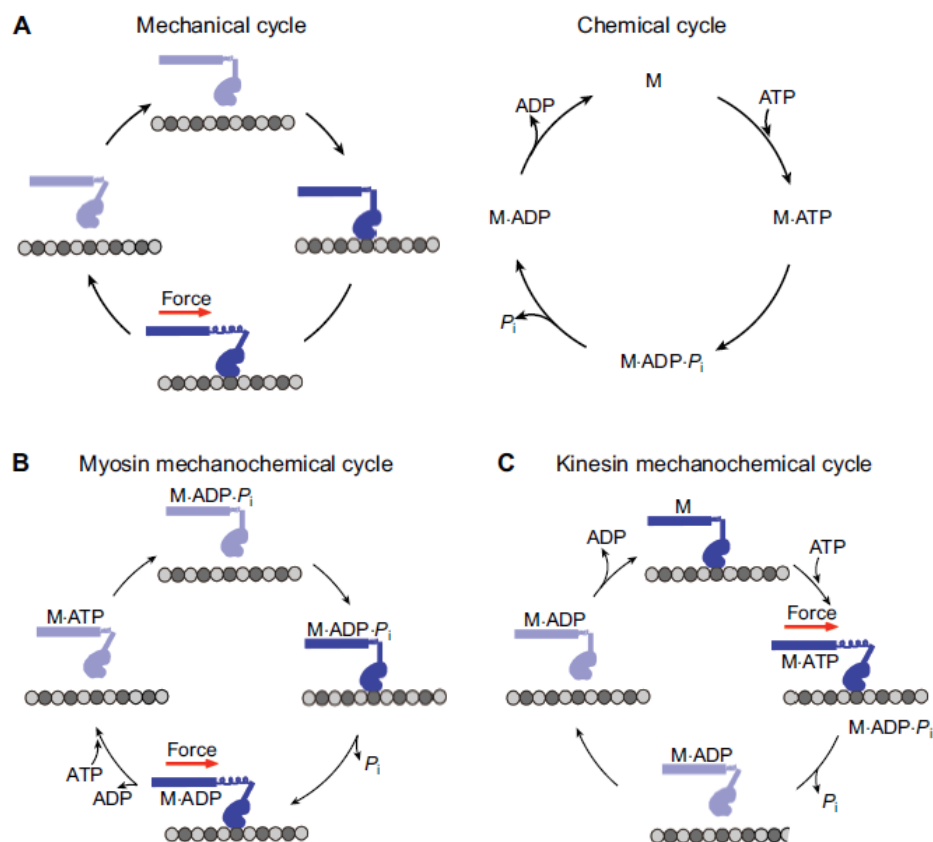


図 1-4 キネシン・ミオシンのATP加水分解サイクルにともなう機械的構造変化.

(A) ミオシン、キネシンともにレールへの結合と解離はヌクレオチド結合部位に何が結合しているかで制御される。ATPはADPに加水分解されるまでの間に、いくつかの中間状態を形成している。(B) ATP加水分解サイクルとミオシンの運動メカニズム。ミオシンはATP状態ではアクチンから解離した状態にあり、ADP・Pi状態でモータードメインの構造変化によりアクチンへ結合する。リン酸が放出されてADP状態になるときにモータードメインに運動エネルギーが発生し、ミオシンはアクチン上を動く。(C) ATP加水分解サイクルとキネシンの運動メカニズム。キネシンはADP状態では微小管から解離した状態にある。ADPが放出されてapo状態になると微小管に結合する。ATPが結合してADP・Pi状態に移移する間に、モータードメインは構造変化による運動エネルギーを獲得して動くことができる。ADP状態に移行すると、キネシンは微小管から解離する (Ku11 FJ. 2013 [21]から引用)。

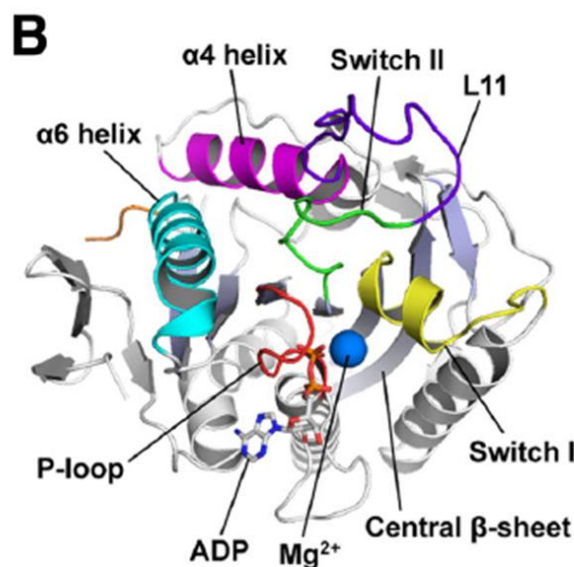
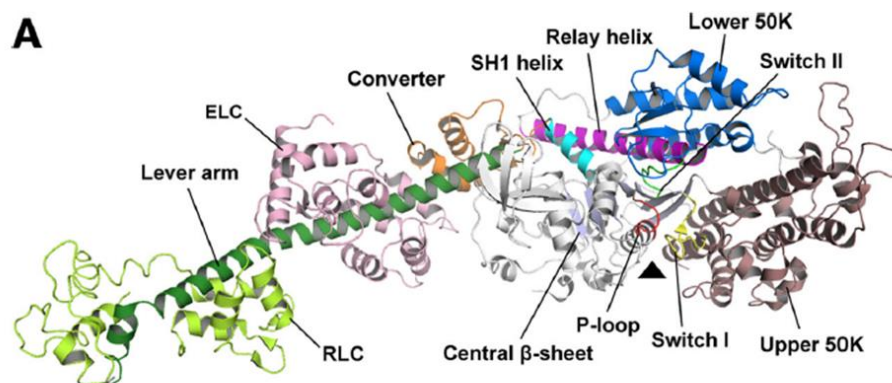


図 1-5 骨格筋ミオシン S 1 と Kinesin-1 の結晶構造.

キネシン、ミオシンともに P-loop, Switch1, Switch2 領域から構成されたヌクレオチド結合部位は高度に保存され、運動に関わる二次構造も共通している。(A) 骨格筋ミオシン S 1 は Relay ヘリックス (紫) と SH1 ヘリックス (水色) の構造変化によって、モーター活性を生み出す Converter (オレンジ) とレバーアーム (緑) を制御している。(B) キネシンは $\alpha 4$ (紫)、 $\alpha 6$ ヘリックス (水色) の構造変化によって、 $\alpha 6$ ヘリックスの C 末に位置する Neck リンカー (オレンジ色) を制御している。Neck リンカーはキネシンの運動エネルギーを実際に伝える重要な部位である (Kato Y, 2017 [1]から引用)。

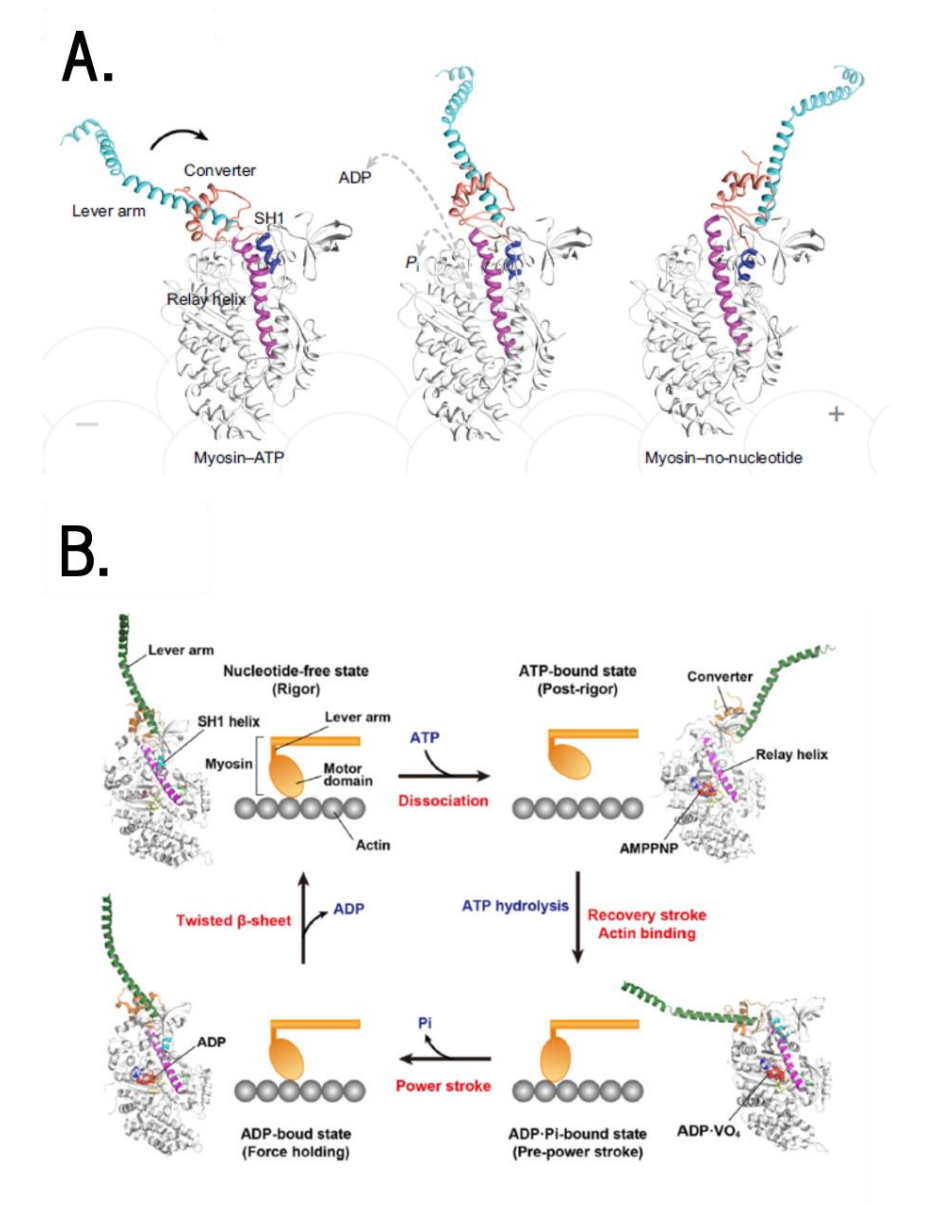


図 1-6 ミオシンの構造変化による運動エネルギーの発生メカニズム。

(A) ATP加水分解サイクルごとのレバーアームの動きを模式化した図。ATP結合状態とそれ以外で、レバーアームとその周辺の構造が大きく変化している。(B) レバーアームとその周辺の構造変化について、ATP加水分解サイクルごとに詳細にした (Ku11 FJ, 2013 [21]から引用)。

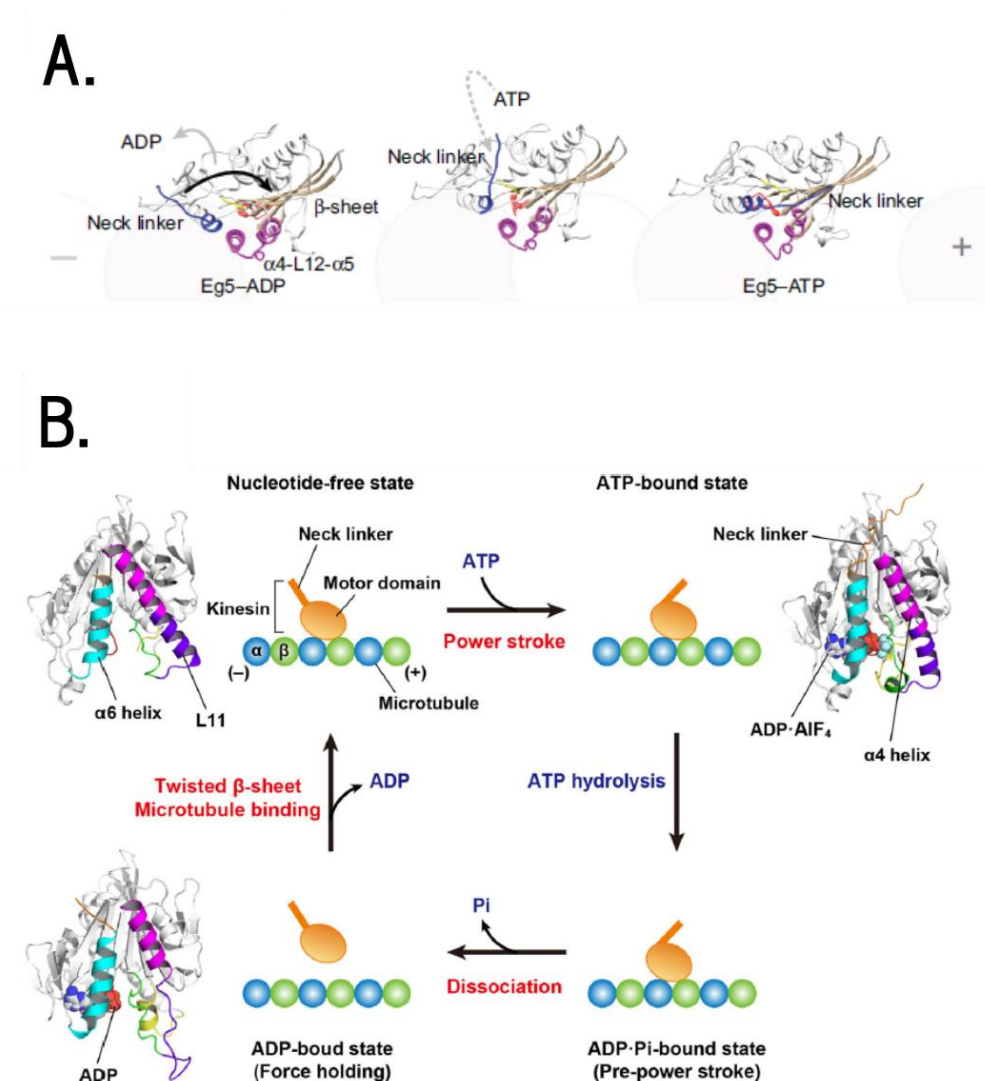


図 1-7 キネシンの構造変化による運動エネルギーの発生メカニズム。

(A) ATP加水分解サイクルごとの Neck リンカーの動きを模式化した図。ATP 結合状態とそれ以外で、Neck リンカーとその周辺の構造が大きく変化している。(B) Neck リンカーとその周辺の構造変化について、ATP加水分解サイクルごとに詳細にした (Ku11 FJ, 2013 [21]から引用)。

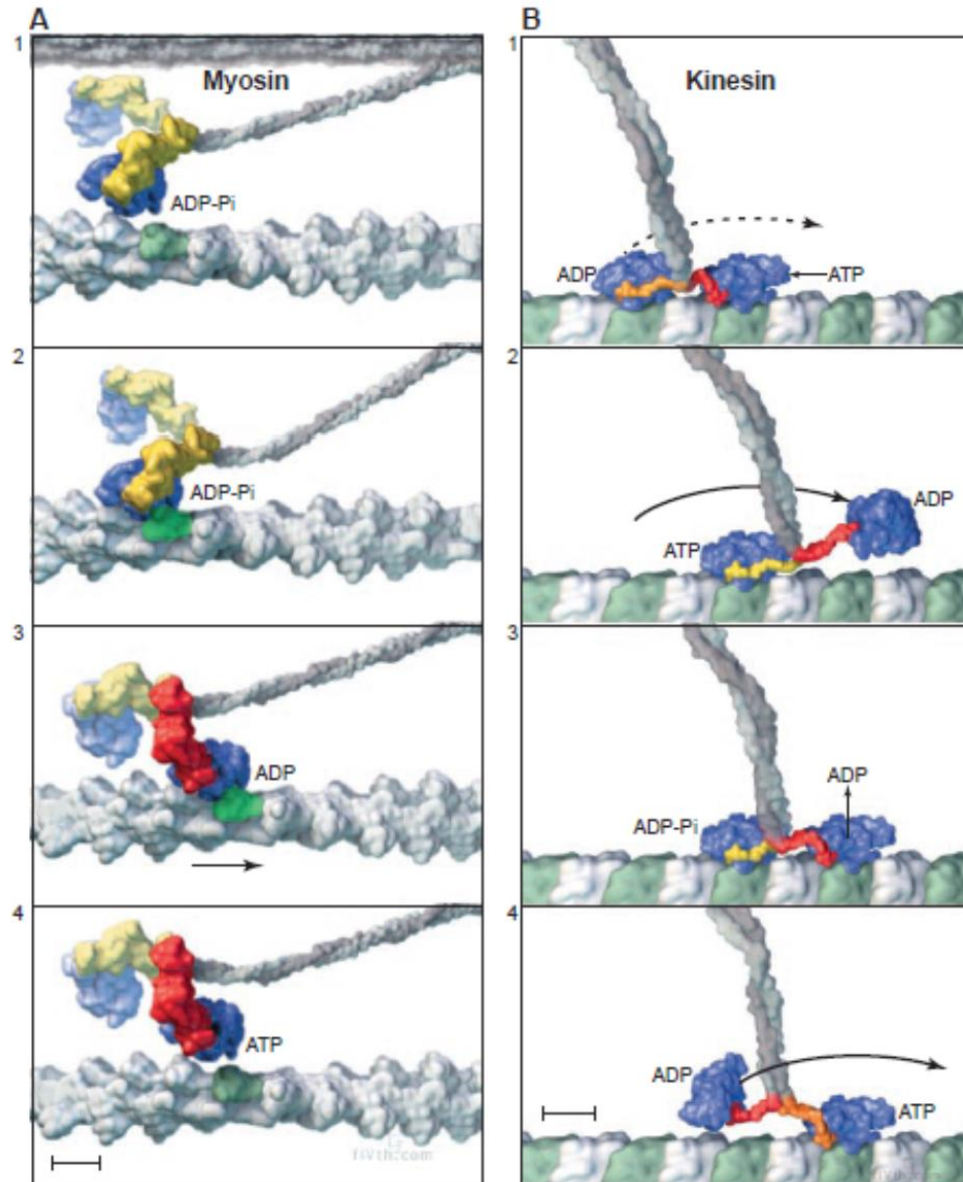


図 1-8 ミオシンとキネシン二量体の運動。

(A) ミオシンがアクチン繊維を引っ張る様子をイラスト化した。青はモータードメイン、黄色と赤色はATP加水分解サイクルごとのレバーアームの状態を示す。(B) キネシンが微小管上を移動する様子をイラスト化した。青はモータードメイン、赤、黄、橙色はそれぞれATP加水分解サイクルに応じた Neck リンカーの状態を示す(Vale RD. 2000 [2] から引用)。

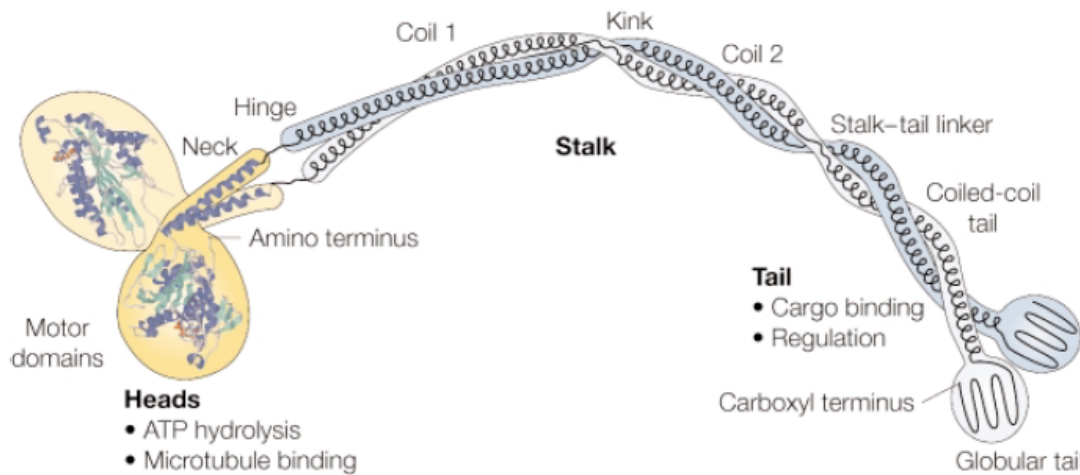


図 1-9 キネシンの各領域の詳細な名称。

モータードメイン (Head) 以外のドメインについて、それぞれ名称と機能が割り振られている。ストークドメインにの Coil1、Coil 2 は二量体形成のための Coiled-Coiled 結合を行う。Stalk-tail Linker から先はヘリックス状であることは変わらないが、キネシンの種類によって貨物の結合領域や、制御領域を持つ (Woehlke G. 2000 [1]から引用)

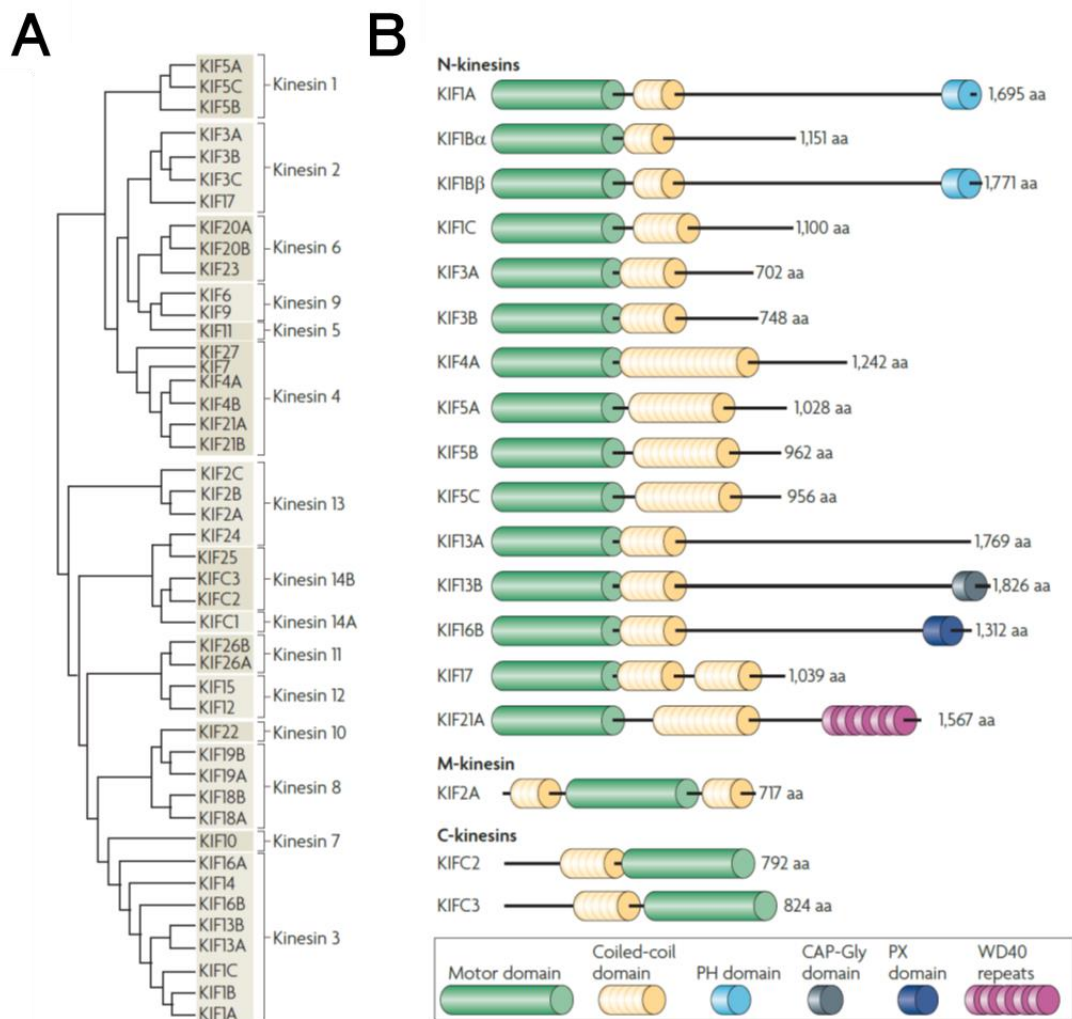


図 1-10 キネシンの系統学的または特徴ごとの分類。

(A) キネシンの系統学的分類。(B) モータードメインの位置によるキネシンの分類。

N-キネシンはN末側、M-キネシンは配列中央、C-キネシンはC末側とそれぞれモータードメインの位置が異なる(Hirokawa N. 2009 [34]から引用)。

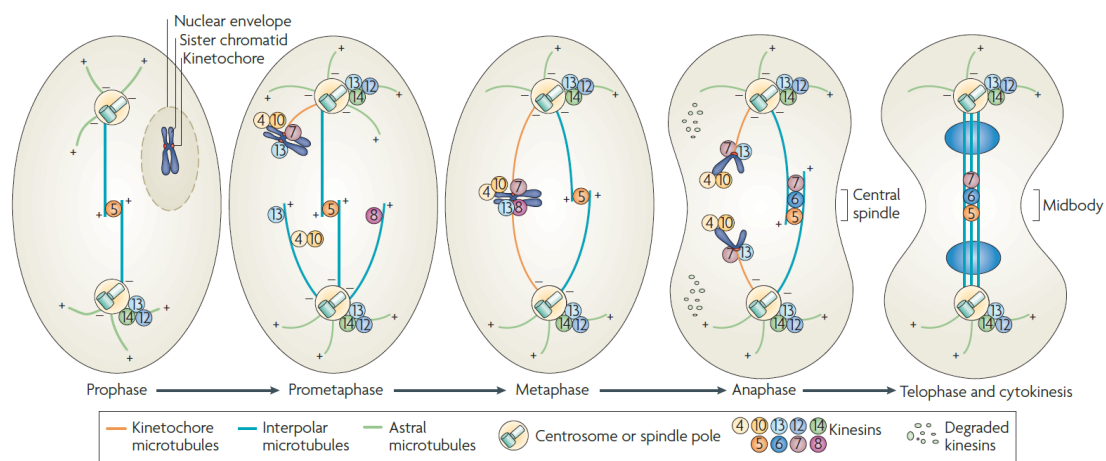
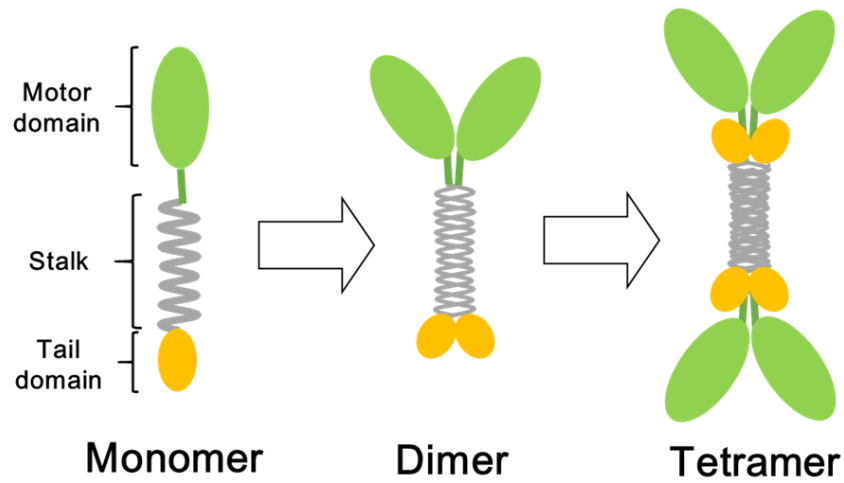


図 1-11 細胞分裂時におけるキネシンの活性化。

細胞周期M期は前期・前中期・中期・後期・終期の5段階に分かれ、各段階で多種多様なキネシンが活性化することで姉妹染色体の分離が行われる。M期におけるキネシンは、主に紡錘体形成と安定化を行うグループと、染色体の移動を担うグループに大別される。キネシン5、12、13、14はそれぞれ前期～中期にかけて紡錘体の形成を担う。キネシン4、7、10、13は染色体に局在し、微小管への結合をサポートする。中期にはキネシン8も染色体に作用し、染色体の紡錘体への結合と安定化を行う。後期から終期にかけては、キネシン6、7、13によって染色体の分離やキネトコアや他のキネシンの細胞内での整理が行われる (Verhey KJ. 2009 [35]から引用)。

A



B

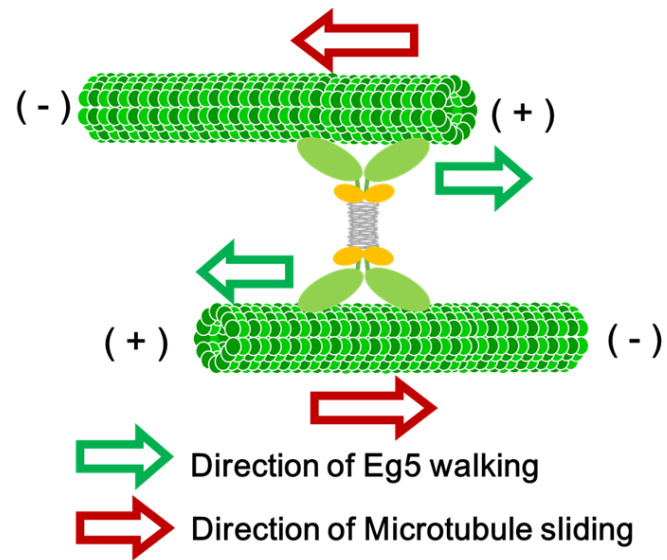


図 1-12 キネシン E g 5 の四量体形成と微小管の架橋。

(A) キネシン E g 5 は二量体同士が逆方向に 2 つ会合することで四量体を形成する。(B) 2 本のマイナス端が逆平行状態にある微小管は、四量体 Eg5 によって架橋される。

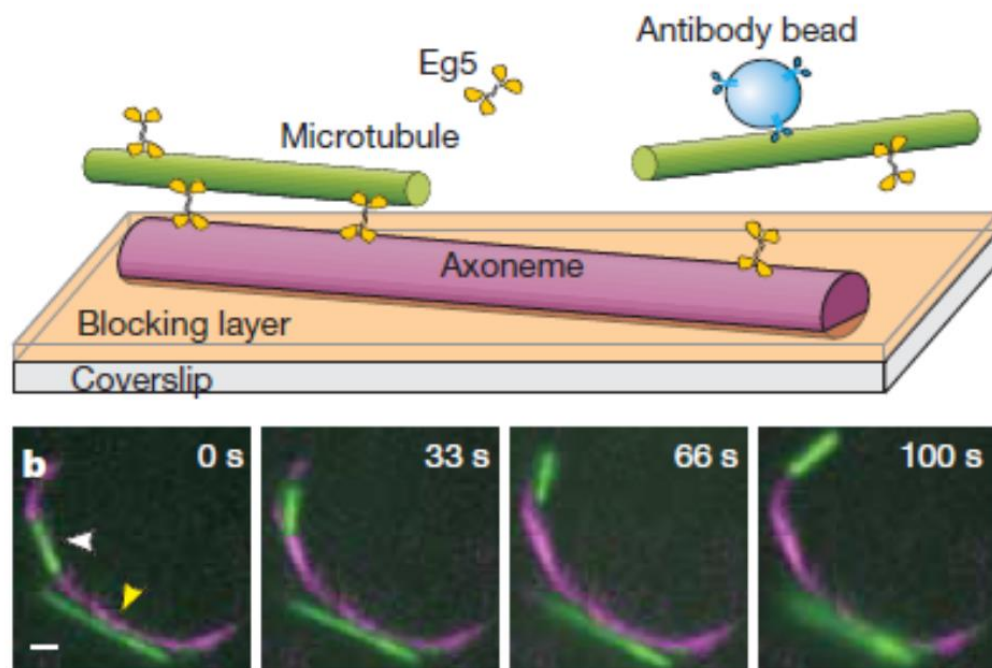


図 1-13 キネシン Eg5 四量体による微小管滑り運動アッセイ。

片方の微小管（紫）をフローセルに固定し、Eg5 四量体を介して架橋された微小管（緑）がそれぞれ運動している様子を実験的に証明した（Kapitein LC. 2005 [37]から引用）。

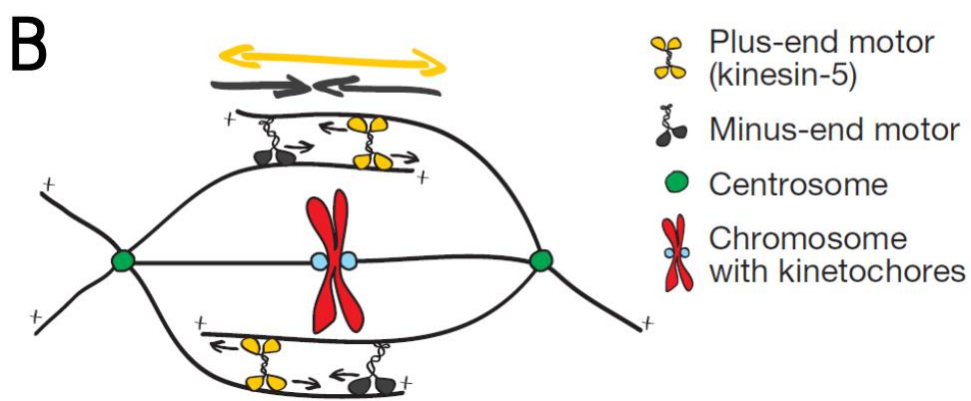
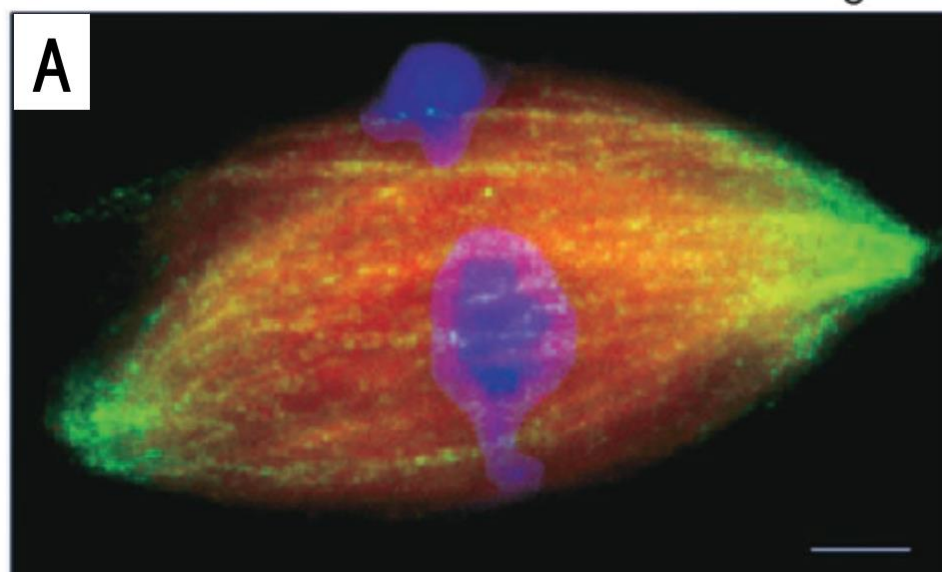


図 1-14 細胞分裂前中期における紡錘体の形成。

(A) 紡錘体の様子を蛍光顕微鏡で観察した写真。青は細胞核、赤は微小管、緑は Eg5 をそれぞれ示す。赤の微小管が紡錘体を形成しており、それに沿って Eg5 が局在している。

(Kapoor TM. 2001 [38]から引用)。(B) 細胞内におけるキネシン Eg5 の紡錘体形成メカニズム (Kapitein LC. 2005 [37]から引用)。

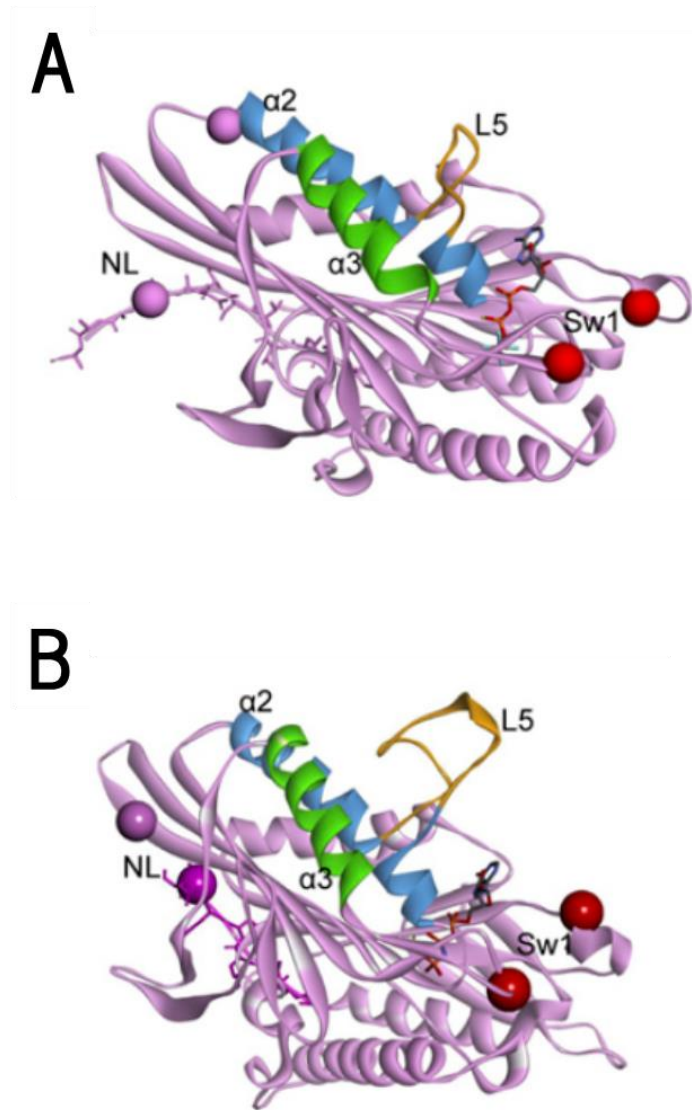


図 1-15 Kinesin-1 と Eg5 の loop L5 の比較。

(A) Kinesin-1 の結晶構造解析 (PDB 4HNA)。(B) Kinesin Eg5 の結晶構造解析 (PDB 3HQD)。赤はスイッチ 1、紫はネックリンカー、青は $\alpha 2$ ヘリックス、緑は $\alpha 3$ ヘリックス、橙色は loop L5 をそれぞれ示す。スイッチ 1 領域は $\alpha 3$ ヘリックスと連続しており、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスの間にヌクレオチド結合部位が位置する (Muretta JM. 2015 [42]から引用)。

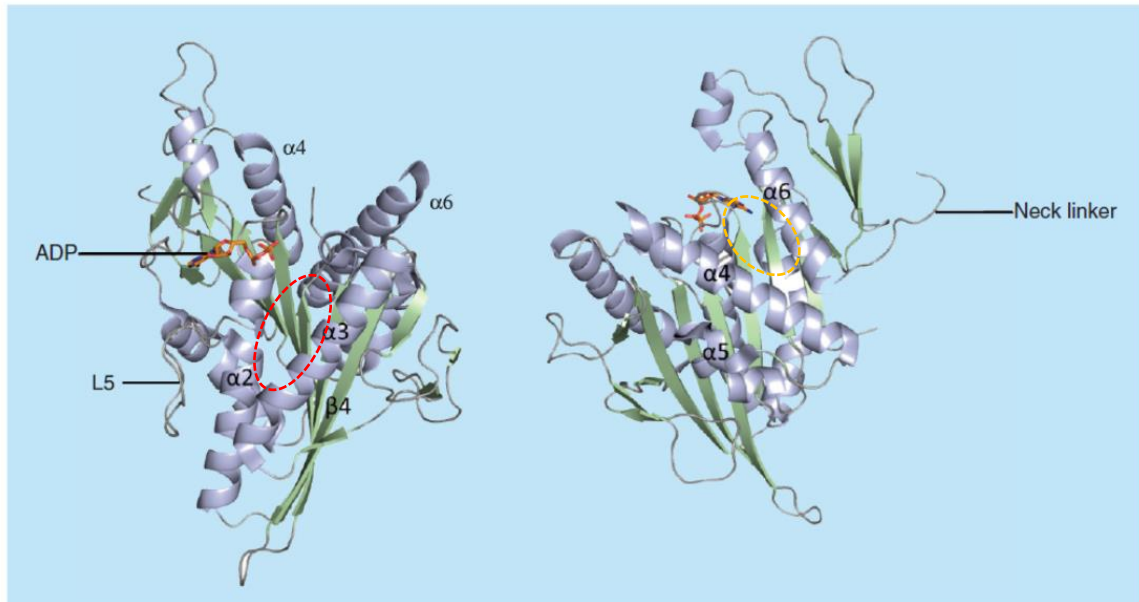


図 1-16 Eg5・ADP 複合体の結晶構造解析 (PDB No. 1III6)。

青は α ヘリックス、緑は β シートをそれぞれ示す。赤線と橙色線路はそれぞれ Eg5 阻害剤結合部位を示す。赤線は $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックス、loop L5 で構成され、STLC など多くの阻害剤が結合する。橙色線は $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスで構成され、一部の Eg5 阻害剤が結合する。

(Myers SM. 2016 [80]から引用)。

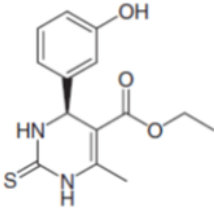
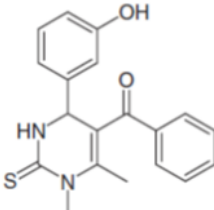
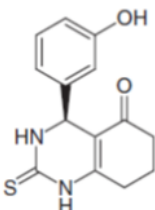
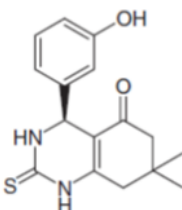
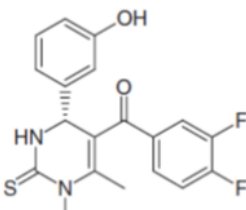
Compound class	Compound identifier	Structure
Dihydro-pyrimidine-thione	(S)-Monastrol	
	<i>rac</i> -Mon-97	
	(S)-Enastron :	
	(S)-Dimethyl enastron	
	(R)-Fluorastrol	

図 1-17 Dihydro Pyrimidine-thione 系 Eg5 阻害剤の化学構造

(Myers SM. 2016 [80]から引用)。

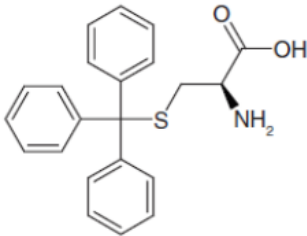
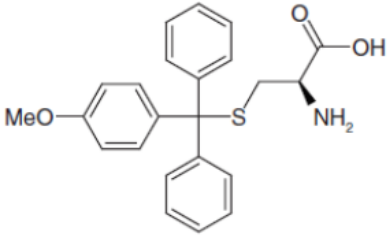
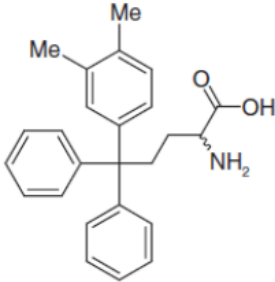
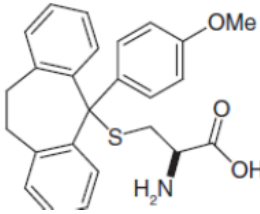
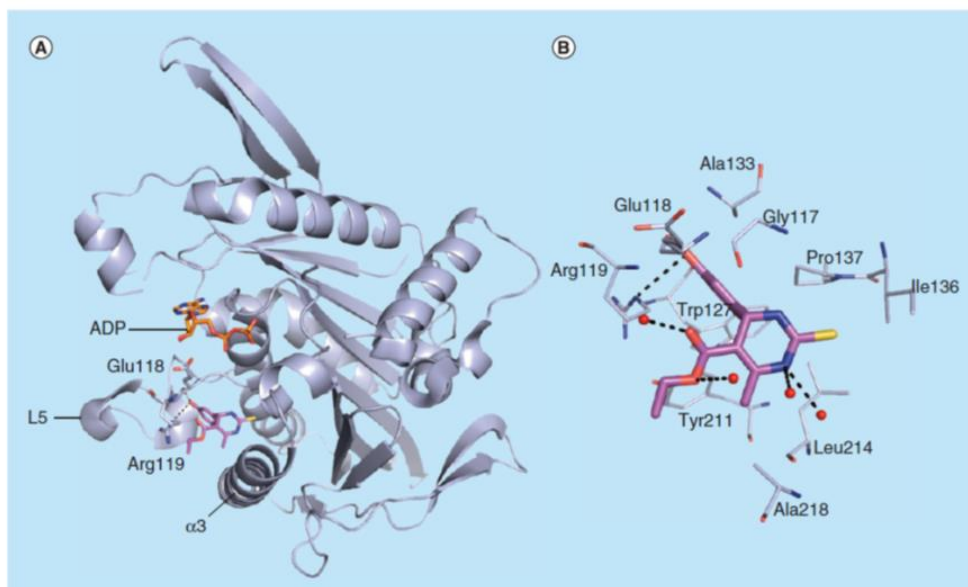
Compound class	Compound identifier	Structure
Tritylcysteine	STLC	   

図 1-18 Trytylcysteine 系 Eg5 阻害剤の化学構造。

Myers SM, Collins I. (2016)

A



B

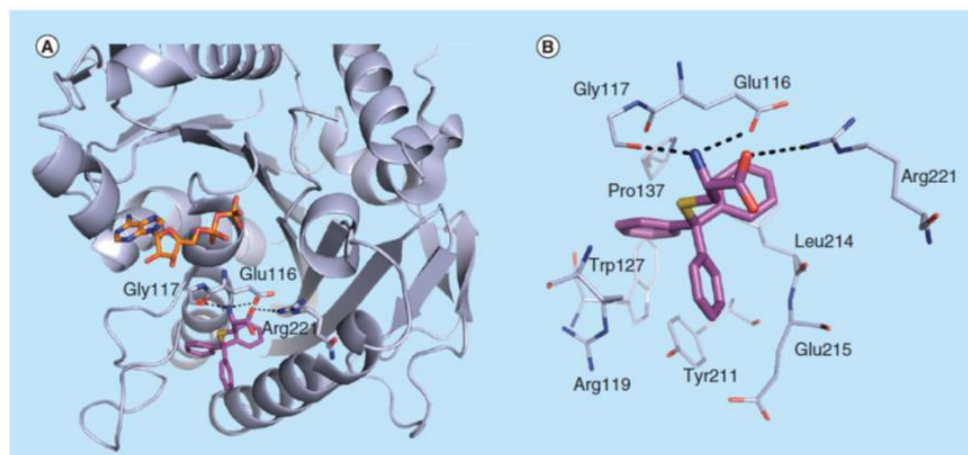


図 1-19 Eg5・ADP・阻害剤複合体の結晶構造解析

(A) Monastrol が結合した場合の結晶構造。右は結合部位周辺の相互作用するアミノ残基を示す。(B) STLC が結合した場合の結晶構造。右は結合部位周辺の相互作用するアミノ酸残基を示す (Myers SM. 2016 [80]から引用)。

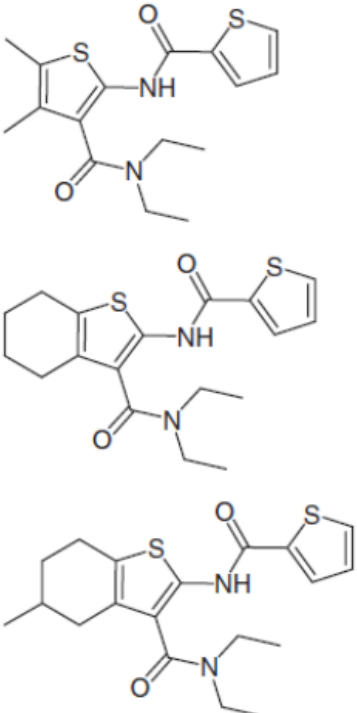
Compound class	Compound identifier	Structure
Thiophene-containing		

図 1-20 Thiophene 系 Eg5 阻害剤の化学構造

(Myers SM. 2016 [80]から引用)

Compound identifiers/ company	Structure	Phase	Clinical trial status [†]
Ispinesib (SB715992) Cytokinetics		I/II	15 trials completed 1 trial terminated
SB743921 Cytokinetics		I/II	2 trials completed
AZD4877 AstraZeneca		I/II	3 trials completed 3 trials terminated
Arq621		I	1 trial completed

図 1-21 創薬承認試験段階にある Eg5 阻害剤の化学構造式 (1)

(Myers SM. 2016 [80]から引用)

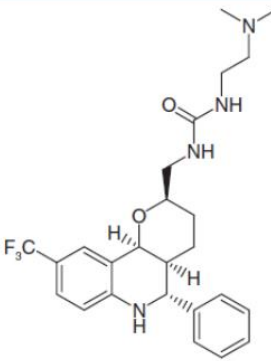
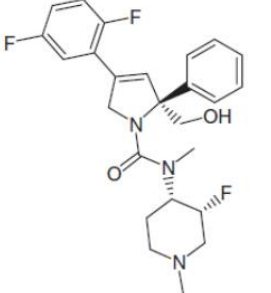
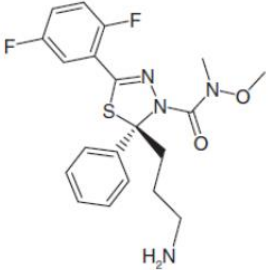
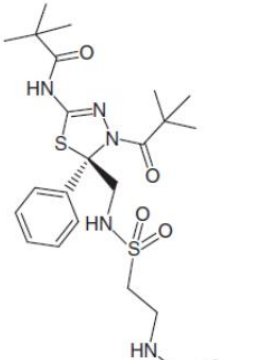
Compound identifiers/ company	Structure	Phase	Clinical trial status†
EMD-534085 Merck-KGaA		I	Not known†
MK-0731 Merck & Co		I	1 trial completed
ARRY-520 (Filanesib) Array BioPharma		I/II	2 trials completed 4 trials ongoing 2 trials planned
SB743921 Cytokinetics		I/II	2 trials completed

図 1-22 創薬承認試験段階にある Eg5 阻害剤の化学構造式 (2)。

(Myers SM. 2016 [80]から引用)

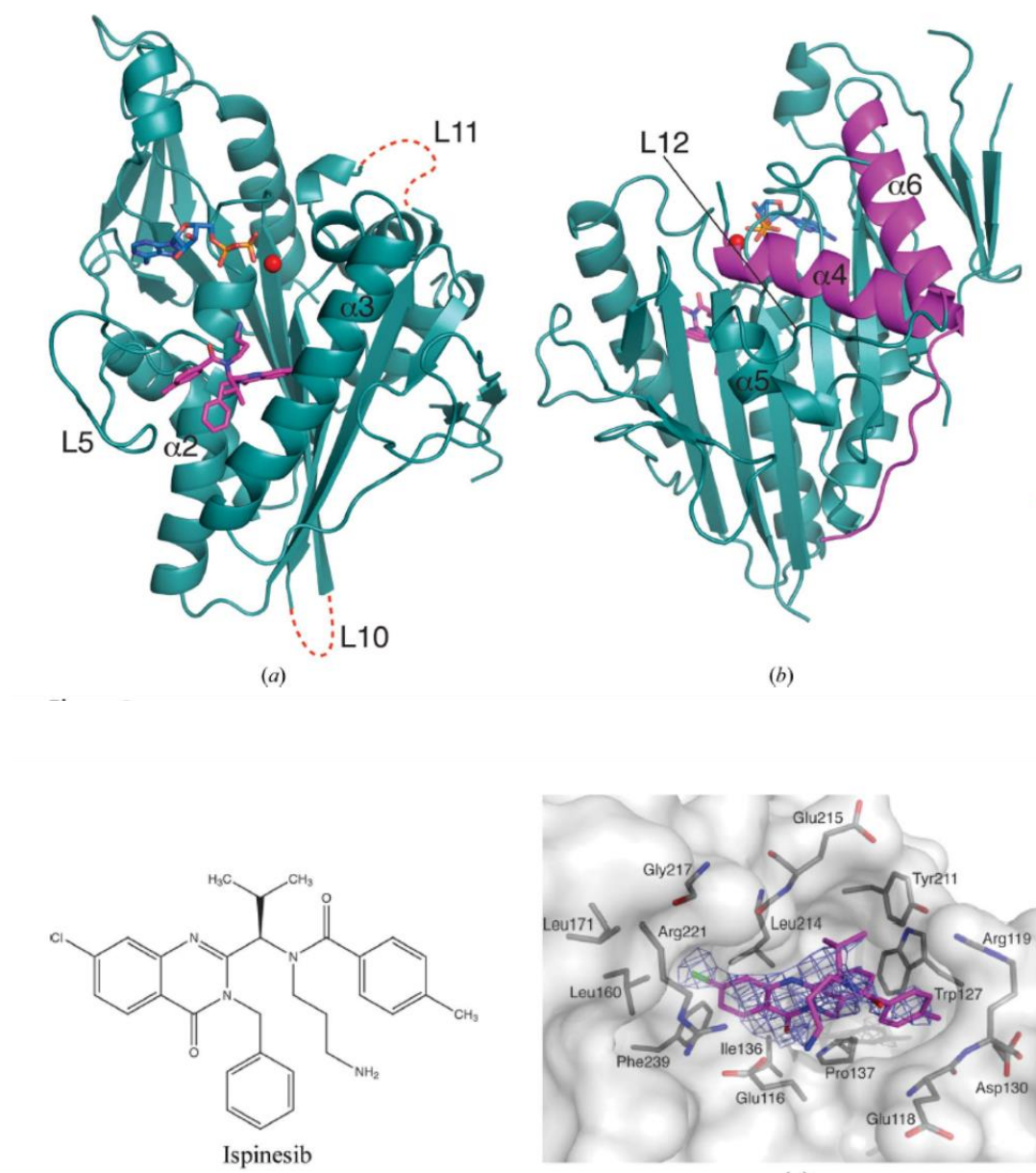


図 1-23 Eg5・ispinesib 複合体の結晶構造解析。

赤はマグネシウムを、化学構造式はマゼンタが ispinesib、橙色は ADP を示す。A はヌクレオチド結合部位から見た図、B はスイッチ 2 領域から見た図を示す。C は結合部位における ispinesib の配位状態をモデル化したものを示す (Talapatra SK. 2012 [55] から引用)。

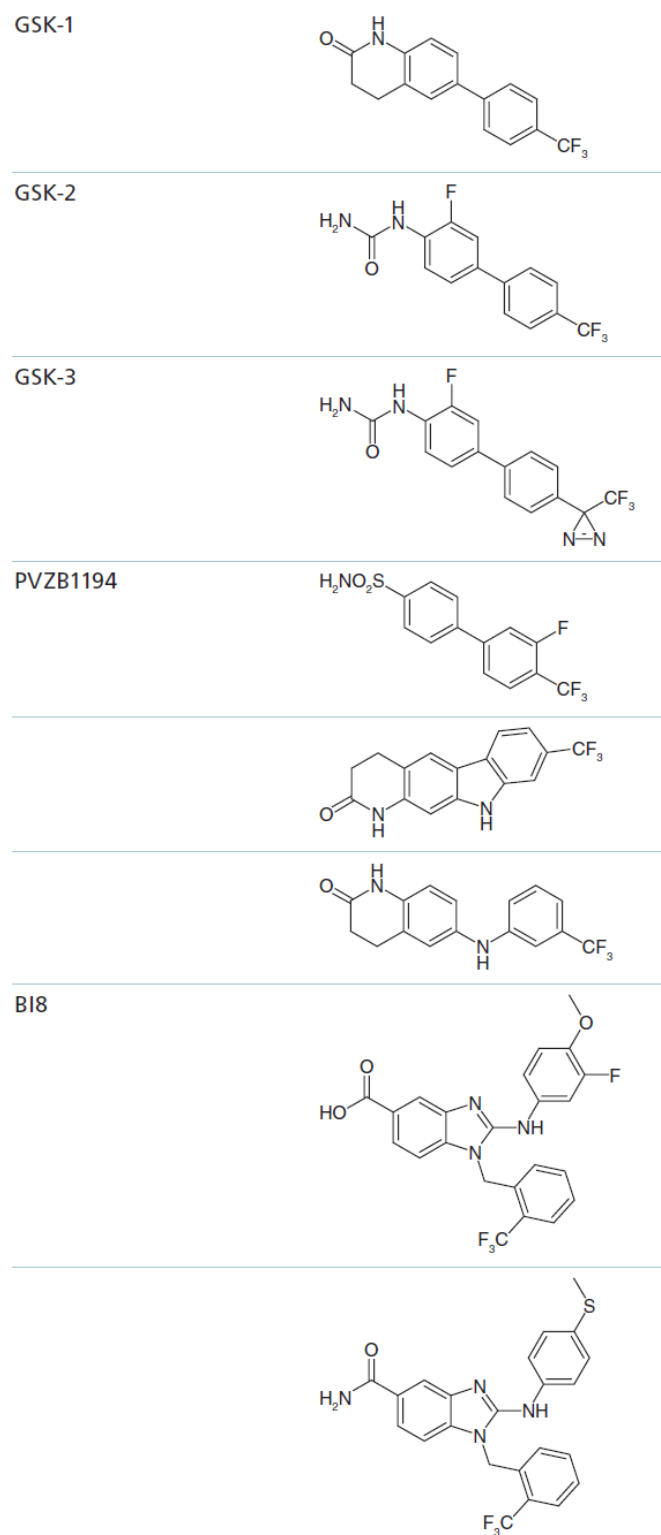


図 1-24 ビフェニル系及び弁ぞイミダゾール系 Eg5 阻害剤の化学構造

(Myers SM. 2016 [80]から引用)

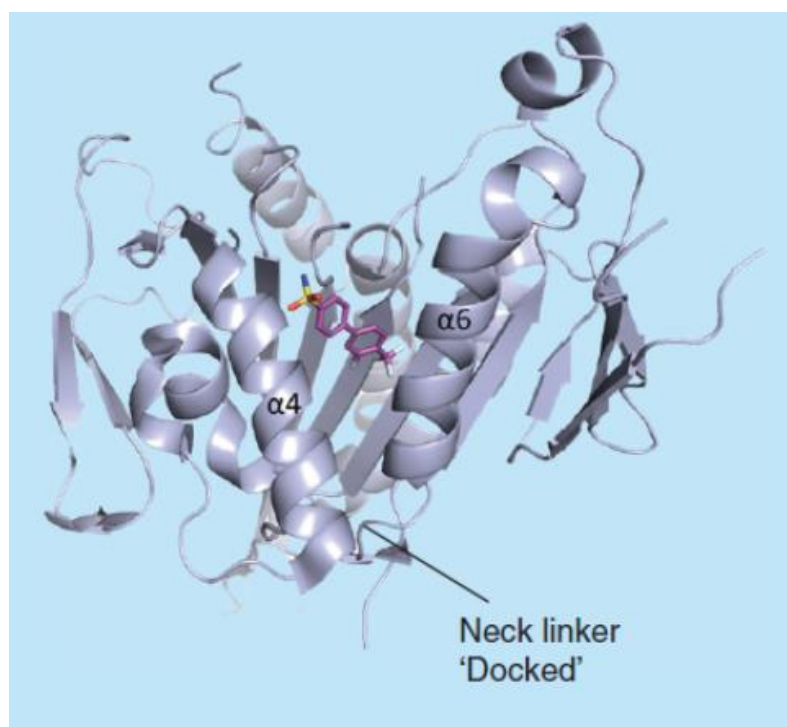


図 1-25 Eg5・PVZB1194 の結晶構造解析 (PDB 3WPN)。

マゼンタはPVZB1194を示す。ネックリンカーはEg5側に折られた“ドッキング”状態である (Myers SM. 2016 [80]から引用)。

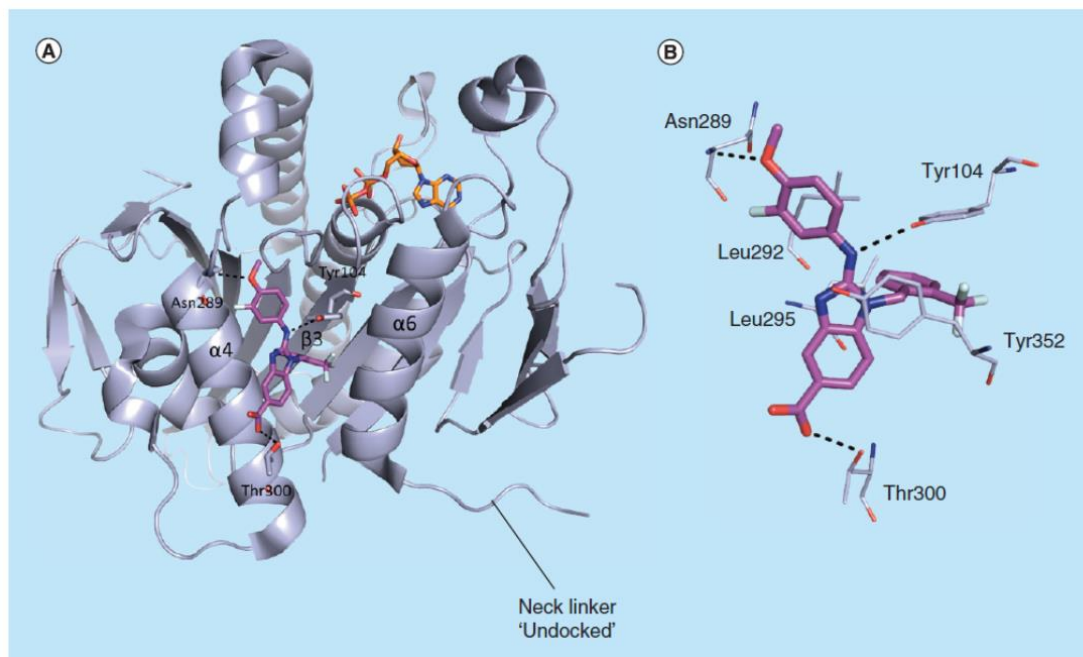


図 1-26 Eg5 · BI8 の結晶構造解析 (PDB 3ZCW)。

マゼンタは BI8 を、橙色は ADP を示す。左図は結晶構造を、右図は BI8 が相互作用する結合部位近傍のアミノ酸を示す (Myers SM. 2016 [80]から引用)。

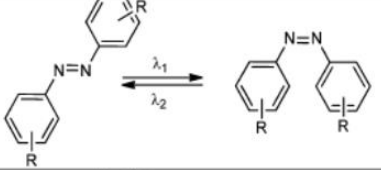
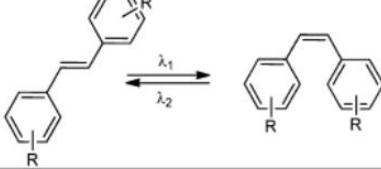
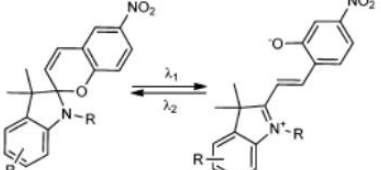
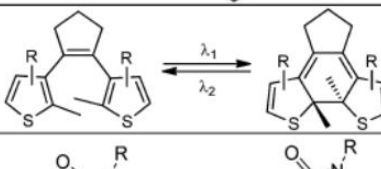
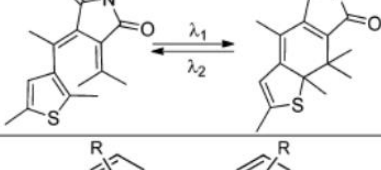
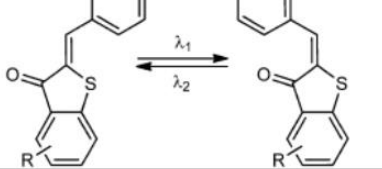
	Photoswitches	Isomerization	λ_1/λ_2
A	Azobenzenes		UV/VIS (ΔT)
B	Stilbenes		UV/UV
C	Spiropyrans		UV/VIS (ΔT) or VIS/UV
D	Diarylethenes		UV/VIS
E	Thiophenefulgides		UV/VIS
F	Hemithioindigos		VIS/VIS (ΔT)

図 1-27 フォトクロミック分子の一覧と光異性体の化学構造式。

UVは紫外光(Ultra violet)、VIS (visible light) は可視光を示す。 ΔT は熱による光異性化が生じることを示す (Szymański W. 2013 [58]から引用)。

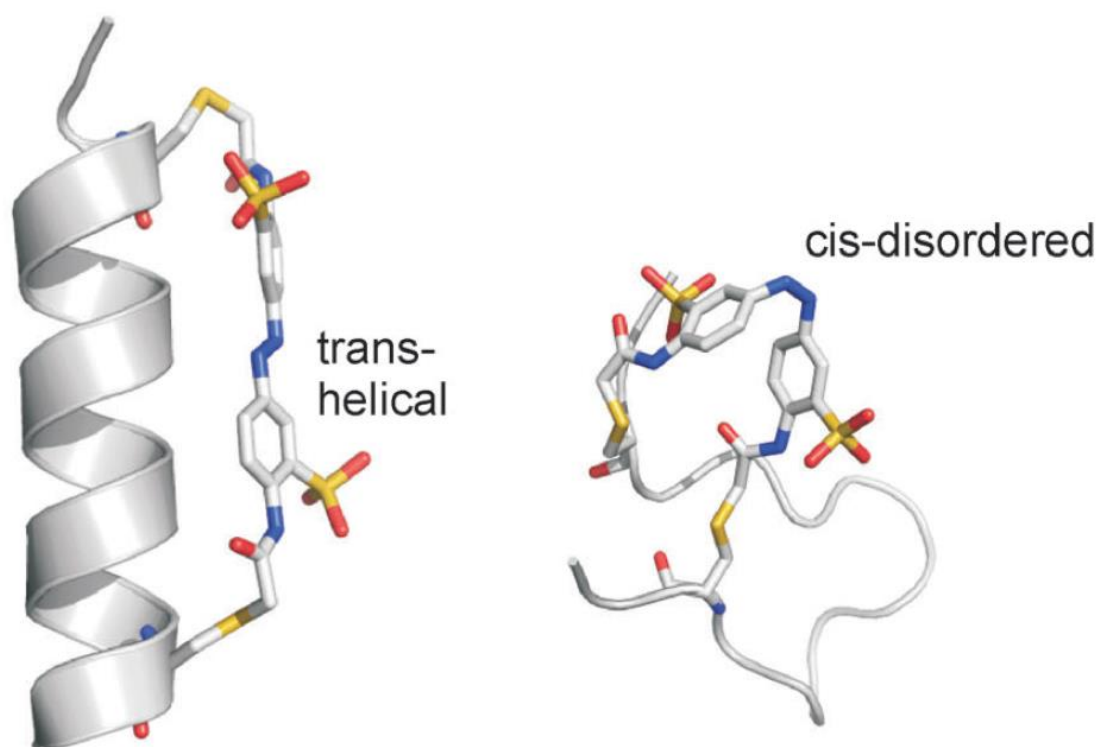


図 1-28 アゾベンゼンを分子内架橋したポリペプチドのヘリックス形成の光制御。

二価架橋性アゾベンゼンを α ヘリックスを形成するペプチドに修飾し、光異性化によって二次構造の制御を行う。図では、Trans-体で二次構造を形成し、Cis-体で一次構造に戻しているが、光異性体は逆でも可能である (Beharry AA, Woolley GA. (2011) Azobenzene photoswitches for biomolecules. Chem Soc Rev. 40:4422-37 から引用)。

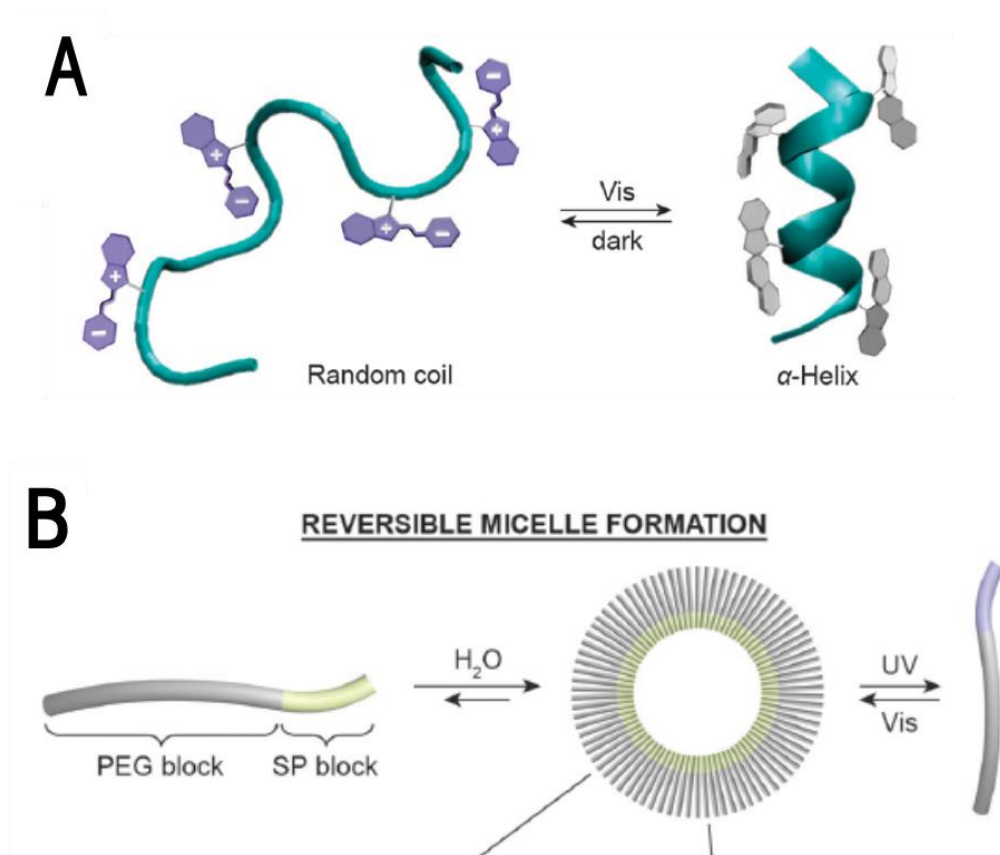


図 1-29 スピロピランを用いた光応答性機能分子。

(A) スピロピランを化学修飾したポリペプチドのヘリックス形成の光制御。スピロピランの極性の変化を利用して、ヘリックス形成の光制御を行う。(Angelini N. 1998 [62]から引用)。(B) スピロピランを付与したポリマーによるミセル形成の光制御。スピロピランの極性の変化を利用して、ヘリックス形成の光制御を行う (Lee H. 2007 [63]から引用)。

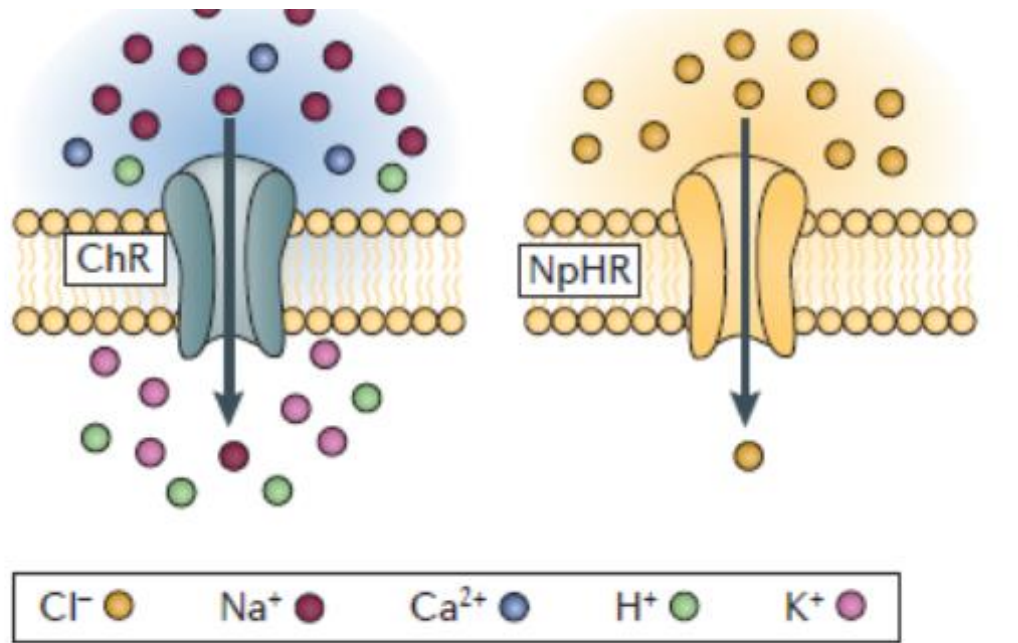


図 1-30 光応答性タンパク質 ChR, NpHR によるイオンチャネルの光制御。

ChR はナトリウムやカリウムイオンを、NpHR は塩素イオンに選択的であり、それぞれ光照射によってポンプとしての機能を制御できる。ChR (channelrhodopsin=チャネルロドプシン) NpHR (halorhodopsin=ハロロドプシン) (Tye, K. 2012 [65]から引用)。

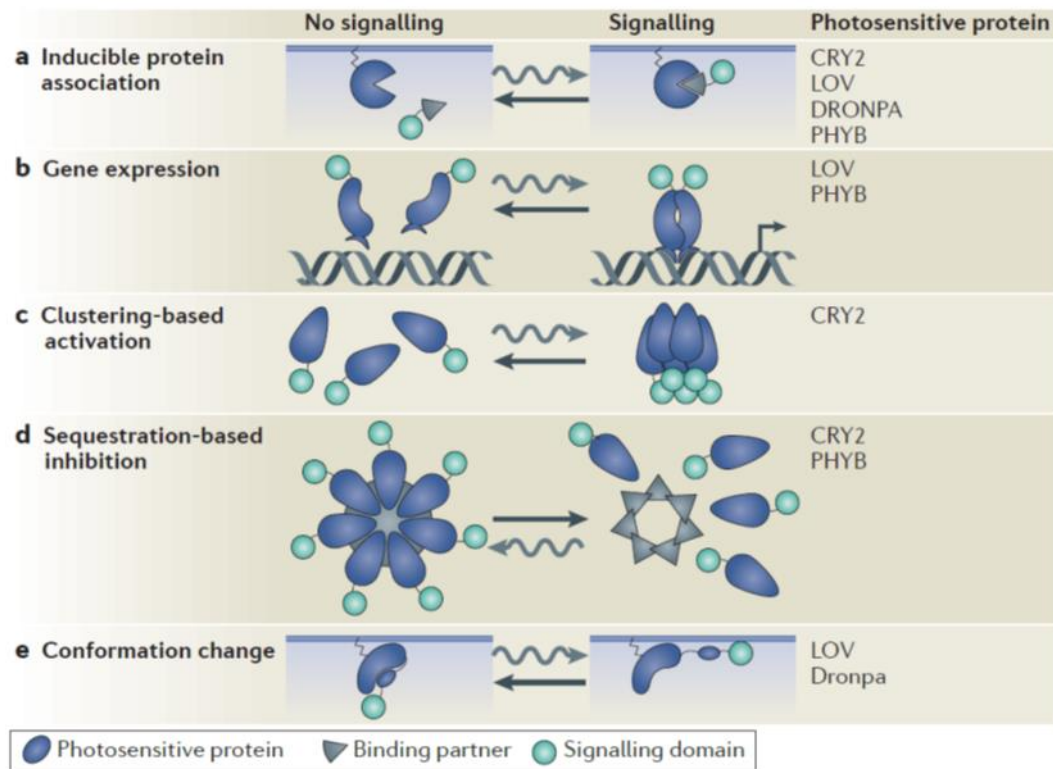


図 1-31 光応答性タンパク質を用いた生体分子機能の光制御。

CRY2: Cryptochrome2, LOV: light-oxygen-voltage, PHYB: Phytochrome B (Tischer D. 2014 [64]から引用)。

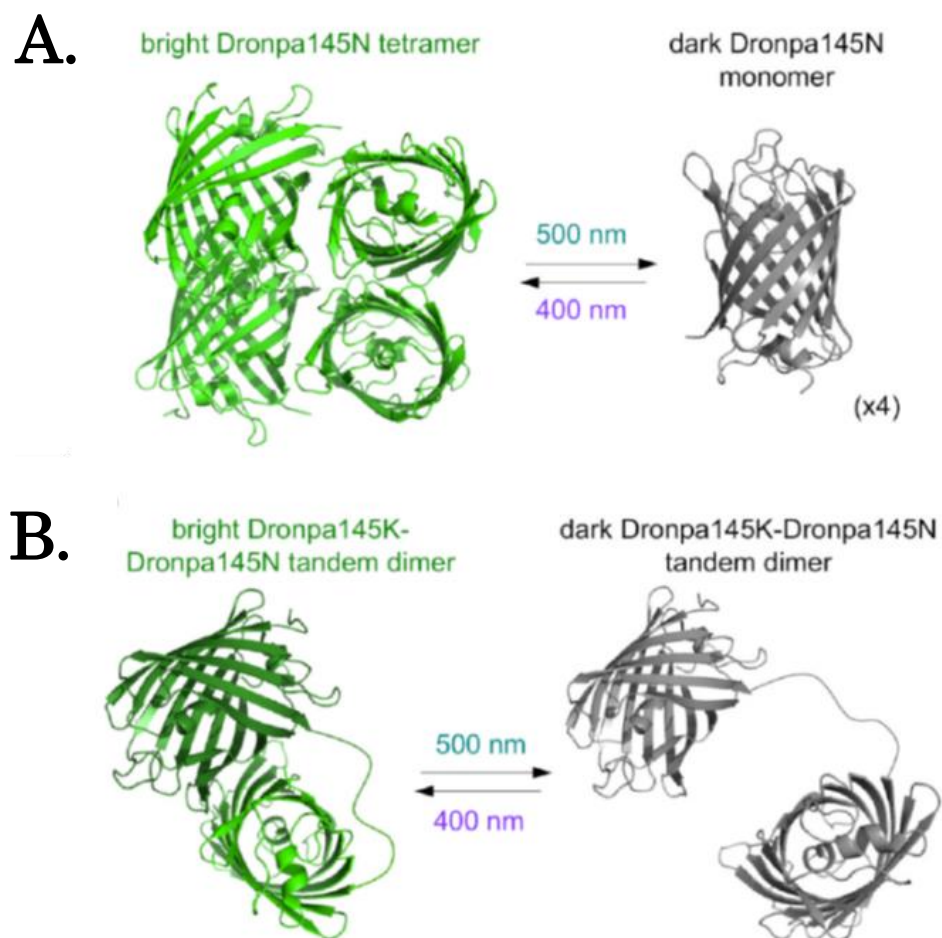


図 1-32 光応答性タンパク質 Dronpa の多量体形成と蛍光発色の光制御。

Dronpa はキッカサンゴ由来の一種の蛍光タンパク質であるが、光照射によって多量体化と蛍光団の形成が制御される。(A) 単量体の Dronpa は 400 nm の光照射によって四量体を形成し、さらに蛍光を獲得する。(B) リンカーによって連結された Dronpa も同様に、光照射によって二量体を形成し、蛍光を獲得する (Zhou XX. 2012 [66]から引用)。

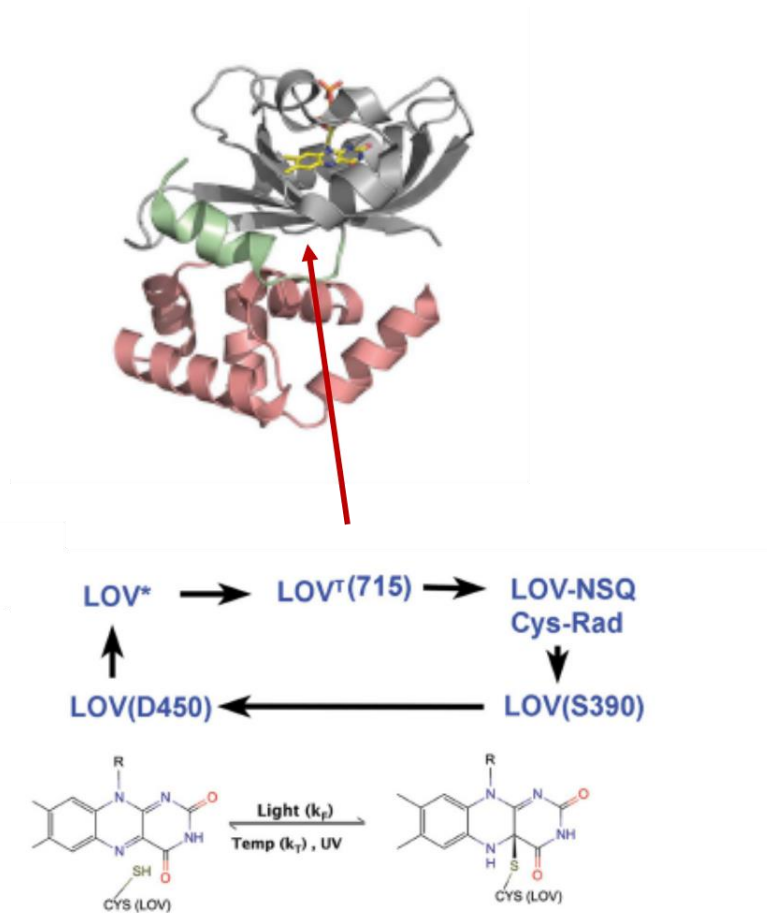


図 1-33 光応答性タンパク質 LOV ドメインの光制御。

LOV は青色光の照射によるフラビン - システイン（フラビン発色団）の変化によって光可逆的に制御される。光照射によって一重項励起状態になった LOV (LOV*) から三重項状態 (LOV^T) への変化が起きる (Pudasaini A. 2015 [67]から引用)。

表 1-1 各キネシンサブファミリーの機能一覧。

キネシンのサブファミリー毎に、主な生理的な特徴を示す。動物種やサブファミリーについては、本表では省略している（Verhey KJ. 2009 [35]から引用）。

Family	Functions
Kinesin-1	Vesicle, organelle and mRNA transport
Kinesin-2	Vesicle, melanosome and intraflagellar transport
Kinesin-3	Vesicle transport
Kinesin-4	Chromosome positioning
Kinesin-5	Spindle pole separation and spindle bipolarity
Kinesin-6	Central spindle assembly and cytokinesis
Kinesin-7	Kinetochores-microtubule attachment and chromosome congression
Kinesin-8	Chromosome congression
Kinesin-10	Chromosome positioning
Kinesin-12	Spindle pole organization
Kinesin-13	Kinetochores-microtubule error correction and chromosome segregation
Kinesin-14	Spindle pole organization and cargo transport

表 1-2 Kinesin-1 と Kinesin Eg5 の生化学的特徴。

Eg5-367 は単量体のとき、Eg5-513 は二量体のときの結果を示す。Basal は微小管非存在下における活性、MT-stimulated は微小管存在下での活性を示す (Waitzman JS. 2014 [43]から引用)。

	Eg5-367	Kinesin-1 monomer	Eg5-513	Kinesin-1 dimer
Basal ADP release (s)	0.27	0.02		
Basal ATPase (s/site)	0.25	0.006		
Maximal MT-stimulated ADP release (s)	42.3	>100	28.2 <i>1.0</i>	95
MT-stimulated ATPase (s/site)	6.25	60	0.48 (steady- state) 5–10 (while stepping)	31
Motility rate (nm/s)	20.5	88	32.9	450

表 1-3 ガン化に伴って発現と活性に異常が確認されたキネシン

CENPE: centromere-associated protein, E MCAK: mitotic centromere-associated kinesin, MKLP: mitotic kinase-like-1, MPP1: M-phase phosphoprotein 1 (Oliver Rath. 2012 [46]から引用)。

Name	Expression status
KIF2A	Overexpression promotes the development of squamous cell carcinoma of the tongue ⁷²
MCAK	A prognostic marker in colon cancer ⁸⁰ ; overexpressed and associated with poor prognosis in gastric cancer ⁸¹ ; overexpressed during breast tumorigenesis ⁸²
KIF4A	Amplified* and overexpressed in cervical cancer ⁹⁵ ; prognostic marker for lung cancer ⁹⁶
CENPE	Downregulated in hepatocellular carcinoma ⁴⁸ ; overexpression is associated with poor prognosis in certain types of breast cancer ⁴⁷
EG5	Highly expressed in blast crisis chronic myelogenous leukaemia ²¹⁰ ; overexpressed in pancreatic cancer ²¹¹
KIF14	Predictor of grade and outcome in breast cancer ¹²³ and ovarian cancer ¹²⁵ ; prognostic marker in lung cancer ¹²⁴
KIF15	Breast cancer tumour antigen ³²
KIF18A	Overexpressed in colorectal cancer ¹⁰⁷ ; overexpressed and associated with tumour grade, metastasis and poor survival in breast cancer ¹⁰⁶
MKLP1	Overexpressed in glioma ¹³³
MKLP2	Overexpressed in pancreatic cancer ²¹²
MPP1	Overexpressed in bladder cancer ¹⁴⁵
HSET	Highly predictive of brain metastasis of early and advanced lung cancer ⁶¹ ; overexpression in breast cancer cells leads to docetaxel resistance ⁶²
KIFC3	Downregulated in paclitaxel-resistant breast cancer cell lines; overexpression in breast cancer cells results in docetaxel resistance ⁶²

第 2 章

スピロピラン誘導体由来

Eg5 フォトクロミック阻害剤による Eg5 活性の光制御

2.1 本章の要旨

第2章では、スピロピラン誘導体を用いた新規 Eg5 フォトクロミック阻害剤の設計と合成、その阻害効果の検証実験を行った。スピロピランはフォトクロミック分子の1つで、可視光照射でスピロ型（以下、SP型）、紫外光照射（以下、UV）でメロシアニン型（以下、MC型）へと可逆的に構造変化する。SP型は閉環構造を持つ疎水性分子だが、MC型は双性イオンを持つ開環構造となり極性を獲得する。

本章では始めに、Eg5 阻害剤である STLC を参考として、スピロピラン部位がトリチル基の役割を置換することを目論み設計と合成を行った。チオール基反応性を持つモノヨードスピロピラン（IASP）、マレイミドスピロピラン（MASP）と L-cystein を共有結合することで、L-cys-IASP, L-cys-MASP をそれぞれ調製した。L-cys-IASP は ATPase 活性試験において、阻害効果を示したが、光異性体間での阻害効果の顕著な差は見られなかった。一方、L-cystein の代わりに、N-アセチルシステインを導入した N-Ac-cys-IASP では阻害効果自体が見られなかった。L-cys-MASP の ATPase 阻害効果は、微小管存在下でモノヨードスピロピラン由来と比較して、ナノモル濃度の範囲で作用することが確認された。光異性体間の阻害効果にも、有意な差が見られた。しかしながら、微小管非存在下における Basal ATPase 活性の阻害効果は確認されなかった。微小管滑り運動アッセイを用いてモーター活性に対する阻害効果を検証した結果、L-cys-MASP は Eg5 と微小管の相互作用に作用していることが示された。MC型において、滑り運動中の微小管の Eg5 からの解離は、SP型よりも多く発生した。Eg5 阻害剤の1つである isopinesib とスピロピランの構造は類似しており、必ずしも L-システインが必須でないことは他の Eg5 阻害剤の構造から推察される。本章では次に、L-システインの代わりに炭素鎖の異なるアミノ基を直接スピロピランに導入したフォトクロミック isopinesib アナログを合成、検証した。微小管存在下における ATPase 活性試験の結果から、アミノ基とスピロピランの距離が短い SP-APA と、最も長い SP-lisine ではほとんど阻害効果は確認されなかった。SP-ABA では僅かに阻害効果が確認されたが、光異性体間の顕著な差は見られなかった。

2.2 緒言

モータータンパク質は細胞骨格を構成する微小管やアクチン繊維に沿って運動する。モータータンパク質の種類と機能は多岐にわたり、特に細胞機能の1つである有糸分裂に複雑に関わっていることが明らかとなってきた。特に微小管によって形成される細胞周期 M 期に見られる“紡錘体”の形成過程と、染色体の移動において、モータータンパク質の存在は不可欠である。微小管をレールとして運動するモータータンパク質は、主にキネシンとダイニンである[45]。第1章で示したように、中心体を起点として紡錘体が形成される過程で、ダイニンは滑車のような役割を果たして紡錘体の配置を制御している。また、キネシンについては多くのサブファミリーが関与している。例としては、クロモキネシンと呼称されるキネシン-4などは、紡錘体上の染色体の位置を調節している[68]。これらの細胞分裂に関与するモータータンパク質は、抗がん剤の標的タンパク質として注目されている[69]。

数多くのモータータンパク質の中でも、キネシン5は特に、紡錘体形成においてユニークな役割を果たしている。第1章で述べたように、キネシン5は、キネシンサブファミリーの1つであり、キネシン Eg5とも呼称される。キネシン Eg5のドメイン構造は、他のキネシンと大きな変化がない。しかしながら、キネシン Eg5は四量体を形成することで、2本の微小管を架橋することができる。また、キネシン Eg5の運動方向が相反するため、架橋された微小管はお互いが離れるように動いていく[38]。四量体を形成したキネシン Eg5は“双極性キネシン”として機能し、紡錘体の形成と安定性を維持する。したがって、キネシン Eg5の異常は、紡錘体形成の異常に直結し、正常な細胞分裂の妨げとなる。

キネシン Eg5は他のキネシンと異なり、細胞分裂期の紡錘体形成のみに機能することは抗がん剤治療の標的としても適切である。通常、抗がん剤の標的分子は微小管などの細胞骨格であり、それらを破壊または伸長阻害することで紡錘体形成と細胞分裂を抑制する。微小管は正常な細胞においても、キネシンやダイニンの物質輸送などに不可欠であるため、これらの抗がん剤は副作用の可能性が極めて高いという問題がある。実際にキネシン Eg5

の発見以降、抗がん剤の標的タンパク質として、各種阻害剤が開発、報告されている。Monastrol、STLC、ispinesibなどは代表的な Eg5阻害剤であり、すでに薬剤試験が進んでいる[46]。前述の3つの Eg5阻害剤については、Eg5と結合した状態での結晶構造解析が完了しており、MD シミュレーションによる解析も踏まえて、阻害機構も明らかである[51, 55, 70]。興味深いことに、これらの Eg5阻害剤は分子構造の類似性が乏しいにも関わらず、Eg5に対して同じ結合部位を共有していた（第1章1.3.2 抗ガン剤の標的分子としてのキネシン Eg5とその阻害剤を参照）。Eg5が持つ阻害剤結合部位は、ヌクレオチド結合部位のb近傍に位置し、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスと loop L5によって構成される。また、阻害剤が結合した Eg5は loop L5が蓋をするように折りたたまれることが結晶構造及び実験的方法で明らかとなっている。また、速度論的解析によれば、阻害剤は Eg5の ATP サイクルにおける ADP 放出を抑制していることが判明している。前述の阻害機構に関してもまた、厳密には相互作用を起こす Eg5のアミノ酸残基に違いはあるが、同じ結合部位を共有するため同一であると予想されている。

阻害剤の多くは不可逆的であるが、これは低分子化合物の多くが安定した構造を持つことに由来する。2016年のノーベル化学賞を受賞した超分子機械は、光照射などの簡便な方法で分子構造を可逆的に制御できる分子機械であった。生体物質においても、光応答性のタンパク質がいくつか報告されており、“オプトジェネティクス”という分野が発展しつつある[10]。化合物やタンパク質の構造変化は、すなわち機能の変化を意味する。したがって、光応答性化合物や生体物質を、標的となる特定の機能を持った生体物質に対するリガンドとして応用できれば、光照射によって簡単に標的の機能を可逆的に制御できる。石川らは Eg5阻害剤である STLC に、光応答性化合物の1つであるアゾベンゼンを導入した“フォトクロミック STLC アナログ”である ACTAB を設計、合成した[20]。可視光照射で光異性化した trans-ACTAB 体は、Eg5の ATPase 活性とモーター活性を阻害したが、紫外光照射で光異性化した cis-体では阻害効果が減退した。したがって、ACTAB は Eg5活性を、間接的に、光制御できることが証明された。しかしながら、ACTAB の微小管依存性 Eg5 ATPase 活性の IC_{50} は trans-体で $5.2 \mu M$ 、cis-体で $9.2 \mu M$ であり、光異性体間の阻害活性の差は小さ

かった。光異性体間の阻害活性の差が小さいということは、フोटクロミック Eg5阻害剤の光制御の効率が低いことを意味する。光制御の効率が高いフोटクロミック Eg5阻害剤とは、光異性体間での阻害活性の差が大きく、理想的には、片方の光異性体では全く阻害活性を持たないが、もう片方の光異性体は強い阻害活性を持つものである。これは Eg5活性の活性化/不活性化を、ON/OFF で制御できる光スイッチとなる。したがって、ACTAB は間接的な光制御が可能であることを示したが、Eg5活性の光スイッチとしては不十分であり、光制御の効率を向上させる必要があった。

阻害活性の強さは阻害剤の化学構造に依存する。したがって、光制御の効率を向上させるには、フोटクロミック Eg5阻害剤の光異性体間において、より大きな構造と分子的特徴の変化が必要となる。アゾベンゼンは窒素間二重結合を介して連結した2つのベンゼンが、光異性化にともない trans-体と cis-体に配座が可逆的に変化する。したがって、2つの光異性体による活性の変化は、立体配座による構造変化に起因している。前述の ACTAB についても、cis-体ではアゾベンゼンのイプソ位に置換されたトリチル基と L-システインの立体構造が、互いに干渉しあうように変化することで阻害活性が減衰したと推測された。光応答性化合物の多様性については、第1章で述べたとおりである。アゾベンゼンを含む多くの光応答性化合物の光異性体は、構造の変化が生じるだけである。しかしながら、スピロピランやジアリールエテンといった一部の光応答性化合物は、構造変化と同時に大きな極性変化をとまなう。ベンゾピランとインドリンが連結した、比較的、単純な分子構造を持つスピロピランは紫外光照射によって開環状態の“メロシアニン型 (MC 型)”へ、可視光照射で閉環状態の“スピロピラン型 (SP 型)”へ、可逆的に光異性化する。さらに、スピロピランの極性も光異性化によって、SP 型で疎水性に、MC 型で親水性に可逆的に変化する [71]。スピロピランは立体構造と極性の2つのパラメーターが可逆的に変化するため、これをフोटクロミック Eg5阻害剤に導入した場合、アゾベンゼンよりも顕著な光異性化による阻害活性の変化が期待される。

2.3 実験材料と方法

2.3.1 試薬

試薬類は主に和光純薬工業（株）の製品を使用した。有機合成に関する試薬の一部は東京化成工業（TCI）の製品を使用した。分子生物学実験について、オリゴヌクレオチドはユーロフィンジェノミクス株式会社（旧、オペロンバイオテクノロジー株式会社）で合成を依頼し、使用した。制限酵素など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（現、メルクミリポアグループ）から購入した。

2.3.2 Eg5 モータードメインの調製

Eg5 モータードメインの発現は、石川らが確立した方法にしたがって行った[20]。マウス cDNA ライブラリーを鋳型とした N 末端側プライマー (5'-GGAATTCATGGCGTCCCAGCCGAGTTCTTTGAAGAAG-3') と C 末端側プライマー (5'-CGCCTCGAGGAGGTTTATGGAGGTGTGAAGCGGCAGTC-3') を設計し、モーター、ストーク、テイルドメインを含む全長の Eg5 DNA を PCR によって増幅した。得られた PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動を用いて塩基数ごとに分離し、目的の塩基数となるバンドを切り出した。切り出したバンドから、DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) を用いて全長 Eg5 cDNA (Eg5_{FL} cDNA) を精製した。

EcoRI と XhoI で一晩、制限酵素処理した Eg5_{FL} cDNA と、His-tag 配列を有する大腸菌発現用ベクター pET21a はそれぞれアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、目的のバンドを切り出したら、DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) を用いて抽出した。その後、得られた Eg5_{FL} cDNA と pET21a は 15°C で 2 時間、ライゲーション処理した。ライゲーション処理した DNA 産物は、コンピテントセルである大腸菌 DH5 α 株に形質転換により導入した。導入後、アガロースゲル電気泳動法を用いて目的の cDNA 断片が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌株を特定した。得られた大腸菌株から、アルカリ法を使用し、Eg5_{FL} cDNA が組み込まれたプラスミドを精製した。

Eg5 cDNA を鋳型として、Eg5 モータードメインの DNA を調製した。新たに N 末端側プライマー (5'-CACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGC-3') と、C 末端側プライマー (5'-TTTTGATTAACCTCAGGCTTATTCATTATG-3') を設計し、PCR によって Eg5 モータードメインを増幅した。得られた PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動を用いて塩基数ごとに分離し、目的の塩基数となるバンドを切り出した。切り出したバンドから、DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) を用いて Eg5 モータードメイン cDNA (Eg5_{MD} cDNA) を抽出した。抽出した Eg5_{MD} cDNA を 15°C、2 時間でセルフライゲーションさせた後、アルカリ法を用いて Eg5_{MD} cDNA が挿入されたプラスミドを精製した。

2.3.3 Eg5 モータードメインの発現と精製

Eg5 モータードメインの発現と精製は、石川らの方法にしたがって実施した[20]。Eg5_{MD} cDNA をトランスフォーメーションしたタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) を 100 µg/mL L-ampicilin を含む LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。発生したコロニーを複数選択したら、それぞれ 5.0 mL の 100 µg/mL L-ampicilin を含む LB 培地に植菌し、37°C で一晩、振盪培養して大腸菌懸濁液を獲得した。Eg5_{MD} の発現確認は、以下に記した少量培養で行った。50 µL の大腸菌懸濁液を 3.0 mL の 100 µg/mL L-ampicilin を含む LB 培地に移し、37°C で OD_{0.6}~0.8 になるまで振盪培養した後、18°C まで冷却後、500 µM IPTG を加えた発現誘導系と、加えないコントロールに分けて 18°C で一晩、振盪培養した。高速遠心機 (3000 rpm, 15 分間、4°C) で集菌した大腸菌を PBS で再懸濁し、超音波破碎して 16000 rpm、4°C で 20 分間、高速遠心を行い上澄みと沈殿をそれぞれ回収した。回収した上澄み液と沈殿は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて分離し、Eg5_{MD} の分子量 (43kD) が発現誘導されているか確認した。

大量培養の前培養として、少量培養で Eg5 の発現が認められた大腸菌懸濁液 200 µL を 200 mL の 100 µg/mL L-ampicilin を含む LB 培地に移し、37°C で一晩、振盪培養して増殖させた。25.0 mL の前培養で得られた大腸菌懸濁液を、1.0 L の 100 µg/mL L-ampicilin を含む LB 培地に移し、37°C で OD_{0.6}~0.8 になるまで振盪培養した。目的の OD 値に到達した

ら、18℃まで冷却後、500 μ M IPTG を加えて 18℃で 20 時間、振盪培養した。発現誘導した大腸菌を高速遠心(5000 \times g、15 min、4℃)で集菌したら、HEM buffer (10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.2, 1 mM MgCl₂, 1 mM 0,0'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid [EGTA], and 25 mM NaCl)で再懸濁し、-80℃で保存した。

BL21 で発現誘導した Eg5 は、C 末端に pET21a ベクター由来の His タグが付属しているため、コバルトイオンと容易に配位結合することが可能である。したがって Eg5 の精製には、Co-NTA カラムを利用した金属アフィニティクロマトグラフィーを使用した。クロマトグラフィーにおける各段階でのタンパク質の検出は、260 nm における吸光度を使用した。はじめに、-80℃で冷凍保存した大腸菌を解凍後、高速遠心 (4,700 \times g , 10min, 4℃) で沈殿させ、HEM buffer を除去した。沈殿した菌体を超音波破碎用緩衝液 (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)で再懸濁したら、超音波破碎した。懸濁液は超遠心 (200,000 \times g, 4℃, 1 h) を用いて細菌断片などの不純物を沈殿させ、溶存タンパク質を含む上澄み液を回収した。吸着用緩衝液 (20 mM MOPS (pH7.0), 1 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 0.1 mM ATP, 0.2 mM β -mercaptoethanol)で平衡化した Co-NTA カラム (Talon® Metal Affinity Resin, Takara, Shiga, Japan)に、目的タンパク質を含む上澄み液を全量添加し、溶出用緩衝液でゆっくり送液して His タグ融合タンパク質をコバルトイオンに結合させた。コバルトまたは担体に非特異的に結合した不純物は洗浄用緩衝液 (20 mM MOPS (pH7.0), 1 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 0.1 mM ATP, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 30 mM Imidazole) で十分洗い流した。最後に、溶出用緩衝液 (20 mM MOPS (pH7.0), 1 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 0.1 mM ATP, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 150 mM Imidazole) でコバルトイオンに配位した His タグ融合タンパク質をカラム内から回収した。吸着時、洗浄時、溶出時で得られた分画について、吸光度のピークが高いものを複数、SDS-PAGE を用いて解析し、溶出段階において Eg5 が回収されたか確認した。溶出段階

で得られた Eg5 を含む分画を全て透析膜に移したら、透析用緩衝液(30 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, and 0.5 mM DTT)に浸し、一晚、4 °Cでゆっくりと攪拌しながら透析した。透析処理で濃縮された Eg5 はBradford法でタンパク質濃度を測定後、凍結保護材としてグリセロールを最終濃度 10%になるように添加した。Eg5 は 3.5~10 mg/mL の範囲で、液体窒素を用いた急速凍結後、-80°Cで保存した。

2.3.4 微小管の調製

微小管の素材となる α/β チューブリンは、Hackey らの手法[69]にしたがって、豚脳から精製した。重合、脱重合を繰り返して得られたチューブリンは、マイクロビュレット法でタンパク質濃度を測定後、約 10mg/mL に希釈し、液体窒素で急速凍結後、-80°Cで保存した。Eg5 ATPase 活性などで微小管を使用する際は、凍結保存したチューブリンを適時解凍し、以下の方法で重合を行った。解凍したチューブリンを PEM buffer (100 mM Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) [PIPES], pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂)に希釈後、1.0 mM GTP を添加し、37°Cで 30 分間静置した。十分にチューブリンの重合が完了したところで、10 μ M タキソールを添加し、37°Cで 10 分間静置して重合の抑制と安定化を行った。その後、微小管溶液を超遠心(280,000 \times g, 15 min, 37° C)で沈殿させ、未反応のチューブリンなどの不純物を含む上澄み液を完全に取り除いた。沈殿した微小管を PEM buffer (100mM PIPES pH 6.8, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 1mM GTP, and 10 mM taxol) で再懸濁したら、マイクロビュレット法でタンパク質濃度を測定し、37°Cで保存した。

2.3.5 蛍光標識微小管の調製

微小管滑り運動の観察のため、2.3.4 で調製したチューブリンの一部は、微小管結合タンパク質 (microtubule-associated proteins = MAPs) を取り除いて蛍光物質を標識した。2.3.5 の方法にしたがって調製した微小管を、を含む 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 分間静置した。その後、微小管懸濁液を超遠心(200,000 \times g, 20 min, 37° C)で沈殿さ

せ、DMSO 処理で微小管から解離した MAPs を含む上澄み液を完全に取り除いた。沈殿量の 2 ～4 倍量の氷冷した R-PEM buffer で微小管を再懸濁したら、氷冷下で 10 分間静置して脱重合を行った。脱重合が完了したチューブリン懸濁液に、1.0 mM GTP を加えて 37℃で 10 分間、静置して MAPs-free チューブリンを獲得した。MAPs-free チューブリンの一部は蛍光標識微小管の調製時に使用するため、マイクロビュレット法でタンパク質濃度を決定後、1～5 mg/mL の濃度で液体窒素を用いて急速凍結させ、-80℃で保存した。

Rhodamine 標識チューブリンは、蛍光色素である Rhodamine-NHS (Thermo Scientific) を MAPs-free チューブリンに共有結合させて調製した。MAPs-free チューブリンと Rhodamine-NHS を 1 : 20 のモル比で混合し、室温で 10 分間反応後、5.0 mM グルタミン酸カリウムを加えて反応を停止させた。得られた Rhodamine 標識チューブリン懸濁液に、1.0mM GTP を加えて 37℃で 30 分間静置して重合させたら、超遠心(37 °C, 20,000×g, 20 min)で微小管を沈殿させて上澄みを取り除いた。沈殿量の約 5 倍量の氷冷 R-PEM buffer で微小管を再懸濁したら、氷冷下で 10 分間静置して脱重合させた。蛍光標識チューブリンを含む懸濁液を超遠心 (4℃、20,000×g、20 min) して、沈殿した不純物を取り除いた。この重合/脱重合操作をさらに 2 回繰り返して、不純物を取り除いた。最後の重合で得られた Rhodamine 標識微小管の沈殿物に対して、沈殿量の約 5 倍の氷冷 PEM buffer を加えて再懸濁したら、氷冷下で 10 分間静置して脱重合を行った。脱重合で得られた Rhodamine 標識 MAPs-free チューブリン濃度はマイクロビュレット法と、Rhodamine のモル吸光係数 ($\epsilon_{575}=80,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) の 2 通りで測定し、微小管濃度/Rhodamine 濃度から標識効率を求めた。標識効率が 30～50%であることを確認したら、1～5 mg/mL の濃度で、液体窒素を用いて急速凍結し、-80℃で保存した。

2.3.6 L-cys-IASP, N-Ac-cys-IASP の合成

IASP の合成は石川らの方法にしたがって行った [73]。3,3-dimethyl-1-(2-(2-iodoacetoxy)ethyl)-3H-1,2-dihydroindole-2-spiro-2'-(2H)-6'-nitrochromene [IASP] は , 1-(2-Hydroxyethyl)-3,3-dimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylo-spiran と

iodoacetic anhydride のカップリング反応によって合成した。1-(2-Hydroxyethyl)-3,3-dimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran (65 μ mol) と iodoacetic anhydride (162 μ mol) を触媒である N,N-dimethyl-4-aminopyridine を含む THF に添加し、室温で 48 時間反応させた。合成産物を含む溶液は、オープンカラムクロマトグラフィーに充填したシリカゲル (ultra-pure Wakogel C-200) に吸着後、5% メタノール/95%クロロホルムの移動相で各成分を分離、精製した。得られた分画について、薄層クロマトグラフィー (Silica gel 70 F254, Wako) に滴下し、展開溶媒 : 5% methanol 95% chloroform を用いて精製と合成の確認を行った。IASP の R_f 値は 0.92 となった。得られた IASP はエバポレーターで溶媒を除去し、DMF で再懸濁した。L-cys-IASP の合成は、IASP と L-システインを 1 : 10 のモル比で混合した。IASP は DMF に、L-システインは DW にそれぞれ溶解した上で、反応溶媒にはエタノールを追加した。溶媒の比率は DMF:DW:EtOH = 1:1:1 として、室温下で 5 時間、反応させた。未反応の IASP の存在と、L-cys-IASP の合成確認は、薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 5% methanol 95% chloroform) で行った。

2.3.7 L-cys-MASP の合成

L-cys-MASP は SP-COOH を出発物質として、マレイミドスピロピラン (MASP) を合成後、MASP に L-システインを導入して調製した。SP-COOH は報告された合成方法にしたがって行った [74]。2,3,3-trimethylindolenine と 3-iodopropionic acid を混合し、80°C で 12 時間反応させた。析出した合成産物を蒸留水に溶かし、クロロホルムで 2 回洗浄し、エバポレーターで溶媒を取り除いた。残留物をアセトン-ジエチルエーテル混合液に溶解したら、エバポレーターで溶媒を取り除いて再結晶させた。再結晶化で得られた 1-carboxyethyl-2,3,3-trimethyl-indolenine iodid と N-methyl morpholine を dry EtOH に溶かし、80°C で 1 時間還流した。その後、2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde を加えて 80°C で 30 分間反応させたら、氷温まで冷やしてから一晩、氷冷状態で静置した。得られた析出物は桐山ロート S-21 (桐山製作所) を用いた吸引ろ過により溶媒を取り除き、エタノールで 2 回洗浄後、エバポレーターで乾燥させて再結晶化した。結晶化した 1-(β -carboxyethyl)-3,3-

dimethyl-6'-nitrospiro (以下、SP-COOH) は FAB-MS を用いて合成確認を行った。

得られた SP-COOH (52 μmol) と EDC (62.4 μmol)、HOAt (52 μmol) を 1.0 mL の DMF 中に溶かし、室温で 10 分間攪拌した。活性エステル化した SP-COOH を含む混合液に、0.5 mL DMF に溶かした N-(2-アミノエチル) マレイミド (52.0 μmol) を攪拌しながらゆっくり加えたら、室温で一晩、攪拌した。その後、反応液を 10 倍量の 50% (v/v) 酢酸エチル/DW で希釈し、分液して上澄み液を回収した。上澄み液は大判 TLC (展開液、メタノール：クロロホルム = 1 : 9) で展開して目的スポットを回収したら、メタノールで MASP を抽出した。抽出した MASP からエバポレーターで溶媒を除去し、残留物を DMF で再懸濁した。MASP と L-システインを 1 : 10 で混合し、一晩、室温で攪拌することで L-cys-MASP を合成した。L-cys-MASP は逆走クロマトグラフィーとフラッシュカラムで精製し、FAB-MS で合成確認を行った。

2.3.8 SP-APA、SP-ABA、SP-lisine の合成

Ispinesib アナログとして設計した SP-APA、SP-ABA、SP-lisine はそれぞれ SP-COOH-(NHS)-Ester を介した脱水縮合反応によって合成した。SP-COOH (78 μmol) と 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride (780 μmol)、N-Hydroxy Succinimid (780 μmol) を DMF 3mL に溶かし、室温で 3 時間攪拌した。合成産物はシリカゲル (ultra-pure Wakogel C-200) を充填したオープンカラムクロマトグラフィーにアプライし、展開溶媒 (80% chloroform, 20% methanol) で EDC、NHS を取り除いた。目的物を含む溶出液を回収してエバポレーターで溶媒を取り除いたら、残留物を DMF で再懸濁した。SP-COOH-(NHS)-ester (17.1 μmol) を溶解した 3.0 mL DMF と、DL-2,3-ジアミノプロピオン酸、(s)-(+)-2,4-ジアミノ酪酸、L-lysine のいずれかで溶解した 1.30 mL 50mM TEA-HCO₃ (pH7.5) を、1 : 3 のモル比で混合し、室温で 3 時間攪拌した。エバポレーターで溶媒を取り除き、残留物を 0.1M TEA-HCO₃ pH7.5 で溶解したら、逆相クロマトグラフィーとフラッシュカラムで精製した。

2.3.9 光異性化と光異性体の測定

フォトクロミック Eg5 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。フォトクロミック Eg5 阻害剤は各実験で用いる溶媒に希釈してから光異性化を行い、紫外光照射後のMC型を扱う際は全ての操作を暗室で実施した。プラスチック容器の場合、光源から 3~5cm 離れた位置から溶媒表面に対して光照射を行った。石英セルの場合、光源から 3~5cm 離れた位置から石英ガラス側面に対して光照射を行った。可逆的な光異性化の確認は、前述の照射条件で時間依存的に吸光スペクトルの変化を測定し、メロシアニン型スピロピランに特異的な 500 nm 付近の吸光度ピークから確認した。ATPase 活性及びモーター活性における光異性化は、キネシンと微小管を添加する前に、Eg5 ATPase buffer に任意の濃度で添加し、前述の照射条件で 5~10 分間、室温で行った。

2.3.10 ATPase 活性の測定

キネシンの ATPase 活性は、1 分子が 1 秒間に加水分解した ATP の分子数を示す ATP 加水分解速度 (Pi/mol/sec.) で示した。キネシンの ATPase 活性は微小管によって促進されるため、微小管依存性 ATPase 活性と微小管を含まない Basal ATPase 活性の 2 つのパラメーターを測定した。Eg5 の ATPase 活性は Eg5 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, 30 μ g/mL Bovine serum albumin) を使用した。Eg5 ATPase assay buffer に、フォトクロミック阻害剤を含む DMF を最終濃度 5.0% (v/v) になるように加え、2.3.7 で記した照射条件で光異性化を行った。微小管依存性 ATPase 活性の場合は 3.0 μ M 微小管、0.1 μ M Eg5 を加えて、Basal ATPase 活性の場合は 0.5 μ M Eg5 を加えて、5 分間室温で静置した。2.0 mM ATP を添加し、微小管依存性 ATPase 活性の場合は 5 分間、Basal ATPase 活性の場合は 2 分間、25°C で反応させた。ATPase 活性は、Eg5 ATPase assay buffer の 2 倍量の 10% TCA を加えて、氷冷に移して停止させた。その後、Eg5 ATPase assay buffer を 5 分間、15,000 rpm、4°C で遠心分離し、変性したタンパク質を沈殿させて ATPase 活性で生じたリン酸イオンを含む上澄み液を回収した。リン

酸イオン濃度の測定には Youngburg 法を用いた[72]。回収した上澄み液の 1/2 倍量の Youngburg 試薬を加えて 5 分間、30℃ 静置したら、young burg 試薬の 2 倍量の 0.32% (w/v) 塩化スズ溶液を加えて 10 分間、30℃ で呈色させた。呈色反応の吸光極大 750 nm を測定し、リン酸濃度標準曲線から ATPase 活性で発生したリン酸濃度を測定した。

2.3.11 モーター活性の測定（微小管滑り運動）

キネシンのモーター活性は、蛍光標識した微小管がフローセルに固定されたキネシンに沿って動く様子を観察する微小管滑り運動アッセイを用いて行った。ローダミン蛍光標識チューブリンおよび MAPs-free チューブリンの調製方法は 2.3.5 に示した。蛍光標識微小管は前述の MAPs-free チューブリンと Rhodamine 標識 MAPs-free チューブリンの混合物から調製した。同一濃度（1~2 mg/mL）に希釈した状態で、Rhodamine 標識チューブリンと MAPs-free チューブリンを 1 : 3 で混合し、1.0mM GTP を加えたら 37℃ で 40 分間、暗所で静置した。蛍光標識微小管懸濁液に、10 μ M タキソールを含む PEM buffer を加えて 250 μ g/mL に希釈したら、37℃ かつ暗所で保存した。

微小管滑り運動は Howard らの方法にしたがって行った[76]。コロジオン処理を施したカバーガラスを両面テープ（厚さ 0.03 mm）でスライドガラスに固定してフローセルを作成した。His-tag 融合キネシン Eg5 をフローセルに固定するために、200 nM 6 ヒスチジンモノクローナル抗体を含む Assay buffer A (10 mM Tris-acetate (pH7.5), 50 mM K-acetate, 2.5 mM EGTA, 4 mM MgSO₄) をフローセルにアプライし、室温で 2 分間静置したら、Assay buffer A で 2 回洗浄した。次に 600 nM Eg5 を含む Assay buffer B (10 mM Tris-acetate (pH7.5), 50 mM K-acetate, 2.5 mM EGTA, 4 mM MgSO₄, 0.05% β -mercaptoethanol) をフローセルにアプライし、室温で 2 分間静置したら、Assay buffer B で 2 回洗浄した。阻害剤及び微小管の非特異的結合を抑制するために、10 mg/mL Casein を含む Assay buffer B (10 mM Tris-acetate (pH7.5), 50 mM K-acetate, 2.5 mM EGTA, 4 mM MgSO₄, 0.05% β -mercaptoethanol) をフローセルにアプライし、室温で 2 分間静置したら、Assay buffer B で 2 回洗浄した。フォトクロミック Eg5 阻害剤を含む Assay buffer B は、2.3.7 で記した

照射条件で光異性化を行ってからフローセルにアプライし、室温で2分間静置した。光異性化を行ったフォトクロミック Eg5 阻害剤を含む Assay buffer B に 150 nM 蛍光標識微小管を加えたら、フローセルにアプライし、室温で2分間静置した。フォトクロミック Eg5 阻害剤を含む Assay buffer B に光照射を行って光異性化した後、1.0 mg/mL Glucose, 0.02 mg/mL Catalase, 0.1 mg/mL glucose oxidase を添加し、フローセルを1回洗浄した。最後に、フォトクロミック Eg5 阻害剤を含む Assay buffer B に光照射を行って光異性化した後、1.0 mg/mL Glucose, 0.02 mg/mL Catalase, 0.1 mg/mL glucose oxidase, 1.0 mM ATP を添加し、フローセルにアプライして室温で3分間静置した。静置後、マニキュアでフローセルをシーリング処理してから 3CCD カメラ JK-TU53H (東芝, Tokyo, JPN) を搭載した Olympus BX50 蛍光顕微鏡 (オリンパス, Tokyo, JPN) を用いて観察した。蛍光励起光は 530 nm を使用し、観察は室温で20分間行った。観察の様子は1フレーム/秒の動画、または30秒毎に1枚のタイムラプス撮影で記録した。記録データは NIH ImageJ を用いて、30秒毎の tiff. 形式の連続画像ファイルに変換後、”Manual tracking” を使用して各微小管の移動距離を測定した。微小管滑り運動速度は、測定した移動距離と観察時間から求めた平均速度で示し、速度分布を作成した。

2.4 結果と考察

2.4.1 IASP, MASP 由来 Eg5 フォトクロミック阻害剤による ATPase 活性の光制御

Eg5 阻害剤である Monastrol, STLC は、Eg5 と結合した状態での結晶構造解析を含め、阻害機構が明らかとなっている [51, 70]。STLC はトリチル基にシステインが結合した、比較的、簡素な化学構造をしている。石川らの先行研究では、STLC アナログとして、トリチル基とシステイン部位を両端に持つアゾベンゼン誘導体、ACTAB を合成した [20]。今回合成、設計したフォトクロミック Eg5 阻害剤である L-cys-IASP, N-Ac-IASP, L-cys-MASP は、いずれもフォトクロミック分子としてスピロピランを用いた。スピロピランはアゾベンゼン同様、フォトクロミック分子の 1 つであり、可視光または紫外光照射によって可逆的な構造変化を起こす。アゾベンゼンの光異性体は、*trans*-体と *cis*-体であるが、これはベンゼンの立体的配置が変化するのみである。一方、スピロピランは可視光条件下では疎水性の閉環構造である SP 型に、紫外光条件下では極性を持つ開環構造である MC 型に、可逆的に光異性化する。スピロピランはインドリンとベンゾピランがスピロ位で結合した化学構造を持っており、光異性化による開環はベンゾピランの C-O 結合部位で生じる。SP 型では、ベンゾピランとインドリン部位は、それぞれの平面に対して直角に位置するため、分子構造の動的状態は比較的安定している。しかしながら、MC 型の場合、ベンゾピランの解裂によって生じた炭素鎖を介して、インドリンとニトロベンゼンが結合したような構造に変化する。その結果、MC 型では分子の立体的な構造は平坦に変化する。さらに、インドリンの五員環状の窒素はプラスに、ニトロベンゼンはニトロ基とパラ位に付加された酸素によって、マイナスに、それぞれ極性を獲得する。このように、スピロピランは環状構造の変化で生じる立体的な変化と同時に、極性の有無まで変化する。したがって、アゾベンゼン由来 Eg5 阻害剤と比較した場合、スピロピラン由来 Eg5 阻害剤の光異性化は、より効果的であることが期待される。

スピロピランを Eg5 特異的な阻害剤にするために、疎水性トリチル基を SP 型スピロピランに置き換えて L-システインを結合させた STLC アナログを設計・合成した (図 2-1)。結晶構造解析の結果から、STLC のトリチル基は $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスと loop L5 から構成され

る阻害剤結合部位に対して、外側に位置しており、阻害剤結合の安定化に寄与している（図 2-2）[70]。SP 型スピロピランは STLC アナログとして阻害効果を発揮するが、MC 型スピロピランは極性を獲得することで、アフィニティの低下と阻害効果の減少が期待される。確立した方法にしたがい合成、精製したモノヨードスピロピラン（IASP）と L-システインを結合した Eg5 阻害剤、L-システイン-モノヨードスピロピラン（L-cys-IASP）について、光異性化が正常に起こるか、分光学的解析を行った。スピロピランは SP 型では淡く黄色がかった色をしているが、MC 型では赤紫色に変色し、500nm 付近に特異的な吸光度が生じることが知られている[77]。366nm の UV 光を照射した L-cys-IASP は、530nm 付近に MC 型特有の吸光度のピークが現れた。MC 型 L-cys-IASP に、卓上ランプを用いて可視光照射することで、530nm 付近の吸光度のピークは消失した。また、530nm 付近の吸光度ピークは光可逆的であることも示された。したがって、L-cys-IASP の光異性体は可逆的に制御できることが確認された。

Eg5 を含むキネシンのほとんどは、微小管存在下で ATPase 活性が促進されることが知られている。また、Eg5 は kinesin-1 などの他のキネシンを比較して、ATPase 活性が低いことも報告されている[43]。はじめに、微小管存在下条件で Eg5 ATPase 活性に対する L-cys-IASP の阻害効果を検証した（図 2-3A）。L-cys-IASP は Eg5 の ATPase 活性に対する阻害活性を示したが、設計時の期待とは逆に、SP 型よりも MC 型の方が高い阻害効果を示した。一方、微小管非存在下における Basal ATPase 活性では、L-cys-IASP の阻害効果は減少し、光異性体間の差も失われた（図 2-3B）。ATPase 活性評価の結果から、L-cys-IASP は Eg5 のフォトクロミック阻害剤として機能することは示されたが、光異性体間の阻害活性の差は見られなかった。また、L-cys-IASP は室温下において、自己分解することが TLC を用いた実験から確認され、その化学構造が不安定であることが判明した。これは L-cys-IASP のスルフィド結合が、システインのカルボキシル基との間で反応することで、分解が起きていると推測される。

L-cys-IASP が構造的に不安定であることから、L-システインの代替として N-アセチル-

L-システインを導入したスピロピラン誘導体、N-アセチルL-システイン-IASP (N-Ac-L-cys-IASP) を設計、合成した。N-Ac-L-cys-IASP も、L-cys-IASP 同様、可視光と 366nm または紫外光照射によって可逆的に光異性化することを、吸光スペクトル変化の測定を用いた分光学的解析で示された。L-システインの代わりに N-アセチル-L-システインを導入したことで、自己分解は抑制されたが、Eg5 ATPase 活性の阻害効果は減少した (図 2-4A)。光異性体間での阻害効果の差についても、L-cys-IASP と比較して大きな差は見られなかった。Basal Eg5 ATPase 活性評価に関しても、微小管存在下における Eg5 ATPase 活性の結果と同様の傾向を示した (図 2-4B)。

付加したアミノ酸について、L-システインの方が N-アセチル-システインよりも、Eg5 に対して高い親和性と阻害効果を持つことは確認された。L-cys-IASP はスピロピランと L-システインの結合に際してチオール基反応性のヨード基を利用した。しかしながら、L-cys-IASP は自己触媒作用により不安定である。自己触媒作用を除外し、かつ L-システインを利用するため、チオール基反応性のマレイミドを付加したマレイミドスピロピラン (Maleimide spiropyran, 以下 MASP) を合成した。MASP の合成は、SP-COOH を出発物質として全ての工程で既存の合成方法を採用した。MASP に L-cystein を付加して L-cys-MASP を合成した (図 2-5)。L-cys-MASP は石川らが合成、確立したフォトクロミック Eg5 阻害剤; ACTAB と類似した構造を持つように設計している。L-cys-MASP の化学構造は IASP 由来のものと比較して長大であるが、ACTAB も同様である。ACTAB はアゾベンゼンの両端にトリチル基とシステイン基を持つが、L-cys-MASP はトリチル基の代替としてのスピロピラン部位とシステイン基を化合物の両端に配位している。ACTAB がアゾベンゼンの光異性化に伴う trans-cis 体の立体配座の可逆的変化を利用するのに対して、L-cys-MASP はスピロピランの SP-MC 型光異性化による構造と極性の可逆的変化を利用して、Eg5 活性を阻害することを期待した (図 2-6)。

L-cys-MASP も、L-cys-IASP 同様、吸光スペクトル変化の測定を用いて可視光または 366nm 紫外光照射によって可逆的に光異性化することを確認した。L-cys-MASP を用いた微小管依

存性 Eg5 ATPase 活性の光可逆的制御の結果を図 2-7A に示した。L-cys-MASP は、IASP 由来の 2 種類はもちろん、合成の参考とした ACTAB も含めて非常に高い阻害効果を示した。光異性体の半数阻害濃度 (IC_{50}) を比較すると、SP 型で 670nM、MC 型で 350nM であった。この数値は、既存の Eg5 阻害剤である Monastrol ($IC_{50}=6.0 \mu M$) よりも高く、STLC ($IC_{50}=0.6 \mu M$) に匹敵する。ACTAB の IC_{50} が trans 型で $5.2 \mu M$ 、cis 型では $9.1 \mu M$ であることから、L-cys-MASP がフォトクロミック Eg5 阻害剤としても優れていることが分かる。しかしながら、光異性体間での阻害効果の差は小さかった。興味深いことに、L-cys-MASP の阻害効果は、微小管存在下でしか見受けられなかった。図 2-7B は微小管非存在下、Basal Eg5 ATPase 活性における L-cys-MASP の濃度依存的な阻害効果を検証した結果である。阻害曲線が示すように、光異性体に関わらず、ほとんど Eg5 ATPase 活性を阻害していないことが分かる。IASP 由来のフォトクロミック Eg5 阻害剤についても、微小管非存在下では有意な阻害活性は見られなかった。一般的に、キネシンを含むモータータンパク質のアロステリックな構造変化と、ATP 分解サイクルは連動していることは知られている[4]。その際、微小管は単にレールとしての役割以外に、キネシンの ATP 分解サイクルに対する一種の触媒としても機能する。したがって、スピロピラン誘導体由来の阻害剤は、微小管と Eg5 の相互作用を抑制することが推測される。

L-cys-MASP が実際に、微小管上での Eg5 の運動を光可逆的に阻害するか、微小管滑り運動活性評価法を用いて検証した。フローセル表面に固定された Eg5 は、蛍光標識した微小管と結合し、モーター活性によって微小管を動かす。したがって、微小管滑り運動速度はモーター活性の大きさに比例する。図 2-8A は L-cys-MASP を加えていない状態での微小管滑り運動速度の分布を示した。従来型キネシンの速度が 88 nm/s (Kinesin-1, monomer) であるのに対し、非常に遅い (Eg5 motor domain, 20 nm/s) ことが報告されている[43]。また、既知の Eg5 阻害剤として 100 μM STLC を添加した場合、Eg5 はほとんど動かなくなった (図 2-8B)。L-cys-MASP を添加した場合の微小管滑り運動速度分布は SP 型、MC 型ともに広がったが、有意な阻害は認められなかった (図 2-8C、D)。しかしながら、L-cys-MASP 存在下では、微小管が時間依存的に剥離していく様子が観察された。微小管の剥離は、

コントロール条件および STLC 存在下では全く観察されなかった。微小管滑り運動において、結合・運動状態にある微小管の比率を、時間依存的に測定した結果を図 2-9 に示した。滑り運動活性の開始から 5 分間は、ほとんどの微小管が Eg5 と結合していたが、最終的に SP 型で約 20%、MC 型では約 60%の微小管が剥離していた。MC 型での微小管の解離については、蛍光色素の励起光照射 (530nm) によって一部が SP 型に光異性化していることが考慮された。しかし、励起光による SP 型への光異性化を考慮したとしても、MC 型での微小管の解離は有意に発生していると推測された。100 μ M STLC はコントロール同様、Eg5 と微小管の相互作用は正常であった。ATPase 活性において L-cys-MASP が微小管存在下でしか阻害効果を発揮しなかった点からも、L-cys-MASP は Eg5 と微小管の相互作用を阻害していることが示唆された。

2.4.2 SP-COOH-NHS-Ester 由来 Eg5 フォトクロミック阻害剤による

ATPase 活性の光制御

STLC アナログとして設計したスピロピラン由来 Eg5 阻害剤は、Eg5 ATPase 活性、モーター活性の阻害に関して狙いとは大きく異なる結果となった。L-cys-IASP は ATPase 活性の光可逆的な制御に有用であると示されたが、自己触媒作用によって分解する、極めて不安定な構造を持つ。L-cys-MASP は微小管依存性 Eg5 ATPase 活性において、STLC に匹敵する高いアフィニティと光可逆的な阻害活性を示した。しかしながら、Basal Eg5 ATPase 活性に対する阻害活性はほとんど見られず、またモーター活性に対する阻害効果も得られなかった。L-cys-MASP の標的部位は Eg5 と微小管の相互作用部位または結合部位と考えられた。これまでに報告されている Eg5 阻害剤の構造は、その類似性が乏しいにも関わらず、ほとんどが $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ ヘリックスと loop L5 で構成された STLC 結合部位に結合する。それらの阻害剤の中には、L-システインを持たないものも多く存在する。このことは、L-システインが Eg5 阻害剤に必須ではないことを意味する。STLC 以外の Eg5 阻害剤のうち、我々は ispinesib の構造に注目した (図 2-10)。Ispinesib は STLC, monastrol らと並んで、比

較的、阻害機構の解析や in vivo への応用が進んだ Eg5 阻害剤である [78]。Eg5-ispinesib 結晶構造解析などから、STLC と結合部位を共有し、4-キナゾリノン部位を含むベンゼン類、イソプロピル基が Eg5 との間に強力な疎水性結合を形成することが報告されている。また、ispinesib に点在するカルボキシル酸素や、長く伸びたアミノプロピルは、結合部位周辺のアミノ酸と塩橋を形成し、ATPase 活性の阻害効果を促進すると考えられている [55]。スピロピランはインドリン部位やプロピル基に近い構造を元々持っており、ispinesib 同様に Eg5 に結合可能であると推測された。一方で、スピロピランはカルボキシル酸素やアミノプロピルなどの ATPase 活性の阻害効果を付与するような構造を持たない。スピロピランに ispinesib と同等レベルの阻害活性を与えるために、我々はアミノプロピオン酸を付与したフォトクロミック Eg5 阻害剤、SP-APA, SP-ABA, SP-lisine を新たに設計、合成した (図 2-10、2-11)。これらの阻害剤はそれぞれ、カルボキシル基とアミノ基の間の炭素数が異なり、それによる阻害効果の差を検証した。合成は全て、確立した方法にしたがっており、アミド結合のための活性中間体状態にある SP-COOH-NHS-Ester に異なるアミノプロピオン酸を付加した。新たに合成したフォトクロミック Eg5 阻害剤も、全て L-cys-IASP 同様、可視光と 366nm または紫外光照射によって可逆的に光異性化することを確認した。

Ispinesib アナログとして合成した SP-APA, SP-ABA, SP-lisine は、共通した特徴として、ペプチド結合した炭素がカルボニル基を、またスピロピランから離れた位置にカルボン酸を持つ。アミノプロピル基について、炭素数が 2、3、4 個と異なるが、ispinesib と同数の炭素を持つのが SP-ABA である。したがって、SP-ABA で最も ispinesib に近い構造を持ったフォトクロミック ispinesib アナログとなる。SP-ABA を基準として、炭素数が 1 個少ないものが SP-APA、1 個多いのが SP-lisine となる。アミノプロピル基は Eg5-ispinesib 複合体の形成において、結合部位の外側に位置し、結合には重要でないと考えられているが、ATPase サイクルにともなうアロステリックな構造変化の阻害に寄与していると推測されている。そのため、ispinesib アナログとして機能しているかどうか確認するために、炭素数を変更した。

合成した阻害剤について、微小管依存性 Eg5 ATPase 活性を用いて各阻害剤の光制御を検討した (図 2-12)。SP-APA と SP-lisine はそれぞれ、Eg5 に対する有意な阻害活性を確認できなかった (図 2-12A、C)。また、光異性体間での有意な差も認められなかった。SP-ABA も同様、Eg5 に対する阻害活性は低かった (図 2-12B)。しかしながら、5.0 - 10.0 μ M の濃度範囲では、阻害活性が光制御されていた。興味深いことに、STLC アナログとして設計した L-cys-MASP, L-cys-MASP が MC 型において高い阻害活性を示したにも関わらず、SP-ABA では SP 型の方が高い阻害活性を示した。Ispinesib の IC_{50} が nM オーダーであることから、フォトクロミック ispinesib アナログとしての目的は果たすことはできなかった。

2.5 第2章のまとめ

第2章では、単一のスピロピランから既存の Eg5 阻害剤である STLC、ispinesib フォトクロミックアナログを合成/設計した。これらの阻害剤はスピロピランの極性と構造変化による光制御を狙って設計した。STLC アナログである L-cys-IASP は比較的、阻害活性と光制御に有意な結果を得られたが、室温下でも自己触媒作用による分解が起きる不安定な構造であった。L-cys-MASP は極めて高い阻害活性とその光制御に成功したが、微小管と Eg5 の結合部位を標的としていた。特に、Basal ATPase 活性にほとんど無効であったことから、キネシンと微小管の結合阻害剤であることと推測された。STLC アナログに代えて、ispinesib アナログとして SP-APA, SP-ABA, SP-lisine の異なる長さのアミノプロピルを持つフォトクロミック阻害剤を合成した。SP-ABA で最も阻害活性と光制御の差異が認められたが、Eg5 に対するアフィニティは非常に低かった。

付図・付表

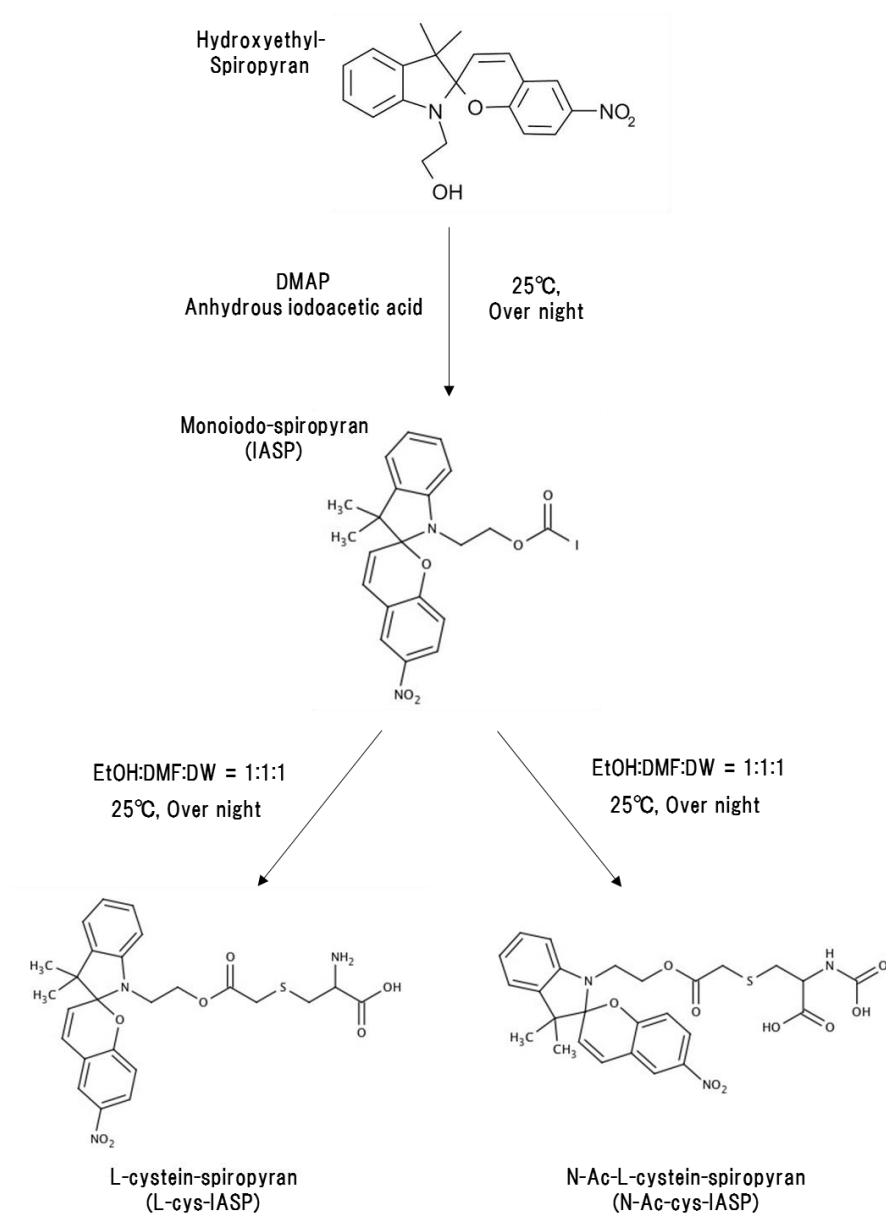
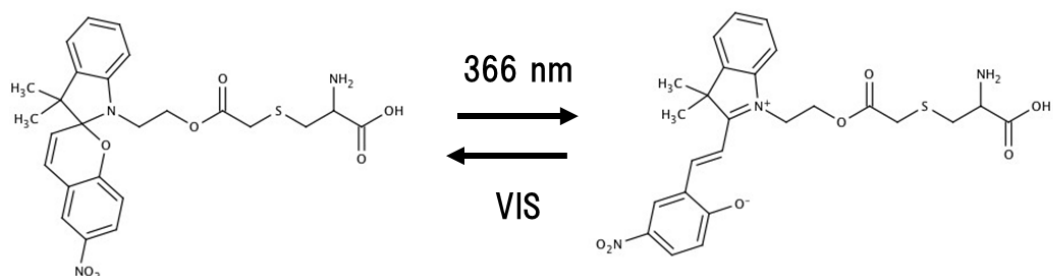


図 2-1 スピロピラン由来フォトクロミック Eg5 阻害剤; L-cys-IASP と N-Ac-cys-IASP の合成。IASP の合成は Ishikawa (2014) [20] と同様の方法で行った。方法については第 2 章 2.3.6 に詳細を記述した。

A.



B.

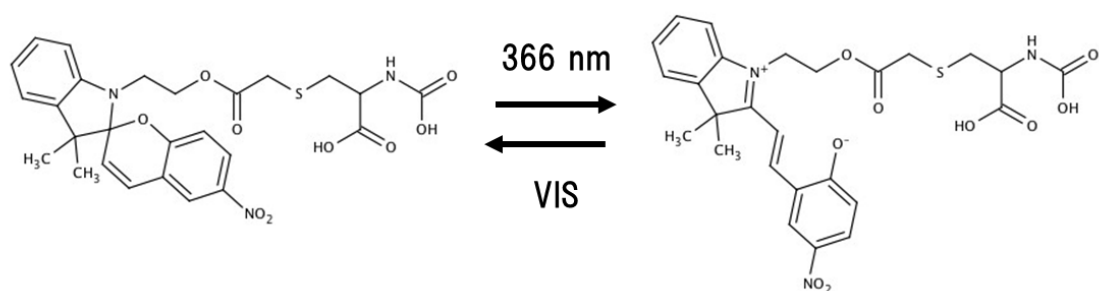


図 2-2 L-cys-IASP と N-Ac-cys-IASP の光異性体。

それぞれ、可視光照射（VIS）によってスピロ型（SP型）、366 nm 紫外光照射によってメロシアニン型（MC型）へ光異性化する。（A）L-cys-IASP の光異性体。（B）N-Ac-cys-IASP の光異性体。

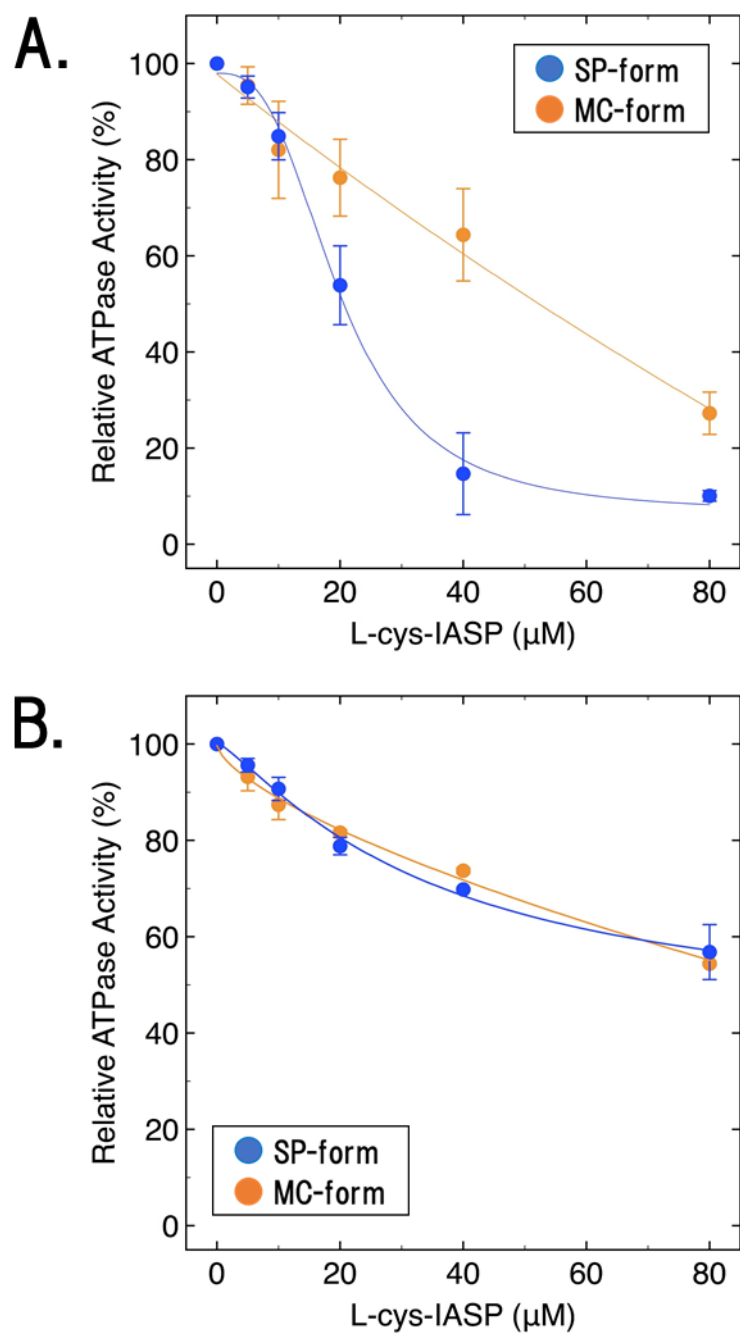


図2-3 L-cys-IASPによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は第2章 2.3.10に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。(A) L-cys-IASP 光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(B) L-cys-IASP光異性体のBasal Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

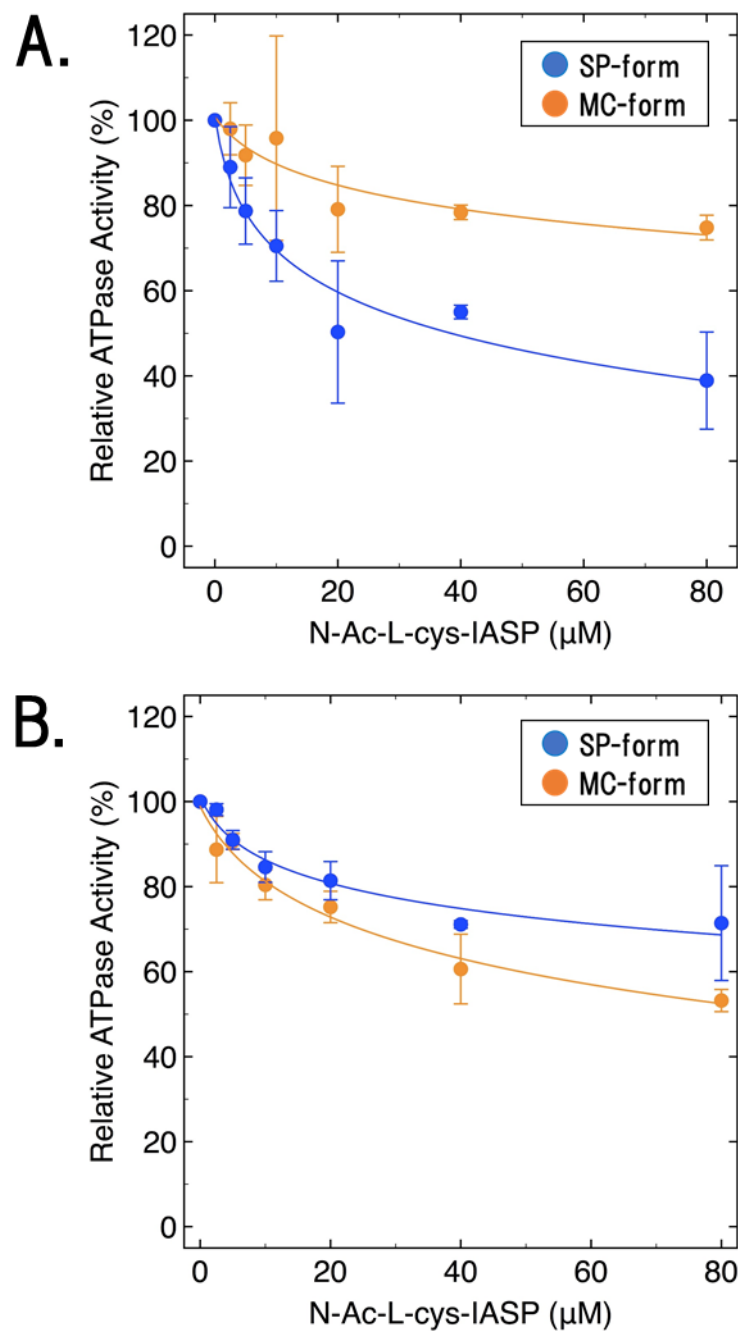


図2-4 N-Ac-cys-IASPによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は第2章 2.3.10に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。(A) N-Ac-L-cys-IASP光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(B) N-Ac-L-cys-IASP光異性体のBasal Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

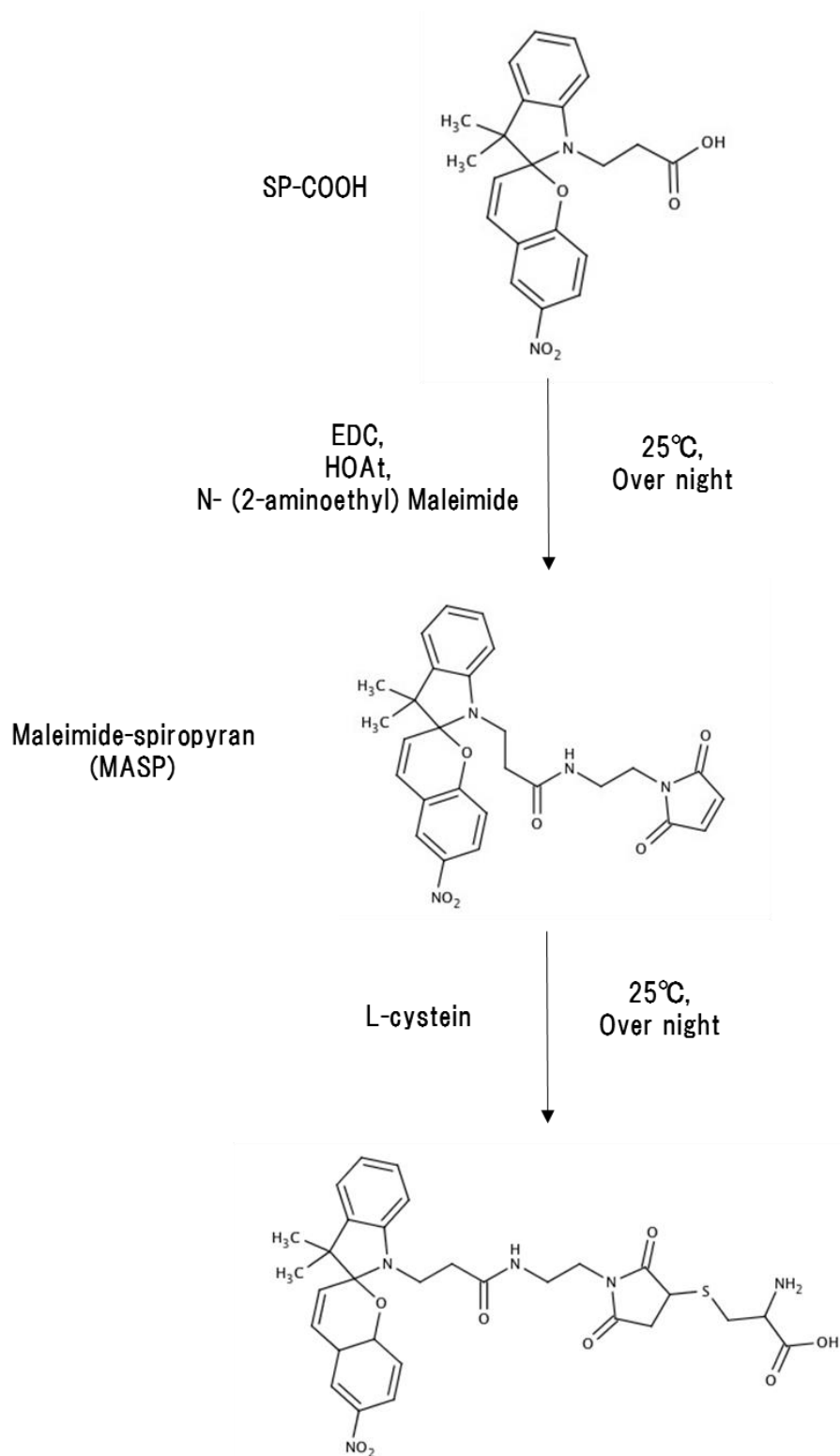


図2-5 L-cys-MASPの合成。

SP-COOHの合成はChen J [74]の方法にしたがって行った。合成の詳細については第2章2.3.7に記した。

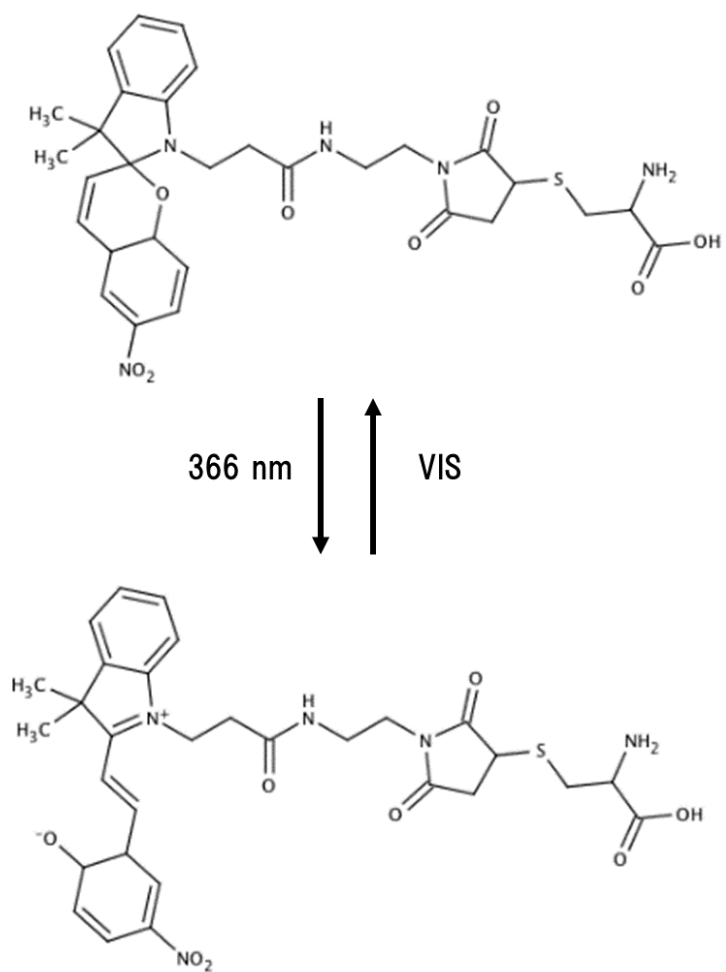


図2-6 L-cys-MASPの光異性化。

可視光照射（V I S）によってスピロ型（S P型）、366 nm 紫外光照射によってメロシアニン型（M C型）へ光異性化する。

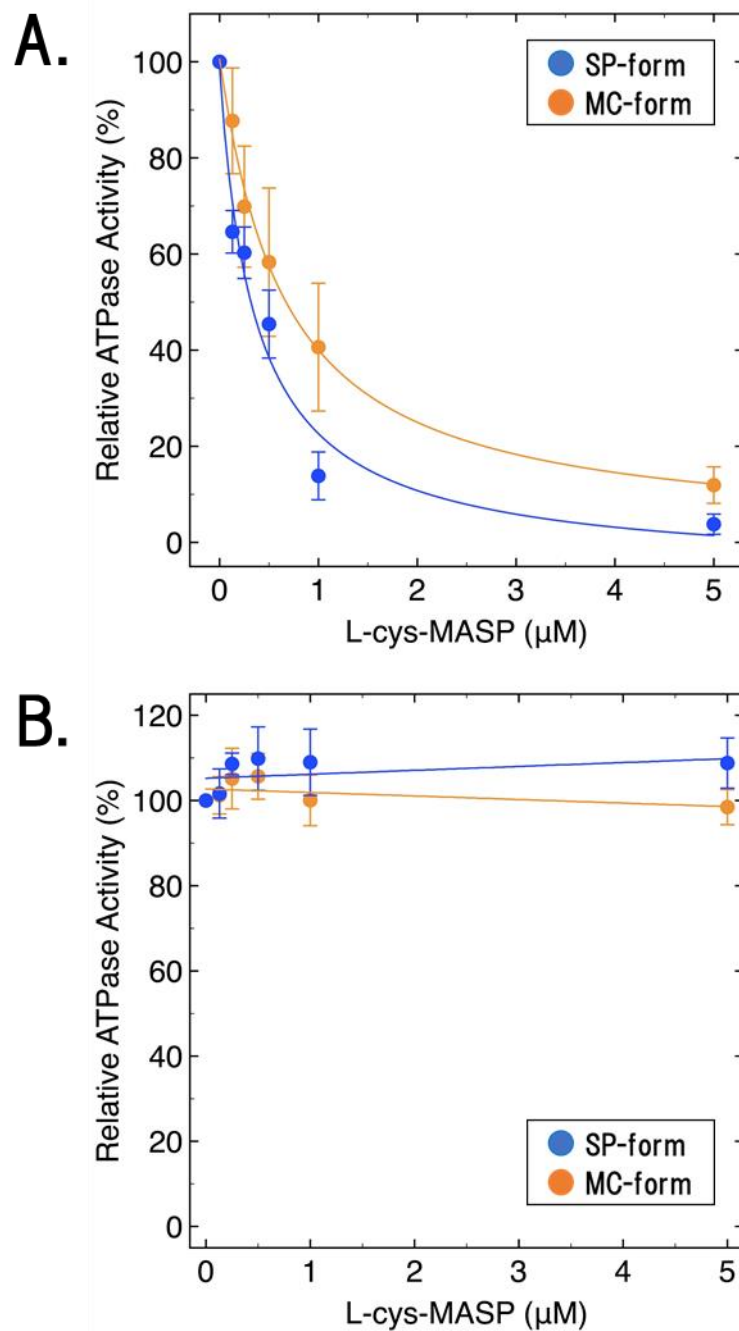


図2-7 L-cys-MASPによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は2.3.10に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。(A) L-cys-MASP光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(B) L-cys-MASP光異性体の Basal Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

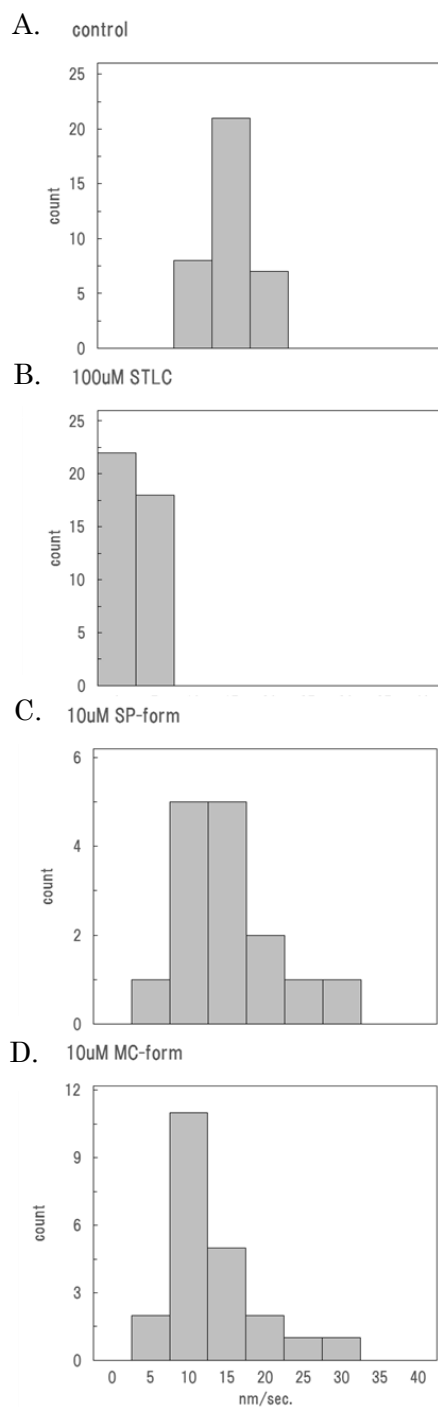


図2-8 L-cys-MASPによるEg5モーター活性の光制御。

モーター活性は微小管速度の分布から測定した。横軸は微小管の滑り運動速度 (nm/s) を示す。(A) 5.0% DMF、(B) 100 μ M STLC、(C) 10 μ M SP-L-cys-MASP、(D) 10 μ M MC-L-cys-MASP存在下における個々の微小管滑り運動速度を度数分布にした。

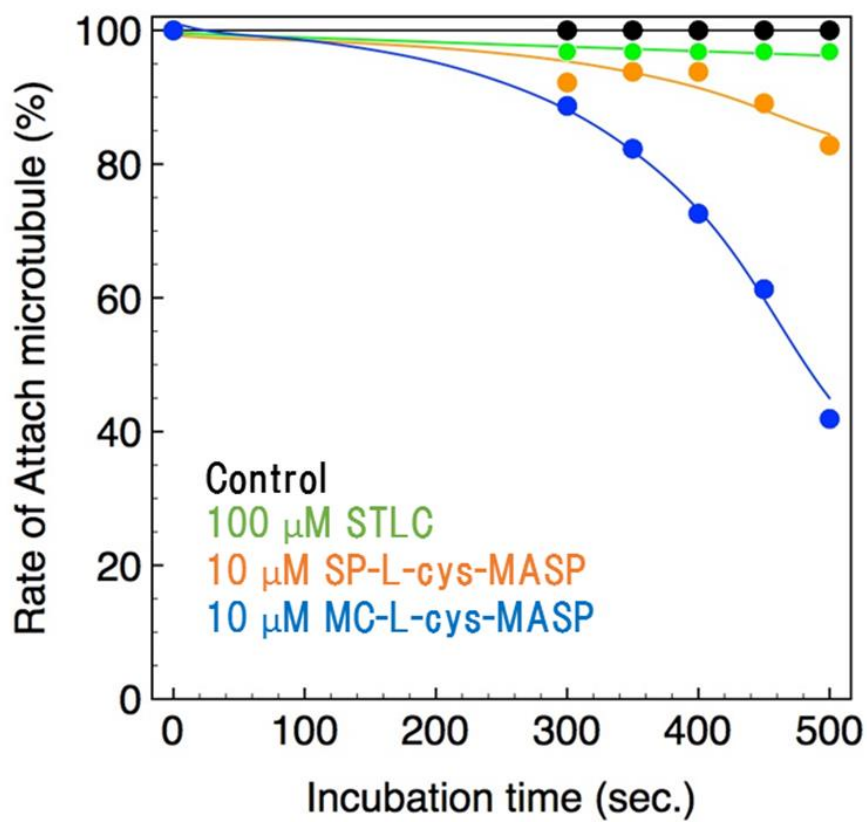


図2-9 L-cys-MASPによるEg5-微小管相互作用の光制御。

微小管滑り運動アッセイで測定した微小管について、測定開始時の個数を100%とした。

コントロールは5.0% DMFを含む条件である。

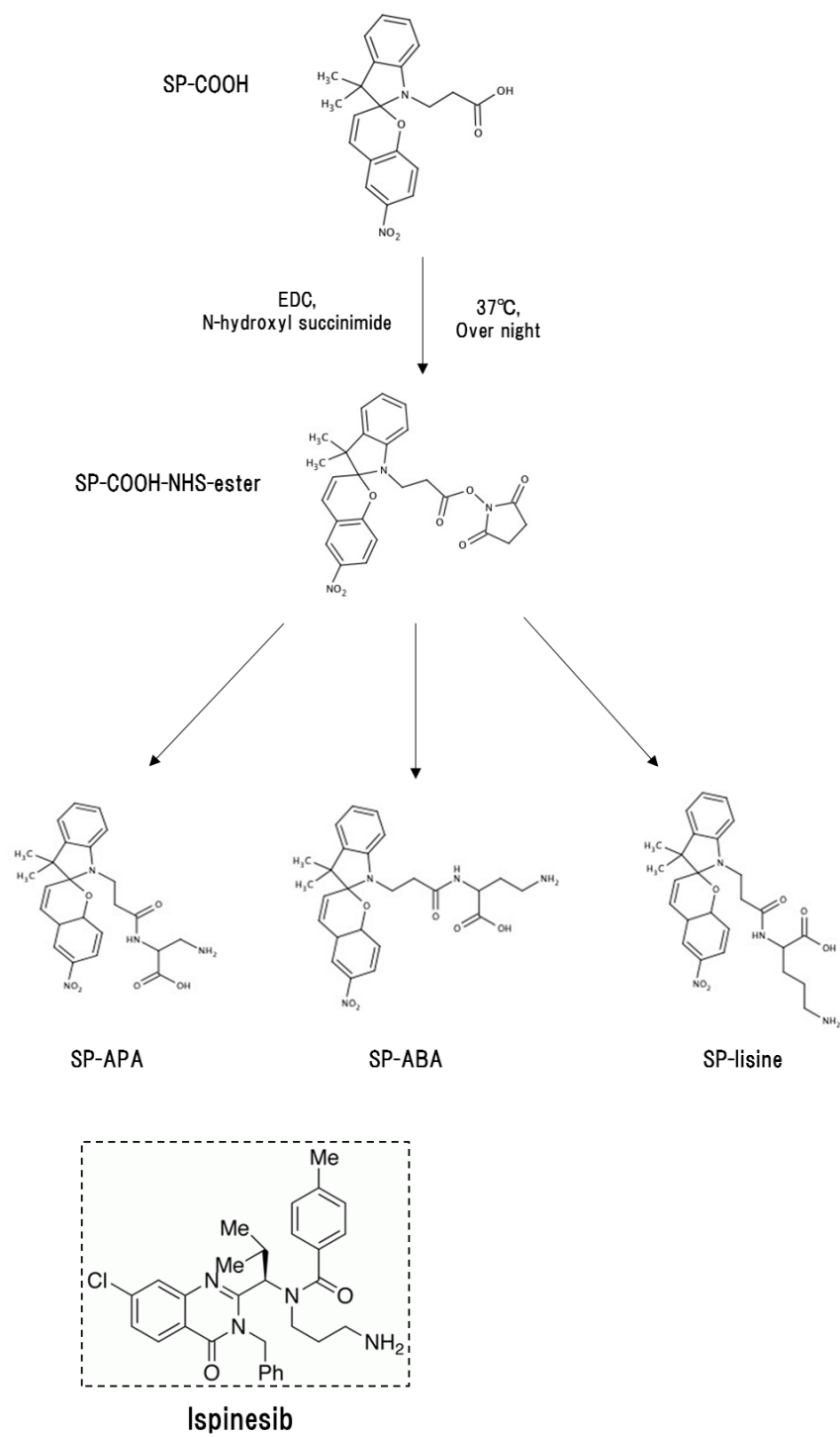


図2-10 フォトクロミックEg5阻害剤;SP-APA, SP-ABA, SP-lisineの合成。

SP-COOHの合成はChen J[74]の方法にしたがって行った。合成の詳細については第2章2.3.9に記した。

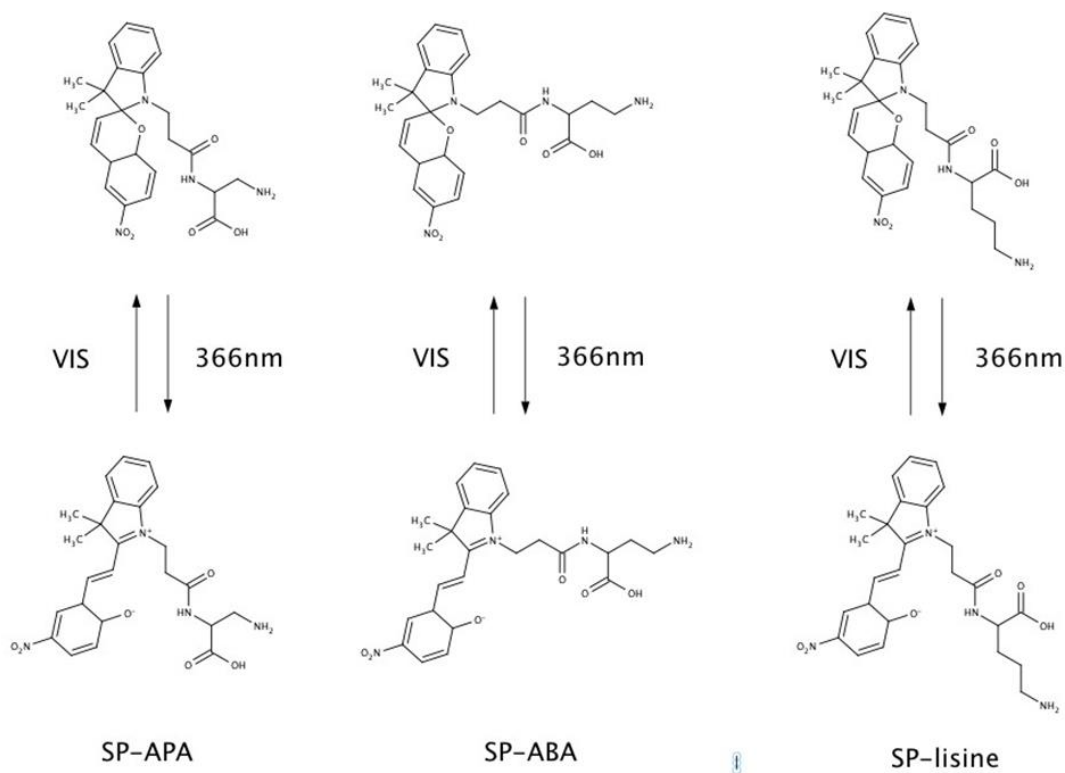
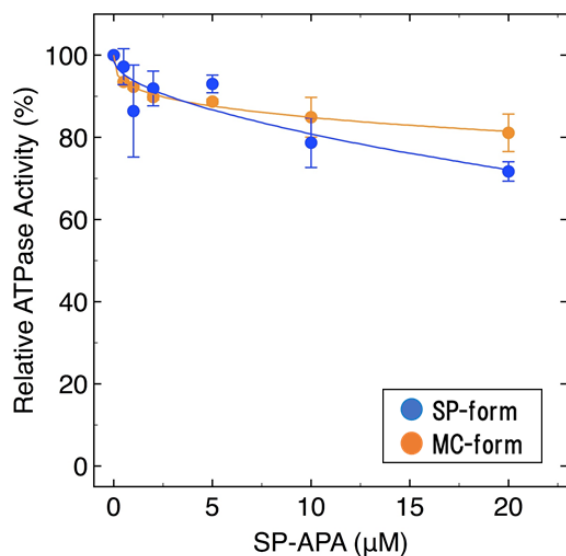


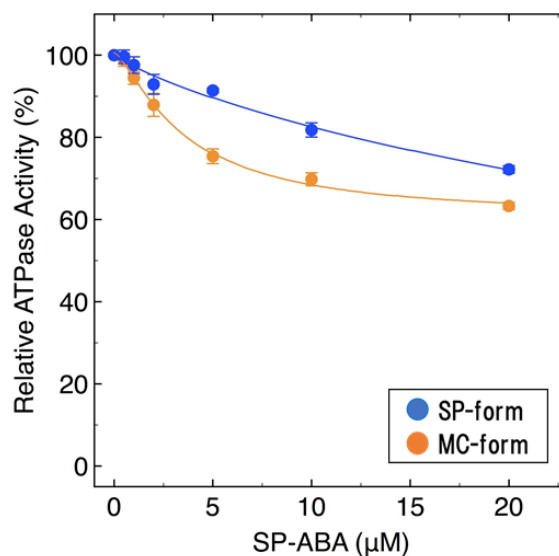
図2-11 SP-APA, SP-ABA, SP-lisineの光異性体の化学構造式。

それぞれ、可視光照射（VIS）によってスピロ型（SP型）、366 nm 紫外光照射によってメロシアニン型（MC型）へ光異性化する。(A) SP-APA の光異性体。(B) SP-ABA の光異性体。(C) SP-lisine の光異性体。

A. SP-APA



B. SP-ABA



C. SP-Lisine

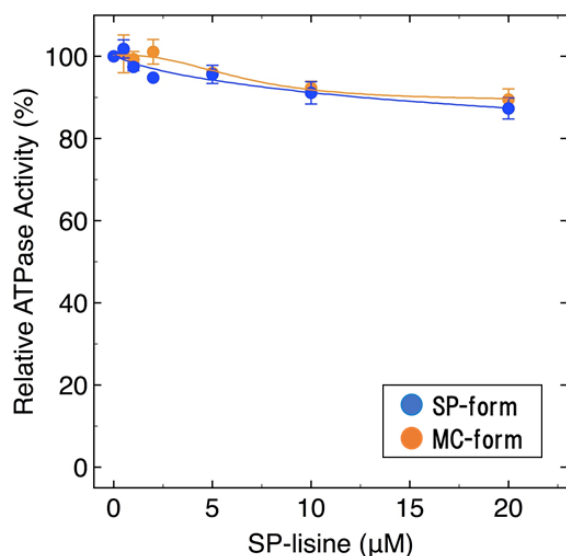


図2-12 SP-APA, SP-ABA, SP-lisineによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は2. 3. 10に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S. D) を示す。(A) SP-APA光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(B) SP-ABA光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(C) SP-lisine光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

第3章

2つのフォトクロミック分子を持つ
新規阻害剤による Eg5 活性の光制御

3.1 本章の要旨

第3章は、フोटクロミック Eg5 阻害剤の光制御の効率を向上するために、スピロピランまたはアゾベンゼンを2つ導入した新規阻害剤の設計と合成、そして Eg5 活性の光制御を行った。第2章でも述べたように、フोटクロミック Eg5 阻害剤による光異性体間の阻害活性の差を大きくするためには、光異性体間の化学構造と分子的特徴の大きな変化が必要である（第2章 2.2 緒言を参照）。

第2章のスピロピラン Eg5 誘導体は、STLC アナログまたは ispinesib アナログとして合成したが、全てフोटクロミック分子の導入個数は1つである。アゾベンゼンと比較して、分子構造と極性の2つのパラメーターが光異性化によって変化するスピロピラン由来の阻害剤は、しかし有意な光異性体間における阻害活性の光制御効率の向上は認められなかった。その原因としては以下の2点が考えられる。(1) スピロピラン単体での構造及び極性変化が期待したほど大きくなかった、(2) 多くの Eg5 阻害剤は複数の芳香族を持つが、スピロピラン単体ではその数が不足していた。すなわち、1つのフोटクロミック分子では、その種類や構造を変えたところで、Eg5 活性の光スイッチとして阻害活性の ON/OFF を可能とする光制御効率の向上は困難であることが示唆された。そこで、本章ではスピロピランやアゾベンゼンを複数導入することで光異性体間の構造と分子的特徴が、単体のときと比較して劇的に変化することに注目し、2つのフोटクロミック分子を持つフोटクロミック Eg5 阻害剤を設計、合成した。

はじめに、2つのスピロピランを導入した新規フोटクロミック Eg5 阻害剤；DSPPA を設計、合成した。DSPPA は構造中心に親水性の官能基が集中し、その両端に極性が光可逆的に変化するスピロピランを付与した。DSPPA は Eg5 ATPase 活性に対して、Monastrol に匹敵する十分な阻害活性を、微小管依存性及び Basal 条件の双方で確認できた。さらに、DSPPA 光異性体は、SP 型でより高い阻害活性を示し、MC 型では減少した。Eg5 ATPase 活性の阻害効果を検証した結果では、SP 型がMC型よりも高い阻害活性を示した。また、S P型と

MC型の阻害活性にも大きな差が見られ、光制御の効率も向上した。一方で、阻害曲線はSTLCなどとは異なるS字型を示し、DSPPAはEg5に対してアフィニティが異なる結合部位を、少なくとも2か所持つことが示唆された。モーター活性の阻害効果に関しては、微小管滑り運動速度の分布から、ATPase活性の結果と同様に、DSPPAの光可逆的な阻害効果が確認された。しかしながら、モーター活性の阻害以外に、DSPPAは微小管とEg5の相互作用にも作用した。DSPPAが微小管とEg5の結合を阻害したことは、微小管濃度依存的ATPase活性の結果からも明らかであった。したがって、DSPPAはATPase活性、モーター活性の阻害の他に、微小管との結合に影響するSTLCなどとは異なる阻害機構を獲得したと推測された。

2つのフォトクロミック分子を導入することが、Eg5活性の光制御に効果的であることが証明された。そこで、石川らが確立したアゾベンゼン誘導体フォトクロミックEg5阻害剤; ACTABに代わる新しいアゾベンゼンEg5阻害剤の設計と合成、検証実験を行った。アゾベンゼンの構造が既知のEg5阻害剤であるGSK-1やPVZB1194と類似していると仮定し、DSPPA同様、構造中心に親水性の官能基が集中し、その両端にアゾベンゼンが付与されたフォトクロミックEg5阻害剤BDPSBを合成した。BDPSBのアフィニティはDSPPAと比較して10倍以上低かったが、ATPase活性の光制御に関してほぼ完全な光スイッチとして機能した。Trans-BDPSBは微小管依存性ATPase活性に対して、半数阻害濃度が80 μM 前後となったが、cis-BDPSBではほとんど阻害活性が見られなかった。BDPSBの光可逆性を検証した結果、100 μM BDPSBは微小管依存性ATPase活性について、「オン」「オフ」の光制御に成功した。一方で、BDPSBは、DSPPA同様、微小管依存性ATPase活性の阻害曲線はS字型となった。興味深いことに、Basal ATPase活性については、trans-BDPSBは0~100 μM の範囲で促進した。Cis-BDPSBも、trans-BDPSBと比較して緩やかであるが、同様の効果が確認された。Trans-BDPSBは、100~150 μM の範囲では微小管依存性ATPase活性と同様に、阻害効果を示した。これらのATPase活性の結果から、Eg5活性に対して阻害か促進の効果が異なる2つの結合部位が存在することが強く示唆された。モーター活性の評価を行った結果、cis-BDPSBはコントロールとほとんど大差がなく、阻害していないことが明らかとなった。

その一方、trans-BDPSB ではモーター活性の有意な阻害と同時に、著しい微小管の減少が見られた。微小管は通常、フローセルに固定した Eg5 と結合するが、trans-BDPSB はこの結合を阻害したことが示された。BDPSB の 2 つ存在すると予想される Eg5 標的部位は、ATPase 活性に影響する部位と、微小管との結合部位の 2 か所であることが強く示唆された。BDPSB の特異性に関して、Eg5 と kinesin-1 を比較した結果、Eg5 と比較して有意な差はあるが、kinesin-1 に対する阻害効果が認められた。

結論として、フォトクロミック分子を 2 つ導入した Eg5 阻害剤は、フォトクロミック分子の種類を問わず、Eg5 活性の光制御に成功した。DSPPA は第 2 章で記したスピロピラン単体の阻害剤と比べ、高い阻害効果と効率的な光制御を可能とした。特に、BDPSB は完全な Eg5 活性の ON/OFF のような光スイッチに成功した。一方で、Eg5 に対するアフィニティは低下したため、光スイッチ機構と強い阻害活性を両立するために、構造を改良する必要性は生じた。

3.2 緒言

阻害剤として利用するスピロピランについても、他のフォトクロミック分子とは異なる特徴が、構造と極性の可逆的な変化以外にも存在する。逆フォトクロミズムはその1つである。逆フォトクロミズムは、光エネルギーを完全に遮断した状況で熱によって誘導されるMC型への変化である[79]。これは、スピロピランの π - π 二重結合の電子の移動によって引き起こされると考えられており、極性溶媒または低いpH条件下でMC型へとゆっくり変化する。また、MC型は一定の酸性溶媒にてMCH型へと不可逆的な変化を起こすことも知られている[71]。さらに、MC型スピロピランの対イオン同士でダイマー化するなど、制御できれば非常に有益な特徴を多数持つ。しかしながら、期待したような劇的な構造と極性の変化は生じていないことが、第2章の各阻害剤の結果から示唆された。したがって、フォトクロミックEg5阻害剤の光異性体間の阻害活性の差を大きくする（阻害活性の光制御効率）ための、化学構造と分子的特徴の大きな変化を別の方法で誘導する必要がある（第2章2.2 緒言を参照）。

はじめに、Eg5阻害剤の構造について再検証を行った。Eg5阻害剤は、抗がん剤として極めて有用であることから、STLC、Monastrolやispinesib以外にも多種多様な化合物が候補として報告されている[80]。特に、in silicoスクリーニングの向上によって、STLCとは異なる阻害機構を持つ化合物なども報告された。GSK-1やPVZB1194は、ヌクレオチド結合部位の裏側にある $\alpha 4$, $\alpha 6$ ヘリックスで構成された結合部位を標的とし、ATPase活性の他、微小管との結合にも影響していると考えられている[57, 81]。これらの阻害剤は、ベンゼン環が2個連結した構造を基本とし、付随する官能基によって阻害活性に違いが生じている。また、BI8やCW069など一部の阻害剤は、第2章で合成したL-cys-MASPに匹敵するような、比較的、大きな分子構造をもっている。これらのEg5阻害剤の多様性は、全て共通の結合部位を標的にしていると考えられている。

第2章で合成した阻害剤の設計思想は、分子構造の片側を親水性、もう一方を疎水性とする構造を骨格とした。これは、STLCやMonastrolなどの比較的、初期に発見されたEg5阻害剤の構造の基本を参考にしたためである。しかしながら、前述したとおり、ispinesib

や GSK-1 などの新たに報告された Eg5 阻害剤の構造は、必ずしも STLC や Monastrol を模倣しているとは言えない。Ispinesib、BI8 などの阻害剤の構造に注目すると、構造中心に親水性の官能基が集中しており、それを囲うように疎水性の部位が配位されている（図 3-1 A、B）。BI8-Eg5 複合体の結晶構造解析からは、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスで構成された結合部位に対して、疎水性部位が結合を支持し、点在する親水性の官能基がアミノ酸残基と相互作用を起こしていた（図 3-1 C）。Ispinesib の $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスと loop L5 で構成された標的部位に対する結合機構も、同じように考えられている（図 3-1 D）。

したがって、Eg5 阻害剤の構造を設計する上で、L-システインや、親水性と疎水性部位を明確に分ける必要性はないと推測された。むしろ、疎水性の強いベンゼン環などを構造全体に配位することが、安定した結合には不可欠であるとも考えられた。阻害機構に関して、ATPase 活性に不可欠な、阻害剤が静電的相互作用すべきアミノ酸残基は限られている。STLC の結晶構造解析では、カルボン酸が Arg221 と、アミノ基が Gly117 及び Glu116 と相互作用していた。実際に機能しているのは L-システインではない。阻害機構に関しては、構造レベルでは未だ不明瞭な部分が多いが、阻害剤の結合によって Eg5 のアロステリック変化が阻害され、ATPase サイクルにともなう Eg5 の構造変化に異常を起こす。Eg5 阻害剤の結合ポケットは、アロステリックな変化において、大きな動きが見られる構造に位置していることから、強固に結合することと少なからず周辺のアミノ酸残基と相互作用を起こすことが重要である。

第 2 章のスピロピラン Eg5 誘導体は、全てフォトクロミック分子の導入個数は 1 つである。また、フォトクロミック分子は分子構造と極性の 2 つのパラメーターが光異性化によって変化するスピロピランを使用した。しかし、光異性体間における阻害活性の光制御効率の向上は認められなかった。その原因としては、（1）スピロピラン単体での構造及び極性変化が期待したほど大きくなかった、（2）多くの Eg5 阻害剤は複数の芳香族を持つが、スピロピラン単体ではその数が不足していた。特に、新たなフォトクロミック Eg5 阻害剤を設計する上で（1）に注目した。1 つのフォトクロミック分子では、Eg5 活性の光スイッチとして阻害活性の ON/OFF を可能とするほどの、光異性体間での劇的な構造変化は生じな

いことは、第2章の結果から推測された。一方で、フォトクロミック分子を複数導入することで光異性体間の構造と分子的特徴が、単体のときと比較して劇的に変化することが報告されている。図3-2に示したように、Steinwan Sらはアゾベンゼンをオリゴマー化することで、光異性体間で大きな構造変化を起こすことに成功した[82]。アゾベンゼン単体では、trans/cis-体による立体配座と僅かな極性の光異性化であるが、オリゴマー化した場合、trans-体では直鎖状の構造がcis-体ではコンパクトに折り畳まれた構造に光異性化する。また、スピロピランを複数個付加することで、MC型の双性イオンを利用して様々な機能を付与することができる。例えば、複数個をポリマーに付加することで光制御が可能な金属キレート、ペプチドに付加することでヘリックス構造の光制御が可能である[83, 84]。したがって、フォトクロミック Eg5 阻害剤に導入するフォトクロミック分子の個数を増やすことで生じる光異性体間の劇的な構造変化が、阻害活性の光制御の効率を向上することは十分考えられる。一方で、あまりに巨大な分子構造では Eg5 の阻害剤結合部位に結合できないと予想されるため、導入個数は2個とした。

本章では、ispinesib が複数の芳香環を持つことを参考に、スピロピランを2つ導入した新規フォトクロミック Eg5 阻害剤を設計、合成した。また、アゾベンゼンの構造が GSK-1 などと類似していると予想し、2つのアゾベンゼンを持つフォトクロミック Eg5 阻害剤も設計、合成した。これらの2つのフォトクロミック分子を持つ Eg5 阻害剤によって、Eg5 活性が効果的に光制御できるか検証した。

3.3 実験材料と方法

3.3.1 試薬

試薬類は主に和光純薬工業（株）の製品を使用した。有機合成に関する試薬の一部は東京化成工業（TCI）の製品を使用した。分子生物学実験について、オリゴヌクレオチドはユーロフィンジェノミクス株式会社（旧、オペロンバイオテクノロジー株式会社）で合成を依頼し、使用した。制限酵素など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（現、メルクミリポアグループ）から購入した。

3.3.2 Eg5 モータードメインの調製

第2章の 2.3.2 と同様の方法で行った。

3.3.3 Eg5 モータードメインの発現と精製

第2章の 2.3.3 と同様の方法で行った。

3.3.4 kinesin-1 の調製

Kinesin-1 は本研究室の山田、宍戸らが調製したマウス脳由来 KIF5A cDNA（アミノ酸数 1-560）を組み込んだプラスミドを使用した。

3.3.5 Kinesin-1 の発現と精製

第2章の 2.3.3 と同様の方法で行った。

3.3.6 微小管の調製

第2章の 2.3.4 と同様の方法で行った。

3.3.7 蛍光標識微小管の調製

第2章 2.3.5 と同様の方法で行った。

3.3.8 DSPPA の合成

Ispinesib の構造を参考に、スピロピランを2つ導入した DSPPA は第2章 2.3.7 に記した SP-APA の合成方法を踏襲した。活性化エステルは通常、 α 位に配位した第1級アミンと優先的にペプチド結合を形成する。しかしながら、SP-APA の HPLC ピーク及び FAB-MS 解析の結果から、 α 位と β 位に配位したアミノ基2か所とペプチド結合を形成した合成産物が一定の割合で得られていることが判明した。この場合、スピロピランが2つ結合した構造となるため、HPLC を用いてスピロピラン単一の SP-APA とは容易に分離精製が可能であった。SP-COOH (78 μ mol) と 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride (780 μ mol)、N-Hydroxy Succinimide (780 μ mol) を DMF 3mL に溶かし、室温で3時間攪拌し、SP-COOH-(NHS)-ester を合成した。合成産物はシリカゲル (ultra-pure Wakogel C-200) を充填したオープンカラムクロマトグラフィーにアプライし、展開溶媒 (80% chloroform, 20% methanol) で EDC、NHS を取り除いた。目的物を含む溶出液を回収してエバポレーターで溶媒を取り除いたら、残留物を DMF で再懸濁した。SP-COOH-(NHS)-ester (20.0 μ mol) を溶解した DMF 3.0 mL に、DL-2,3-ジアミノプロピオン酸 (40.0 μ mol) を溶解した 50mM TEA-HCO₃ (pH7.5) 1.3 mL を攪拌しながらゆっくり加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、エバポレーターで溶媒を取り除き、残留物を 0.1M TEA-HCO₃ pH7.5 で溶解したら、逆相クロマトグラフィーと SP-APA と異なるピークを回収し、エバポレーターで溶媒を取り除いたら、残留物をメタノールで再懸濁し、フラッシュカラムで最終精製を行った。DSPPA の合成確認は FAB-MS で行った (DSPPA C₄₅H₄₄N₆O₁₀ = 825.865 ; m / z 828 + 1)。

3.3.9 BDPSB の合成

GSK-1 の構造を参考に、アゾベンゼンを2つ導入した (2,5-ジオキソ-1-[4-(E)-2-

フェニルジアゼニル-1-イル]フェニル}ピロリジン-3-イル)スルファニル]ブタン二酸(以下、BDPSB)を設計、合成した。チオール基反応性のフェニルアゾマレインナニル(PAM)(82.32 μ M)と meso-2,3-ジメルカプトコハク酸(27.44 μ M)をテトラヒドロフラン(THF)中で混合し、室温で4時間攪拌した。合成産物を分取TLC(PLCシリカゲル60、MERCK)にアプライし、展開溶媒(100%アセトニトリル)を用いて分離した。目的産物(R_f 0.03)のスポットを含むシリカゲルを回収してメタノールで抽出したら、エバポレーターで溶媒を取り除いた。残留物を0.1%トリフルオロ酢酸で再懸濁したら、逆相クロマトグラフィーで最終精製を行った。BDPSBの合成確認はFAB-MSで行った(BDPSB C₃₆H₂₈N₆O₈S₂ = 736.14; m/z 736 + 1)。

3.3.10 光異性化の測定

第2章の2.3.9と同様の方法で行った。

逆フォトクロミズムの発生は、DSPPAをDMFまたはEg5 ATPase 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)に希釈したものを使用して測定した。可視光を5~10分間照射し、SP型に光異性化したことを吸光スペクトルで確認後、遮光して25°Cで1~5時間静置した。逆フォトクロミズムによる吸光スペクトルの変化は、光照射時と同様、メロシアニン型スピロピランに特異的な500 nm付近の吸光度ピークから確認した。

3.3.11 ATPase 活性の測定

以下に記述した条件以外は、第2章の2.3.10と同様の方法で行った。

Kinesin-1(K560)は1分子でモータードメインを2個持つダイマー状態であるため、微小管濃度依存性ATPase活性は0.05 μ Mで行った。Kinesin-1濃度以外の全ての実験条件はEg5の場合と同一である。

微小管濃度依存的なEg5 ATPase活性の測定は、微小管濃度を0~12 μ Mに変更して行っ

た。また、添加するフォトクロミック Eg5 阻害剤の濃度は、DSPPA の場合は 2.5 μ M、BDPSB の場合は 80.0 μ M で実施した。

Eg5 ATPase 活性の可逆的な光制御は、フォトクロミック阻害剤を含む DMF を最終濃度 5.0% (v/v)になるように加えた Eg5 ATPase assay buffer を用意し、繰り返し 2.3.9 で記した条件で光照射を行った。ATPase 活性の測定は、前述の Eg5 ATPase buffer から新たな 1.6 mL マイクロチューブに分注してから行った。

3.3.12 モーター活性の測定（微小管滑り運動）

第2章の 2.3.11 と同様の方法で行った。

3.4 結果と考察

3.4.1 DSPPA による Eg5 ATPase 活性の光制御

Eg5 の ATP アーゼおよびモーター活性を光可逆的に制御するために、新規フォトクロミック Eg5 阻害剤、DSPPA (図 3-3) を設計、合成した。DSPPA の合成は、確立された方法に従って実施した (図 3-4)。L-システインの有無が、Eg5 阻害剤には必ずしも重要でないことは、モナストロールや、ispinesib などのその他の Eg5 阻害剤から示されている。しかしながら、Eg5 の STLC 結合部位をターゲットとした場合、多くの阻害剤は化合物の両極に芳香族からなる疎水性部位と、システインなどのアミノ基に類似した極性部位を持つ。疎水性部位と極性部位の重要性は、Eg5-STLC などの結晶構造解析や、各種阻害剤と Eg5 のシミュレーションから証明されている。疎水性部位は阻害剤の結合を支持し、アミノ酸部位は α 2、 α 3 ヘリックス近傍のアミノ酸と相互作用することで、Eg5 の ADP 放出に関わる構造変化を抑制すると考えられている [54, 85]。スピロピランを 2 つ持つ化合物が効果的であるかどうか、Eg5 阻害剤とスピロピランの類似性を調べた結果、ispinesib がスピロピランの構造に近いことが考えられた。Ispinesib は、STLC と同じ阻害剤結合部位を共有しているが、相互作用を起こすアミノ酸と結合方法に違いがある。しかしながら、単純な構造であり、合成の出発物質として用いてきた SP-COOH 単体は、Eg5 ATPase 活性に対して阻害効果を持たないことが実験的に証明された (data not shown)。また、第 2 章で記述したように、L-システインとスピロピランを結合させたフォトクロミック Eg5 阻害剤、L-cys-IASP や L-cys-MASP は効果的でないことも明らかである。一方で、単純なアミノ酸とカルボキシル基を持つ SP-APA、SP-ABA は低いながらも、SP-COOH とは異なり阻害活性を獲得した。また、SP-lisine のようにスピロピランと官能基の距離が長いと、阻害効果が失われることも解明した。化合物の中間位置にカルボキシル基を有する 2 つのスピロピランから構成されるフォトクロミック Eg5 阻害剤 DSPPA は、第 2 章で示したスピロピランを 1 つ導入したフォトクロミック Eg5 阻害剤と比較して、広範囲で構造変化が起こる。DSPPA の両端は S P 型で疎水性、MC 型で双性イオンによって極性を獲得する。これにより、単体のスピロピラン由来フォトクロミック Eg5 阻害剤よりも光異性化により劇的な構造と親水性/疎水性の

変化が生じ、Eg5 に対する阻害活性の光制御効率は向上することが期待される。

図 3-5 は、DSPPA の光異性化が可逆的に発生するか、吸収スペクトル変化で確認した結果である。SP 型 DSPPA は、他のスピロピランと同じように約 500nm の吸収をほとんど示さなかった。一方、366nm の UV 照射は MC 型への変換を誘導し、560nm での吸収スペクトルピークは時間依存的に増加した。また、これらの光異性化は可逆的であることも示された。同様の方法で、UV および VIS 照射時の可逆的スペクトル変化は DSPPA を緩衝液中に溶解した場合でも観察された (図 3-6)。スピロピランのフォトクロミズムの 1 つに、暗所で室温下に保管すると、時間依存的に逆フォトクロミズムが生じる。逆フォトクロミズムは、生体物質に対して有害な UV 光照射を用いず、フォトクロミック分子の光異性体を制御できる。熱平衡状態において、C8 位にカルボキシル基またはアルコール基が置換されたスピロピランは、溶媒の極性に比例して、逆フォトクロミズムを示すことが報告されている [79]。実際、緩衝液中に溶解した SP 型 DSPPA は、25℃で暗所にて、時間依存的に MC 型に光異性化することを示した (図 3-7)。また、暗所での SP 型 DSPPA の逆フォトクロミズムによる MC 型への変換速度は、光照射よりはるかに低速であった。しかしながら、DMF 中の SP 型 DSPPA は逆フォトクロミズムによる MC 型への変換は確認されなかった。

Eg5 の Basal ATPase 活性に対する SP 型および MC 型の DSPPA の阻害活性を検証した (図 3-8A)。2 つのスピロピラン部位を持つ DSPPA は、STLC アナログとして設計した L-cys-LASP, L-cys-MASP よりも顕著に ATPase 活性を阻害した。さらに、SP 型と MC 型の光異性体間で阻害活性の差も認められた。DSPPA の場合、これまでのフォトクロミック Eg5 阻害剤と異なり、SP 型が MC 型よりも高い阻害効果を示した。それぞれの光異性体について、半数阻害濃度 (IC_{50}) を測定した結果、SP 型の IC_{50} 値は $2.09 \pm 0.10 \mu M$ であったが、MC 型の IC_{50} 値は $3.67 \pm 0.12 \mu M$ であった。Eg5 の微小管依存性 Eg5 ATPase 活性もまた、図 3-8B に示したように、DSPPA によって有意に阻害された。微小管存在下での Eg5 ATPase 活性の IC_{50} は、SP 型で $3.77 \pm 0.27 \mu M$ だが、MC 型では阻害活性がより低下し、 IC_{50} は $7.67 \pm 0.31 \mu M$ となった。さらに、阻害曲線は S 字形をしており、DSPPA が複数の結合部位を有すると推測され

た。また、DSPPA の光異性体の阻害活性の変化は、図 3-9 に示されるように光可逆的であった。

DSPPA の設計は、当初のスピロピラン誘導体から STLC アナログを参考にしたものと、大きく考え方は異なっている。DSPPA が複数の結合部位を持つ可能性を考慮すると、果たして DSPPA が Eg5 に対して特異的であるかは疑問が残る。そこで、従来型キネシン (kinesin-1) を用いて DSPPA の特異性を検討した (図 3-10)。結果として、従来型キネシン (kinesin-1) に対しての DSPPA の阻害活性は、SP 型、MC 型ともに確認されなかった。我々はまた、Eg5 と微小管との相互作用に対する DSPPA の影響を調べた。図 3-11 は、DSPPA の存在下での微小管濃度に対する Eg5 ATPase 活性を示す。 V_{\max} に関しては、SP 型、MC 型ともにほぼ同じ数値を示した。しかし、 K_{mt} に関して注目すると、SP 型 DSPPA の存在下では、微小管との親和性が MC 型よりも低いことが示唆された。ATPase 活性の阻害効果に関して、微小管依存性活性評価で光異性体間の差が大きくなったことから、SP 型 DSPPA は Eg5 と微小管の相互作用を抑制するようにはたらきがあることが推測された。

3.4.2 DSPPA による Eg5 モーター活性の光制御

DSPPA が微小管依存性および Basal Eg5 ATPase 活性を光可逆的に制御できたことから、次に Eg5 モーター活性の光制御を試みた。ローダミン標識した微小管を用いた微小管滑り運動速度の測定は、確立された方法に従って実施した。微小管滑り運動速度はフローセルに固定した Eg5 のモーター活性を意味する。DSPPA 非存在下における微小管滑り運動速度は $23.22 \pm 0.381 \text{ nm / s}$ であった (図 3-12A)。一方、DSPPA の存在下では微小管滑り運動速度は、コントロールと比較して、わずかに広い分布を示した。SP 型 DSPPA における平均速度は、図 3-12B に示すように、 $15.70 \pm 0.535 \text{ nm / s}$ である、コントロールと比較して有意な減少が見られた。しかし、MC 型 DSPPA における平均速度の減少は僅かであり、コントロールとほぼ同様の分布を示した ($21.04 \pm 0.436 \text{ nm / s}$) (図 3-12C)。また微小管滑り運動の過程で、DSPPA 存在下では、運動活性評価の時間依存的に微小管の解離が見受けられた。微小管の解離頻度について、時間依存的に測定した結果を図 3-13 に示した。ATPase 活

性、モーター活性の光可逆的阻害と同様、SP 型は MC 型に対して有意に微小管と Eg5 の相互作用を阻害した。MC 型 DSPPA における微小管の解離は、蛍光顕微鏡の励起光 (530~550nm) が影響していることが予想された。観察前に 366nm 紫外光照射で MC 型に光異性化した DSPPA は、蛍光顕微鏡の励起光によって時間依存的に SP 型へ光異性化したため、MC 型でも SP 型で見られた微小管の解離が発生したと推測された。微小管濃度依存的 Eg5 ATPase 活性の阻害実験では、Eg5 と微小管の相互作用に対して、光可逆的に抑制することが示唆された。第 2 章で使用した L-cys-MASP と異なり、DSPPA による微小管の解離は、比較的穏やかであった。また、微小管滑り運動速度の分布からも分かるように、モーター活性の阻害効果もあることが確認された。しかしながら、モーター活性に関しては STLC のように完全に止めることはできなかった。このことは、微小管の解離現象とも関係しており、40 μ M 以上の高濃度の DSPPA 存在下では微小管の接着自体が見られなくなった。微小管濃度依存的 ATPase 活性の結果から DSPPA は微小管との相互作用を抑制し、かつ ATPase 活性も阻害してしまうため、濃度を上げた場合、微小管滑り運動自体が観測できなかった。微小管との解離が生じたことは、DSPPA が既存の STLC などとは異なる阻害機構を有していることを示唆した。

3.4.3 BDPSB による Eg5 ATPase 活性の光制御

石川らが報告したフォトクロミック Eg5 阻害剤である ACTAB は、STLC アナログとして設計、合成されたアゾベンゼン誘導体である [20]。これは STLC のトリチル基と L-システインをアゾベンゼンで連結した構造を持ち、trans-cis 体の立体配座の変化で阻害活性を光制御することを狙いとしていた。実際、ACTAB は Eg5 ATPase 活性およびモーター活性を光可逆的に制御することに成功したが、trans-、cis-体間でさらに違いが生じるように改善する余地があった。アゾベンゼンの立体配座の光異性化は平面的であり、したがって、トリチル基と L-システインの距離の変化は阻害効果に有意な差を生むには不十分であったと予想される。アゾベンゼンはベンゼン環が 2 つ連結した極めて高い疎水性構造を持つが、第 2 章のスピロピラン同様、それ単体では Eg5 活性に対して有意な阻害効果を発揮できなかった。しかしながら、Eg5 阻害剤であり、単純なベンゼン環骨格を持った GSK-1 や PVZB1194

はアゾベンゼンに類似していると推測される。特に、GSK-1 に関連する報告ではベンゼン環の片側に導入する官能基によって阻害活性が変化することも明らかになっている[81]。アゾベンゼン由来の新たなフォトクロミック Eg5 阻害剤を設計するにあたっては、さらに DSPPA で得られた知見も参考とした。DSPPA は、2つのスピロピラン部位を ispinesib のキナゾリノン部位、またはベンゼン環として模倣した。その結果、分子量 800 近くのペプチドに匹敵する構造となったが、光異性体間で劇的な構造と特徴の変化が生じ、阻害活性の光制御の効率を上げることに成功した。Ispinesib や BI8 といった Eg5 阻害剤は、極めて疎水性の高い部位を分子構造の外側に配位し、中央部分や一部に親水性の高い構造を持つ。DSPPA も分子構造の中心は親水性が高く、SP 型では外側は疎水性、MC 型では親水性へと変化することで、阻害活性が光制御されたと予想される。これらの知見から、新たなフォトクロミック Eg5 阻害剤は、構造中央に親水性を持ち、外側に疎水性を付与する構造として設計した。

スピロピラン誘導体同様、2つのアゾベンゼン部位から構成されるフォトクロミック Eg5 阻害剤、BDPSB を合成した (図 3-14)。BDPSB の合成は確立された合成方法に基づき、チオール反応性アゾベンゼン誘導体、4-(N-マレイミド) アゾベンゼンを 2,3-ジメルカプトコハク酸の 2つのチオール基に組み込んだ (図 3-15)。BDPSB は分子構造の中心にカルボン酸とスルフィド結合を持ち、分子構造の両端にアゾベンゼンが 2つ付与されている。Trans-BDPSB はベンゼン環が外側を向き、アゾベンゼンとマレイミドによって平面的な構造を維持すると予想される。BDPSB は中心に親水性部位を持つが、スルフィド結合を介してマレイミドや、trans-アゾベンゼンの平面構造はフレキシブルに回転または折れ曲がることができる。一方、cis-BDPSB では両端のアゾベンゼンが内側に折り込まれたような構造をとり、立体的には内側へ丸まったような構造に変化すると推測される。また、アゾベンゼンも、スピロピランほどではないが、光異性体間で親水性/疎水性の極性変化が生じる。

BDPSB の光異性化は、UV および VIS 光照射中の吸光スペクトル変化で確認した。アゾベンゼンの吸光スペクトルは、trans-cis 体の光異性化に伴って 300~400nm の吸光ピークが

変化することが知られている[59]。Trans-BDPSB のアゾベンゼンの窒素二重結合に由来する 330nm の吸光度のピークは、366nm の紫外光照射によって時間依存的に減少した（図 3-16）。5 分以上の照射を行っても、trans-体のピークが完全に消失しないことは、Behrendt らの報告から一般的に知られており、cis-体は 20%程度の trans-体を含む[86]。一方、cis-体から trans-体への光異性化は、cis-体への変化同様、可視光照射で時間依存的に起こった。Trans-体への完全な移行も約 5 分で完了した。

BDPSB 光異性体が微小管依存性 ATPase 活性に与える影響を測定した（図 3-17 A）。BDPSB のアフィニティは、DSPPA と比較して 10 倍以上、低下した。しかしながら、光異性体間で阻害活性に非常に有意な差が得られ、trans-体が 125 μ M 以降 ATPase 活性を完全に止めたのに対して cis-体ではほとんど阻害活性が見られなかった。半数阻害濃度（IC₅₀）を測定した結果は、Trans-BDPSB で $74.2 \pm 2.5 \mu$ M であったが、BDPSB では 500 μ M 以上必要であった。阻害効果の濃度依存性に注目すると、DSPPA 同様、trans-BDPSB は S 字型となった。これは、少なくとも、BDPSB は微小管存在下において標的結合部位を 2 か所持つことを示唆した。Cis-BDPSB の阻害活性は、同濃度の trans 体と比較して非常に緩やかであった。一方、光異性化で述べたように cis-体は 25%の trans-型を含むことから、完全に cis-型で存在した場合の阻害曲線を算出し、破線で示した。破線に注目すると、trans 型がほぼ ATPase 活性を阻害した 100 μ M 付近まで cis-型は、理論上であるが、阻害活性を持たないことが判明した。

微小管が存在しない条件である Basal Eg5 ATPase 活性についても、微小管依存性と同様に BDPSB 光異性体の阻害効果を確認した（図 3-17 B）。驚くことに、Trans-BDPSB は 25 μ M をピークとした ATPase 活性の促進作用を発揮した。この促進作用は最大でコントロールの 4 倍近くまで上昇したが、25~100 μ M にかけてゆるやかに減退していき、100~ 150 μ M では阻害作用へと変化した。特に 150 μ M では、ATPase 活性はほとんど停止した。cis 体も、trans 体と比較してゆるやかではあるが、ATPase 活性の促進作用が認められた。Cis-BDPSB はの Basal ATPase 活性に対するアフィニティは低かったため、trans-型のような促進作用

のピーク、阻害効果への変換は観測できなかった。Basal Eg5 ATPase 活性に対する Trans-BDPSB のユニークな作用は、微小管依存性 ATPase 活性で示唆された標的結合部位のサブドメインについて、その存在を強く支持した。微小管依存性 ATPase 活性の阻害曲線において、BDPSB 0~50 μM までの阻害が比較的緩やかであったが、この濃度範囲は Basal ATPase 活性における促進作用の発生範囲と一致した。したがって、BDPSB は ATPase 活性の阻害作用以外に、促進作用を引き起こす結合部位の 2 か所を、Eg5 に対して獲得したと推測された。阻害作用に寄与する結合部位については、Eg5 の微小管結合部位近傍が考えられ、BDPSB は ATPase 活性の触媒である微小管の代替物として結合した可能性が考えられた。

BDPSB が Eg5 と微小管の相互作用に与える影響について、微小管濃度依存的 ATPase 活性で検証した (図 3-18)。IC₅₀ に相当する 80 μM BDPSB 存在下で微小管濃度を 0~12 μM で変更し、 V_{max} と K_{mt} を測定した。Cis-体はコントロールとほぼ同じ値を示したが、trans-体では V_{max} と K_{mt} 双方に有意な減少が確認された。したがって、trans-BDPSB は微小管と Eg5 の相互作用を阻害することが示唆された。その原因としては BDPSB が微小管と競合する場合と、微小管への結合力が非常に弱い Eg5・ADP 状態で阻害された場合の 2 つが推測される。STLC, Monastrol の速度論的解析では、Eg5・ADP 状態で ATPase サイクルが停止していると示唆され、微小管との結合力は低下した。BDPSB が獲得した 2 つの Eg5 結合部位の、少なくとも 1 つは、STLC などと共通していると ATPase 活性試験から推定される。

アゾベンゼンはスピロピランと比較して、光応答性分子としての特徴は単純である。スピロピランは MC 型の双性イオン同士の静電的相互作用によるダイマー化や、逆フォトクロミズムが発生するが、アゾベンゼンの光異性化は立体配座の変換のみで、可逆的かつ安定である。しかしながら、BDPSB は 2 つのアゾベンゼンを持つ特異な構造であることから、阻害活性の光可逆性や安定性に対して十分な試験を行う必要が考えられた。BDPSB の阻害活性の光可逆性について、微小管依存性 ATPase 活性で測定した結果は図 3-19 に示した。Trans, cis 体ともに阻害活性の光可逆性は極めて高いことが示された。Eg5 ATPase 活性は可視光照射の trans-体で阻害され、紫外光照射の cis-体では阻害されない、ほぼ完全な光制御に

成功した。

BDPSB は ispinesib などの構造を参考に設計し、明らかな阻害効果も確認された。しかしながら、Kinesin Eg5 に対する特異性が保存されているか否かは証明されていない。そこで、従来型キネシンである kinesin-1 (K560) と Eg5 の双方に対する BDPSB 光異性体の阻害活性を検証した。図 3-20 に各 BDPSB 濃度における Kinesin-1、Eg5 に対する阻害効果を測定した結果を示した。Trans-BDPSB が ATPase 活性に影響しないことは、Kinesin-1 でも同様であった。一方で、阻害活性を獲得した cis-BDPSB では、Eg5 と比較して有意な差は示されたが、kinesin-1 の ATPase 活性を阻害した。Eg5 ATPase 活性の光制御が可能な濃度である 100 μ M 付近では、Kinesin-1 の半数阻害濃度 (IC_{50}) に匹敵した。

3.4.4 BDPSB による Eg5 モーター活性の光制御

BDPSB は Eg5 ATPase 活性の光制御に成功した。しかしながら、微小管濃度依存性や Basal ATPase 活性の結果と総合的に考えて、Eg5 に対して 2 つの結合部位を持つことが示唆された。結合部位の候補として、微小管結合部位があることから、キネシンの生理的機能に重要なモーター活性に対する効果を検証する必要がある。DSPPA 同様、BDPSB のモーター活性に対する影響を微小管滑り運動アッセイで測定した。微小管滑り運動速度は、50 または 100 μ M の BDPSB で行った。50 μ M BDPSB を加えた場合の結果を、図 3-21 に示した。50 μ M BDPSB では、コントロールの速度分布に対して trans-体、cis-体ともに大きな影響は見られなかった。しかしながら、フローセルに固定された Eg5 に結合する微小管の個数の減少が、cis-BDPSB では見られた。100 μ M BDPSB を加えた場合の速度分布を図 3-22 に示した。平均速度はコントロールで 11.54 ± 1.65 nm/s、cis-BDPSB で 9.67 ± 2.46 nm/s と少しの減少が見られた (図 3-22B)。また、速度分布に関しても、コントロールと比較して cis-体では分布が低速側に推移していることが示された。Tnras-BDPS の平均速度は 4.00 ± 1.54 nm/s となり、コントロールの半分以下まで減少した (図 3-22C)。速度分布をコントロールと比較すると、有意にモーター活性が阻害されたことが明らかである。さらに興味深いことに、Eg5 と結合した微小管の数は著しく減少した。フローセル内の微小管の数はコン

トロールと trans-BDPSB 存在下はほぼ均一であったが、cis-BDPSB 存在下では著しく減少した。微小管の解離は DSPPA でも発生したが、BDPSB の場合、微小管と Eg5 の結合自体が阻害されていた。DSPPA の場合、微小管はモーター活性による運動中に、時間依存的に剥がれた。このことは、BDPSB が DSPPA とは異なる機構で微小管との結合を阻害していることを示唆した。

3.5 第3章のまとめ

DSPPA は Eg5 活性とモーター活性の両方を阻害した。阻害活性は SP 型で MC 型を大きく上回り、光制御の効率も良好な結果を得られた。しかしながら、微小管に対する Eg5 の K_{mt} と V_{max} は DSSPA 存在下で光可逆的に減少した。DSPPA の阻害曲線は S 字型を示し、これは Eg5 に対して DSPPA が少なくとも 2 か所以上の標的結合部位を持つことを示した。DSPPA によるモーター活性の光制御は、ATPase 活性の結果から期待されたほど、有意に行われなかった。一方でモーター活性によって運動する微小管の解離が時間依存的に見られたことから、DSPPA は微小管と Eg5 の相互作用も光制御している可能性が示唆された。

スピロピランを 2 つ導入することで、飛躍的に Eg5 活性の光制御が行われたことから、アゾベンゼンについても同様の検証を行った。PVZB1194 や GSK-1 といったアゾベンゼンに類似した Eg5 阻害剤が報告されていることから、それらの構造を参考に 2 つのアゾベンゼンを導入したフォトクロミック阻害剤 BDPSB を合成した。BDPSB の微小管依存性 ATPase 阻害活性は、DSPPA と比較して 10 倍以上低下したが、光制御の効率は劇的に向上した。さらに興味深いことに、微小管非存在下における Basal ATPase 活性では BDPSB によって Eg5 活性の亢進が見られた。この亢進作用も、光可逆的に制御されており、trans-型では 25 μ M 付近をピークに減少し、100 μ M 以上では阻害作用に転じていた。また、微小管滑り運動の結果から微小管の結合とモーター活性の両方が光可逆的に制御された。したがって、BDPSB を用いることで Eg5 活性はほぼ完全に光制御することに成功した。

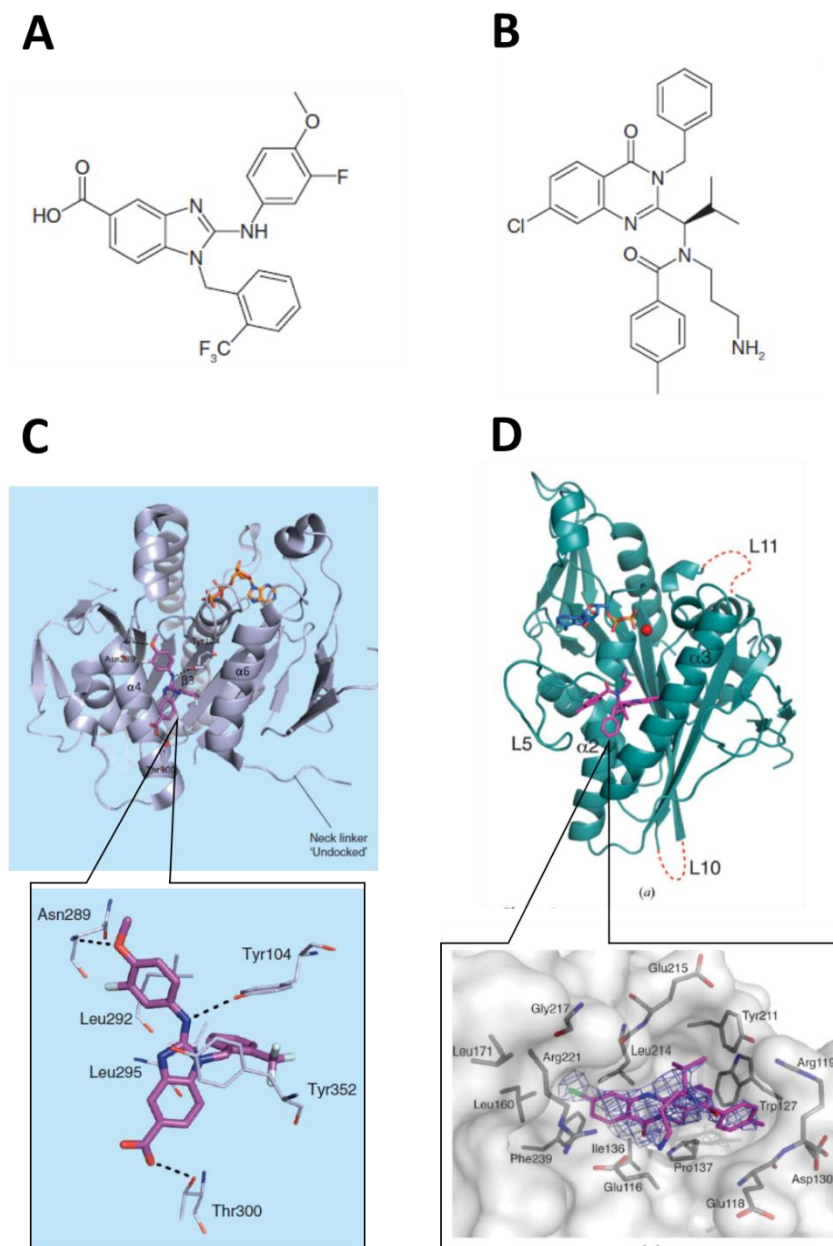


図 3-1 Eg5 阻害剤 ispinesib と BI8 の Eg5 複合体の解析.

(A) BI8 の化学構造式。(B) Ispinesib の化学構造式。(C) BI8-Eg5 の結晶構造 (PDB 3ZCW) 及び結合部位近傍のアミノ酸との相互作用部位。(D) ispinesib-Eg5 の結晶構造 (PDB) 及び結合部位近傍のアミノ酸との相互作用部位 (B, Dは Talapatra SK. 2012 [55]から引用。A, Cは Myers SM 2016 [80]から引用)。

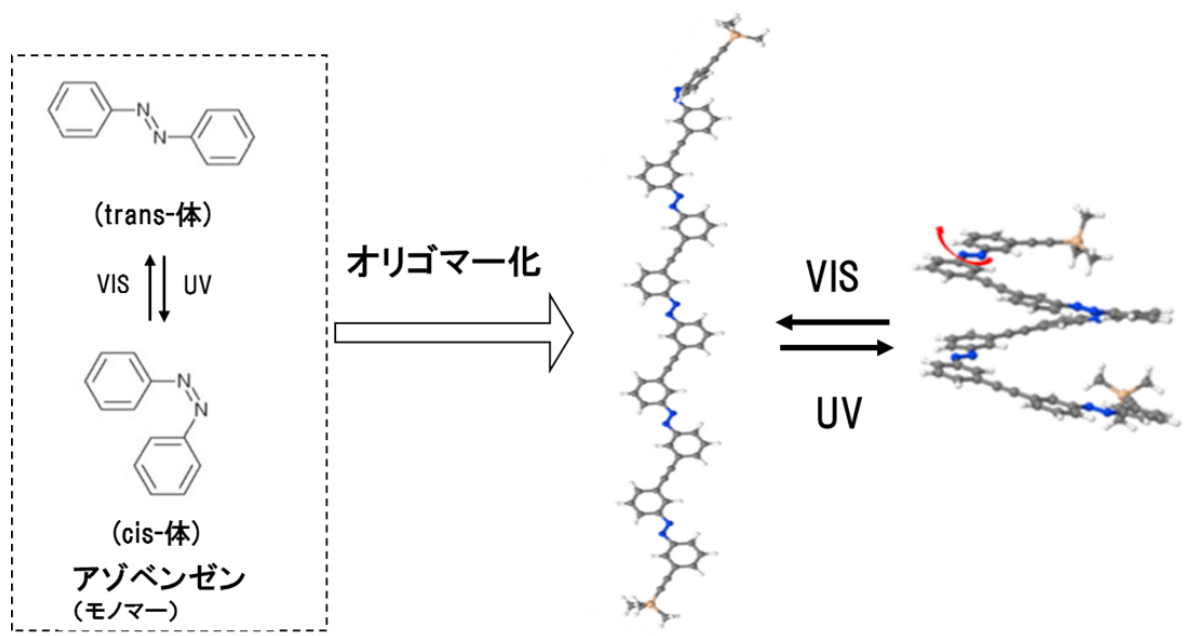


図 3-2 アゾベンゼンオリゴマーの光異性化.

破線内はアゾベンゼン単体の光異性体を示す。オリゴマー化によって、trans-体と cis-体の光異性体による立体的な変化が大きくなる。Trans-体では直鎖状だが、cis-体では折りたたまれたような構造へ変化する (Steinwand S. 2016 [82]から引用)。

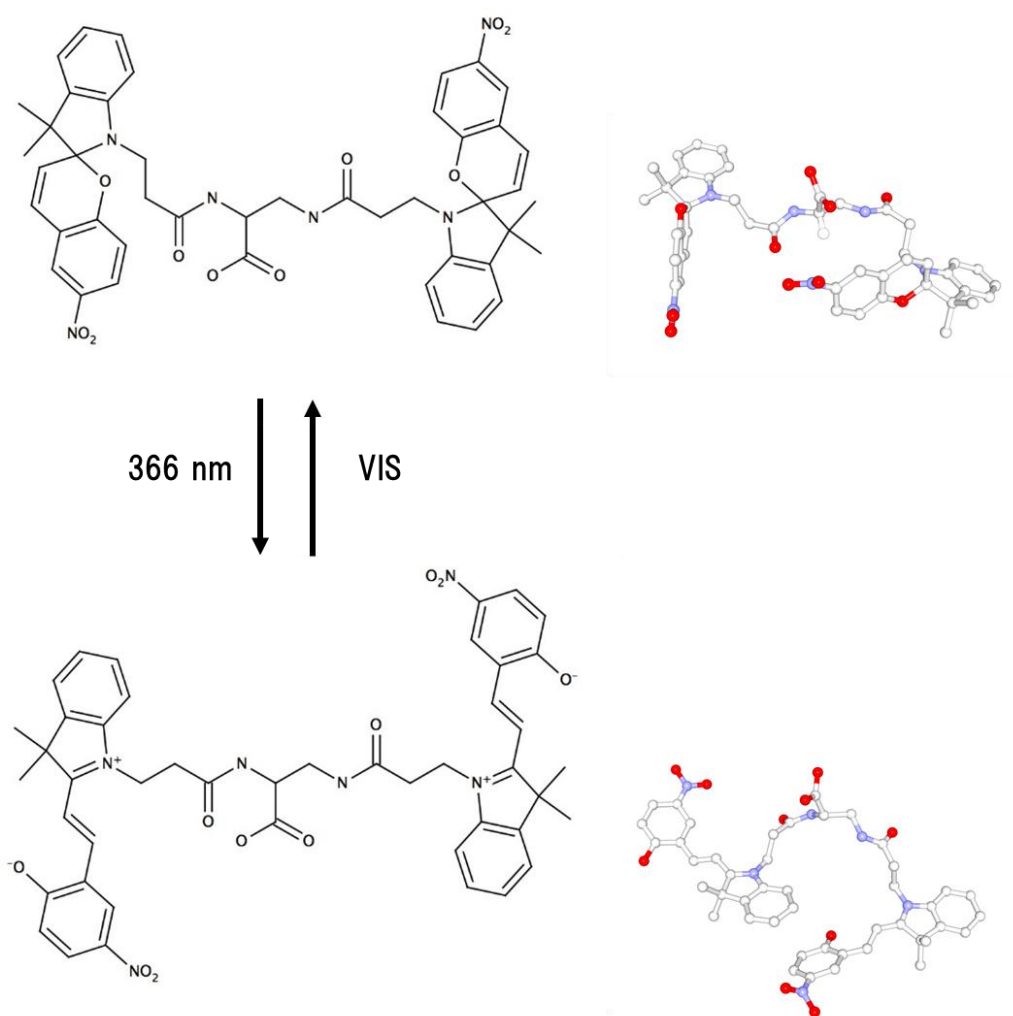


図 3-3 フォトクロミック Eg5 阻害剤；DSPPA の光異性体の化学構造式。

可視光照射（VIS）によってスピロ型（SP型）、366 nm 紫外光照射によってメロシアニン型（MC型）へ光異性化する。左側に化学構造式を、右側に計算ソフトによって決定した立体的な構造の予想図を示す。

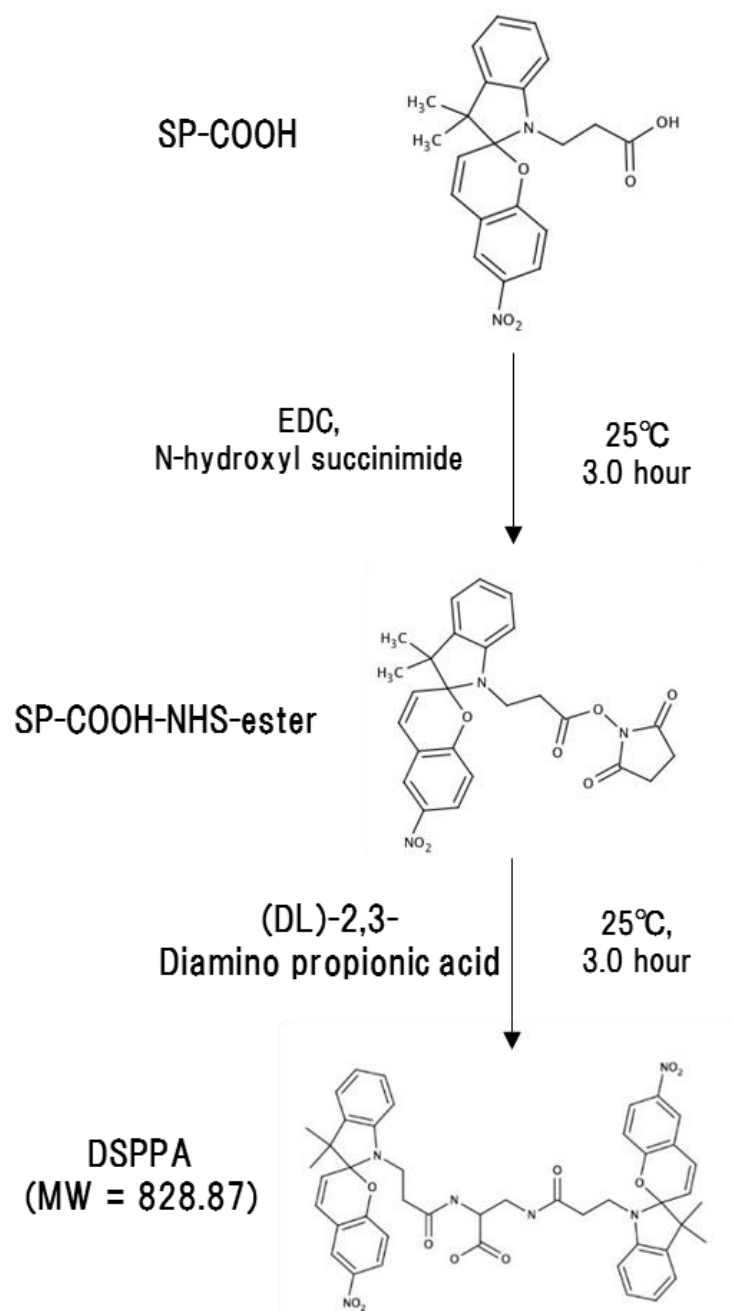


図3-4 フォトクロミックEg5阻害剤：DSPPAの合成。

SP-COOHの合成はChen J [74]の方法にしたがって行った。合成の詳細については第3章3.3.8に記した。

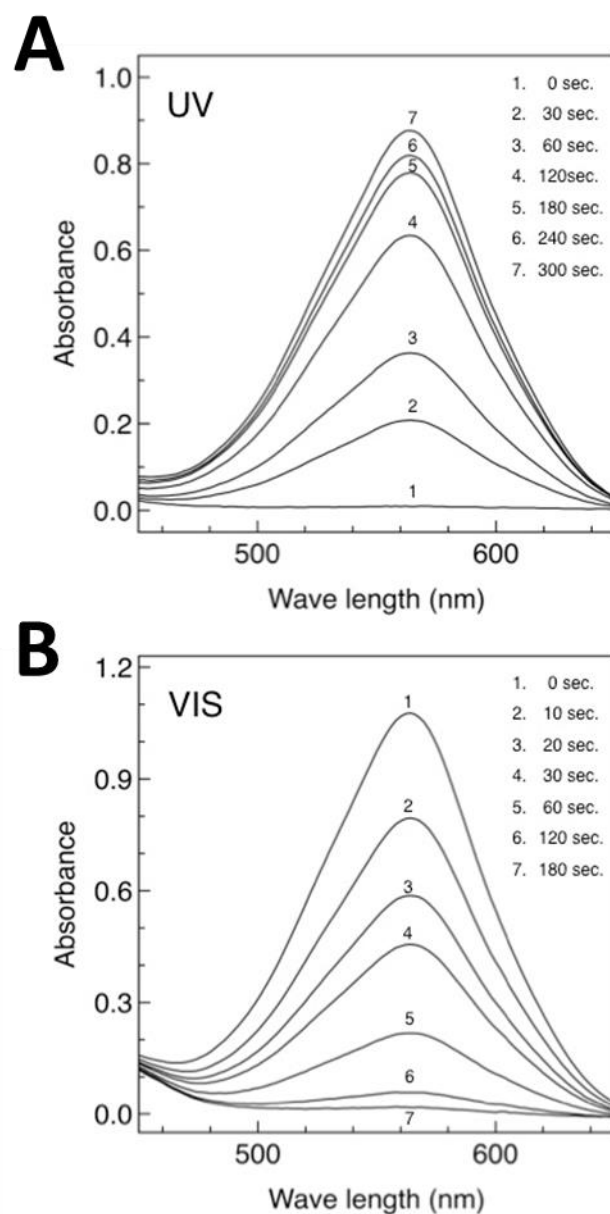


図 3-5 DSPPA の有機溶媒内での光異性化に伴う吸光スペクトル変化。

DSPPA は非極性溶媒の DMF で $10.0 \mu\text{M}$ に希釈した。(A) 366 nm 紫外光照射によるスピロ型からメロシアニン型への時間依存的な光異性化。(B) 可視光照射によるメロシアニン型からスピロ型への時間依存的な光異性化。

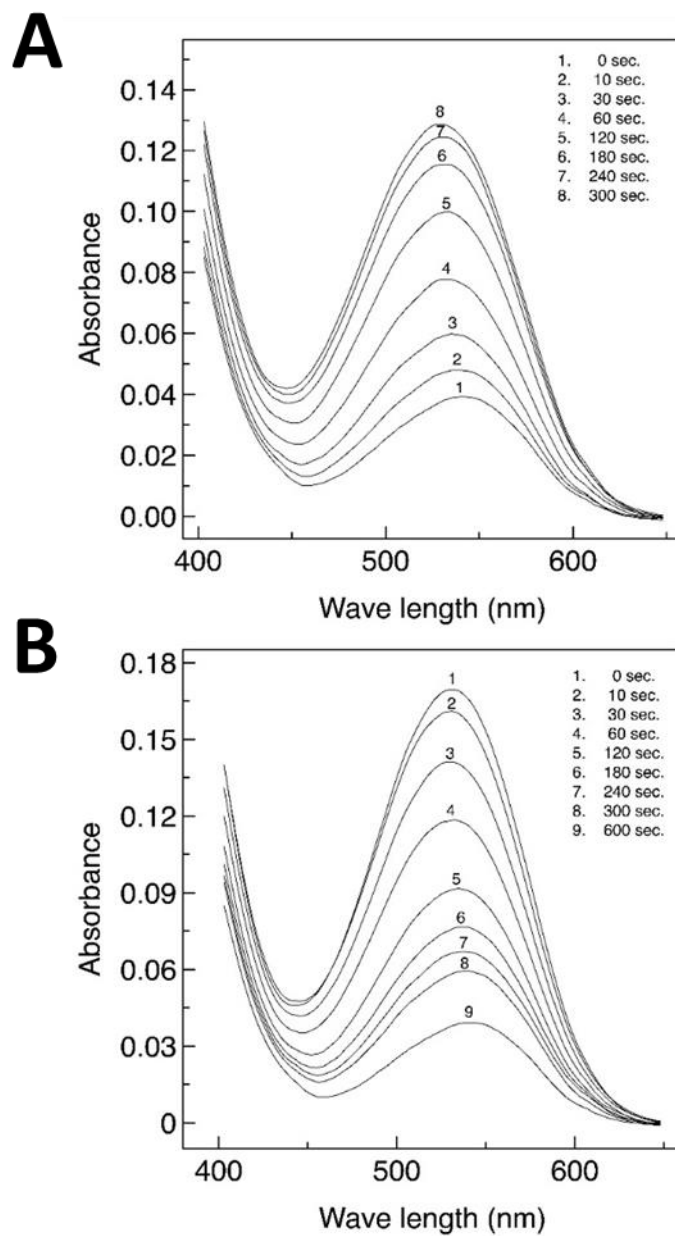


図 3-6 DSPPA の緩衝液中での光異性化に伴う吸光スペクトル変化。

DSPPA は Eg5 ATPase assay 緩衝液 (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) で 10.0 μ M に希釈した。(A) 366 nm 紫外光照射によるスピロ型からメロシアニン型への時間依存的な光異性化。(B) 可視光照射によるメロシアニン型からスピロ型への時間依存的な光異性化。

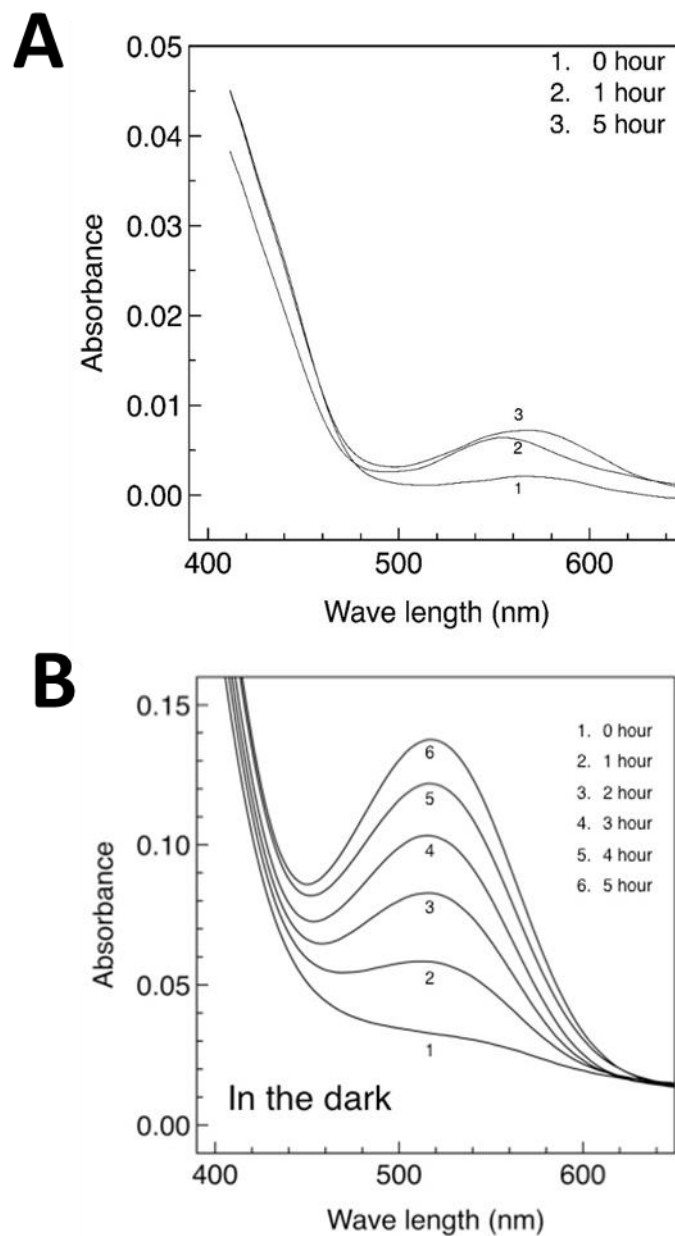


図 3-7 DSPPA の逆フォトクロミズムによる吸光スペクトル変化。

DSPPA はDMF (A) または Eg5 ATPase assay 緩衝液 (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) (B) で 10.0 μ M に希釈した。逆フォトクロミズムは可視光光照射を 10 分間行ったあと、遮光、室温で放置することで行った。

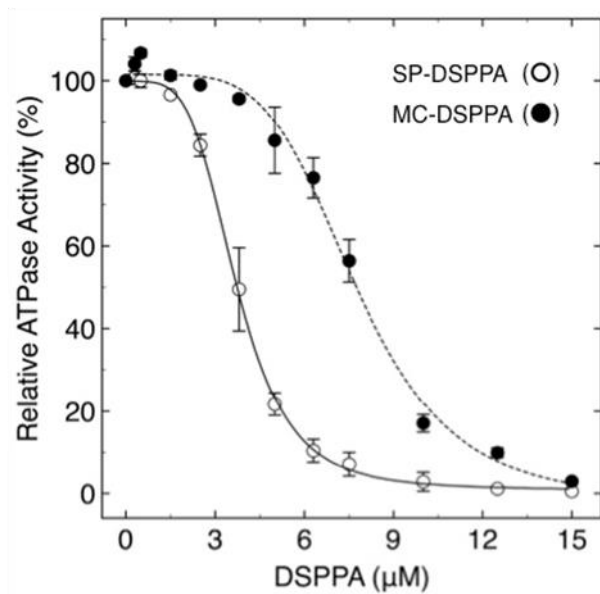
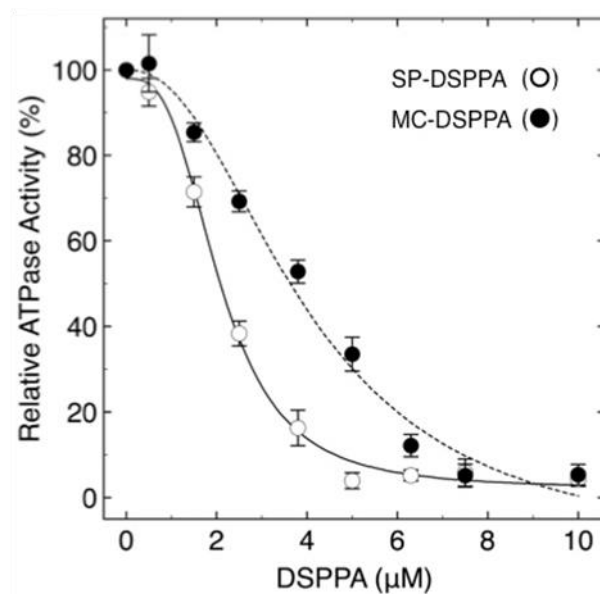
A**B**

図3-8 DSPPAによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は3.3.11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。(A) DSPPA光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。(B) DSPPA光異性体のBasal Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

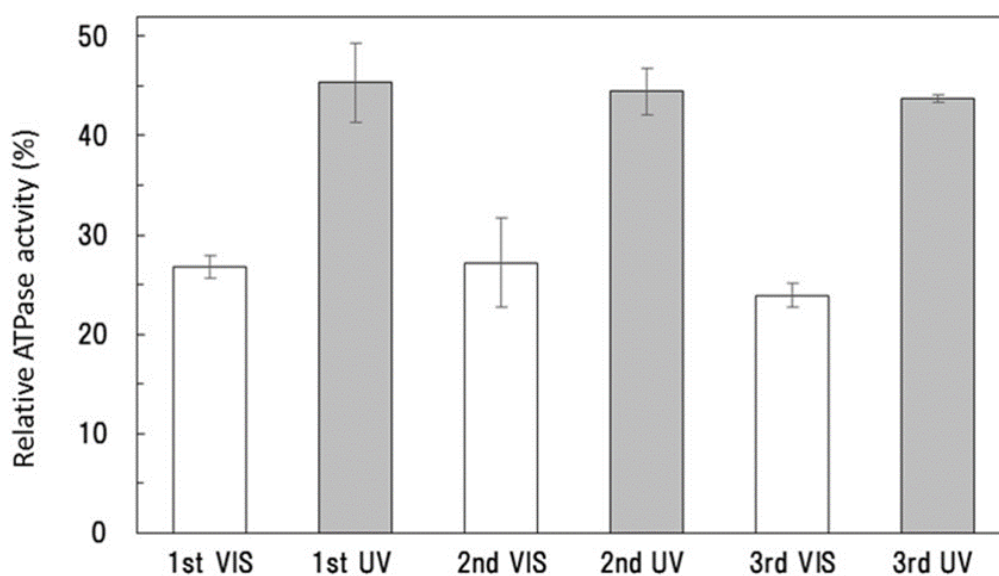


図3-9 DSPPAによるEg5 ATPase活性の可逆的な光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は3.3.11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。DSPPA濃度は7.50 μM で行った。

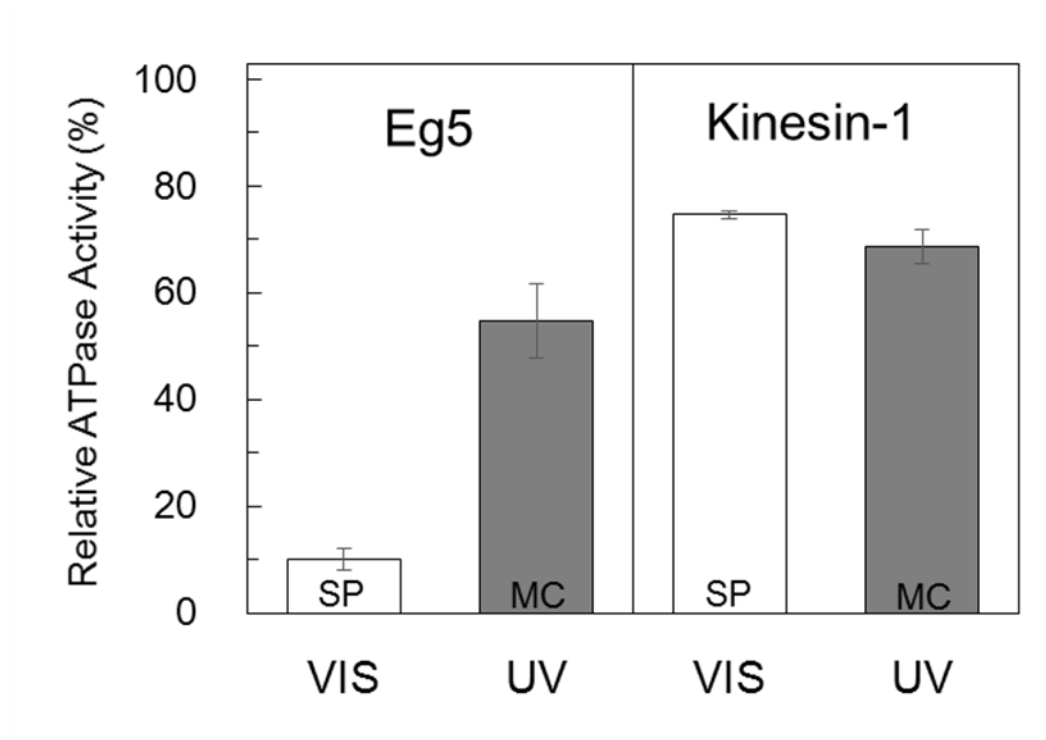


図3-10 DSPPAのEg5 ATPase活性に対する特異性。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は3.3.11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。DSPPA濃度は7.50 μ Mで行った。

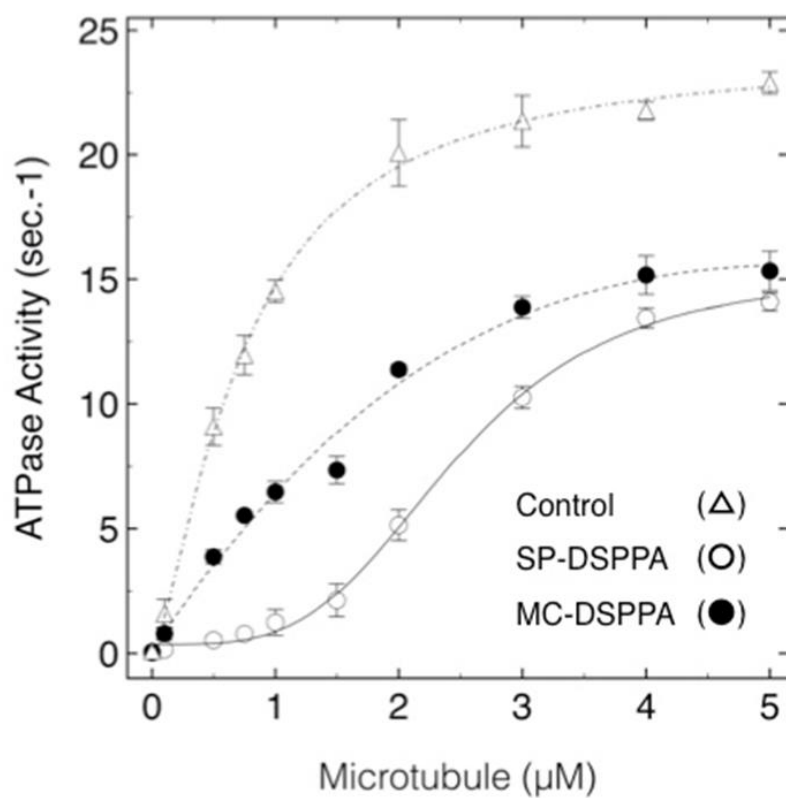


図3-11 DSPPA存在下における微小管濃度依存的Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

活性評価の条件は3.3.11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。DSPPA濃度は3.0 μMで行った。

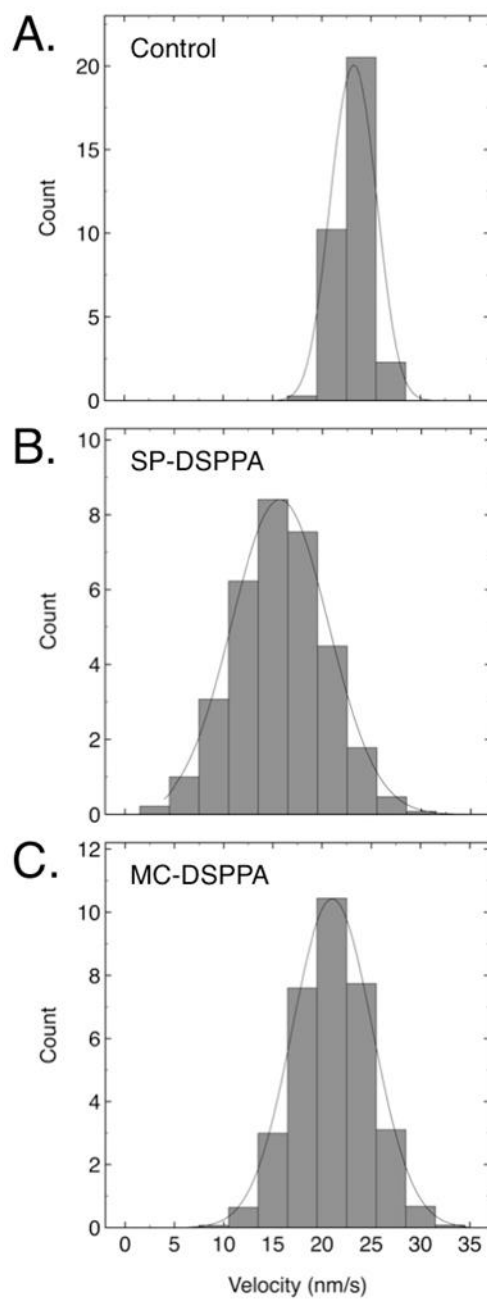


図3-12 DSPPAによるEg5モーター活性の光制御。

モーター活性は微小管速度の分布から測定した。横軸は微小管の滑り運動速度を示す。

(A) 5.0% DMF、(B) 10 μ M SP-DSPPA、(D) 10 μ M MC-DSPPA存在下における個々の微小管滑り運動速度を度数分布にした。

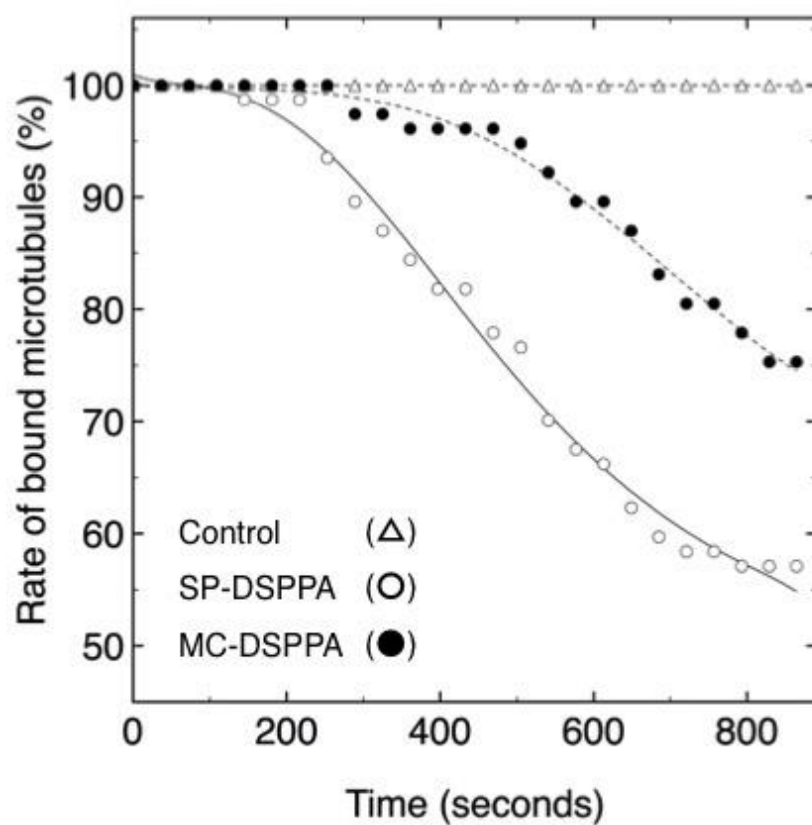


図3-13 DSPPAによるEg5-微小管相互作用の光制御。

微小管滑り運動アッセイで測定した微小管について、測定開始時の個数を100%とした。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。コントロールは5.0% DMFを含む条件である。

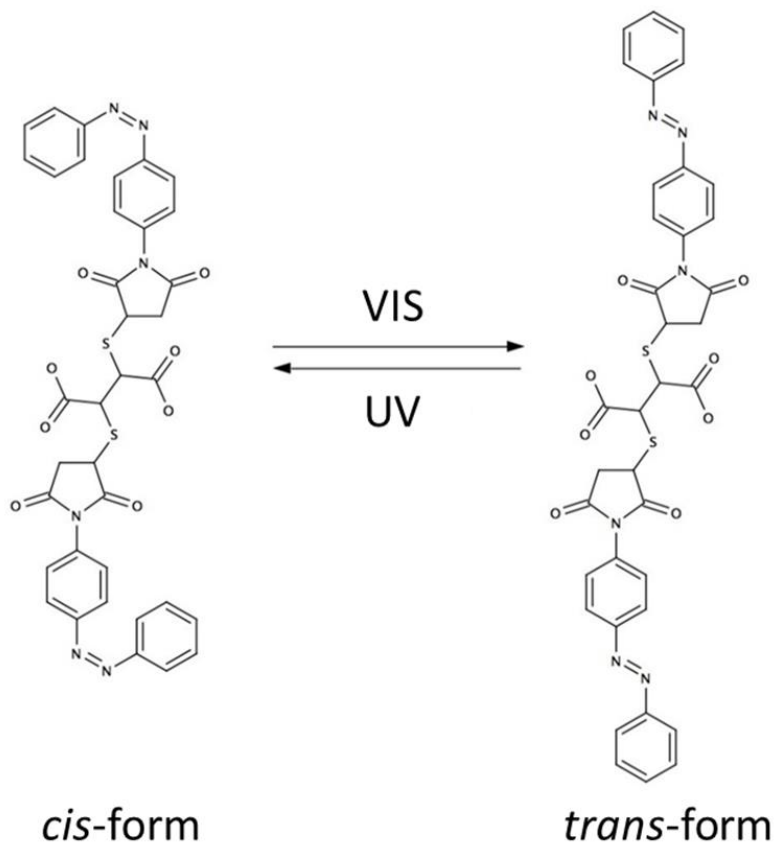
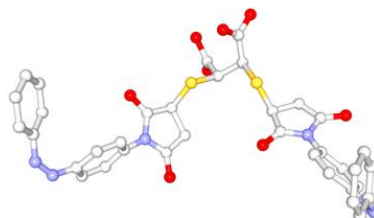
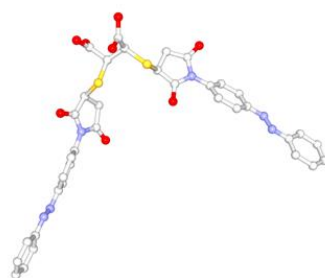


図 3-14 フォトクロミック Eg5 阻害剤 ; BDPSB の光異性体の化学構造式。

可視光照射 (VIS) によって trans-体、366 nm 紫外光照射によって cis-体へ光異性化する。左側に化学構造式を、右側に計算ソフトによって決定した立体的な構造の予想図を示す。

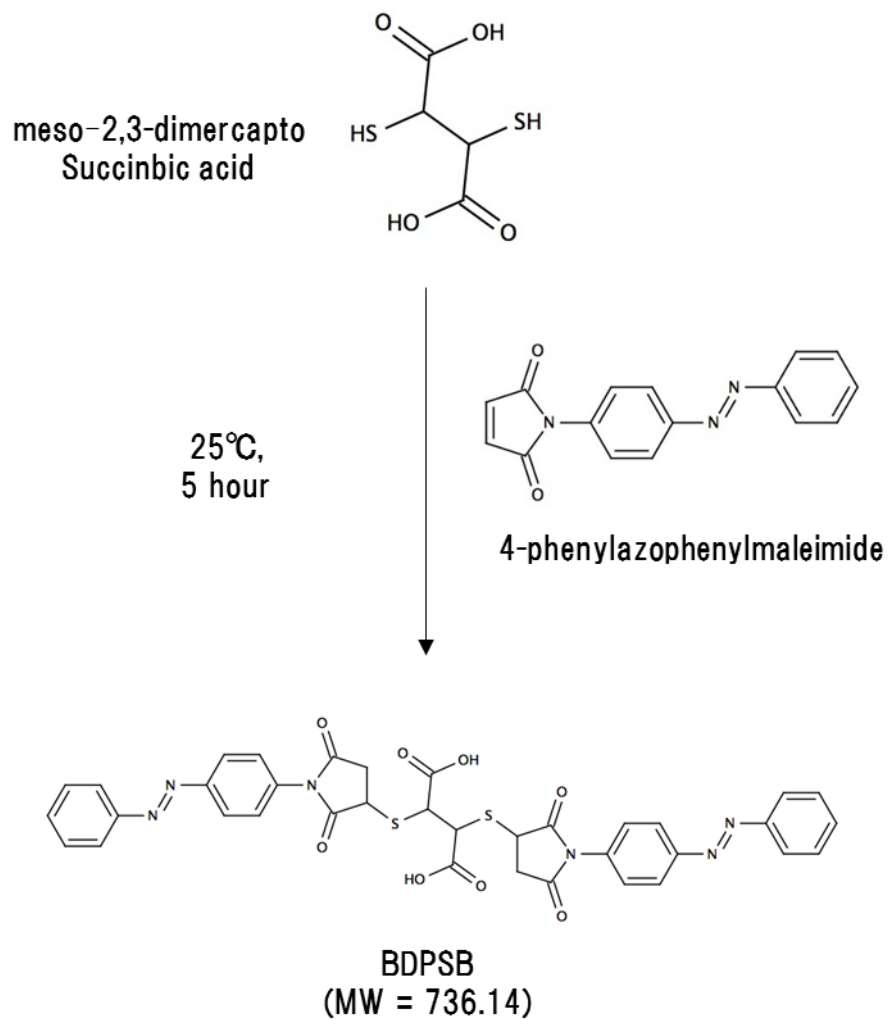


図3-15 フォトクロミックEg5阻害剤：DSPPAの合成。

SP-COOHの合成はChen J [74]の方法にしたがって行った。合成の詳細については第3章3.3.9に記した。

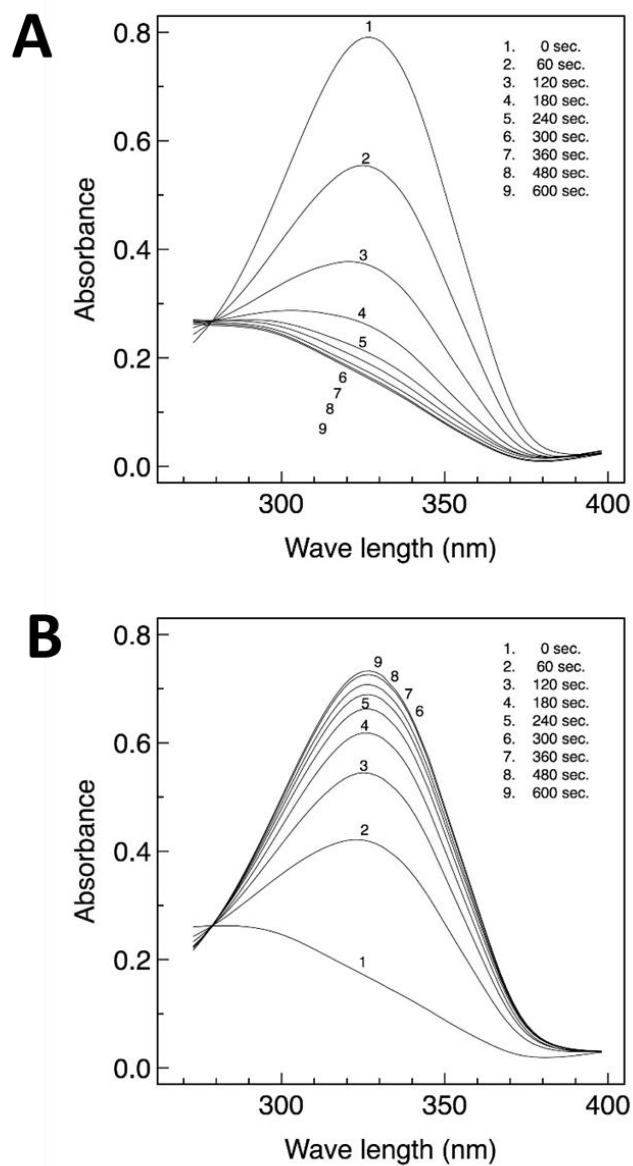


図 3-16 BDPSB の光異性化に伴う吸光スペクトル変化。

BDPSB は非極性溶媒の DMF で $10.0 \mu\text{M}$ に希釈した。(A) 366 nm 紫外光照射による trans 体から cis 体への時間依存的な光異性化。(B) 可視光照射による trans 体から cis 体への時間依存的な光異性化。

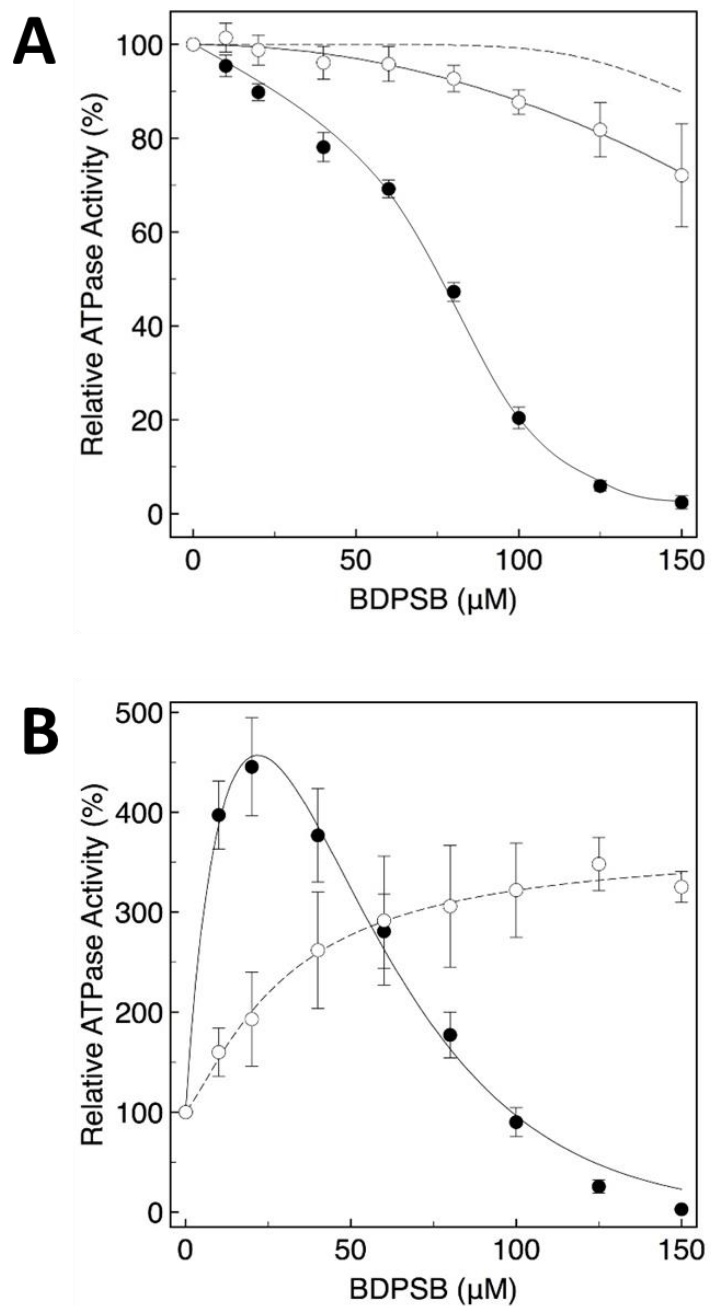


図3-17 BDPSBによるEg5 ATPase活性の光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は3. 3. 11に記した。（A）BDPSB光異性体の微小管依存性 Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。（B）BDPSB光異性体のBasal Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

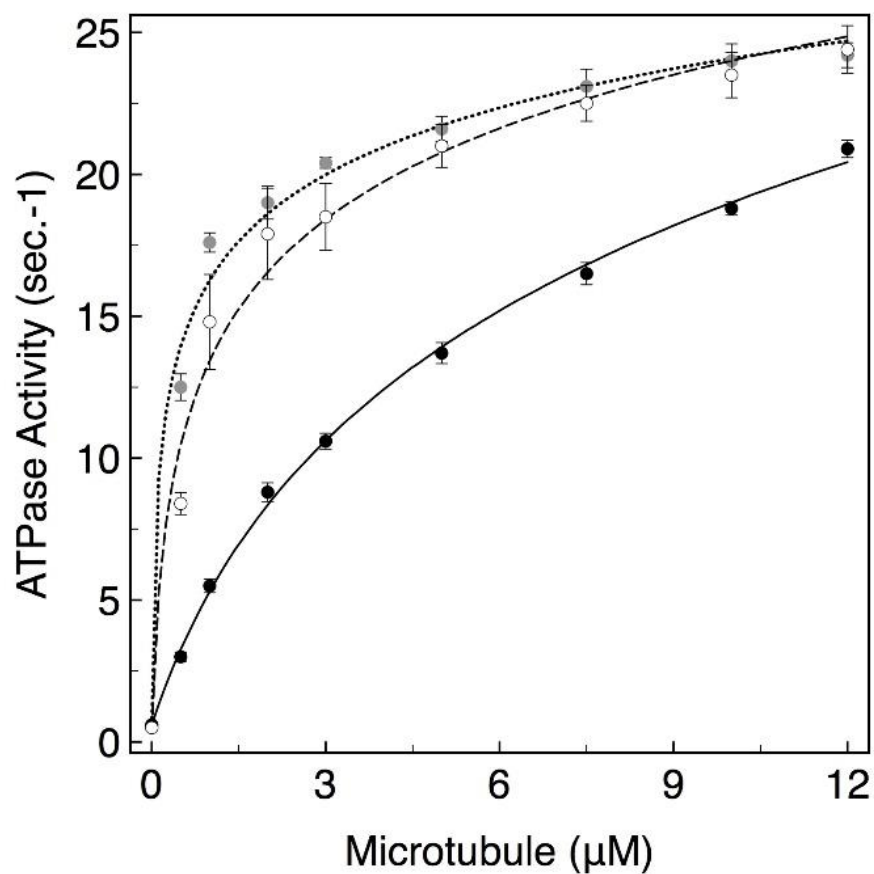


図3-18 BDPSB存在下における微小管濃度依存的Eg5 ATPase活性に対する阻害効果。

活性評価の条件は3. 3. 11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S. D) を示す。BDPSB濃度は80 μMで実施した。

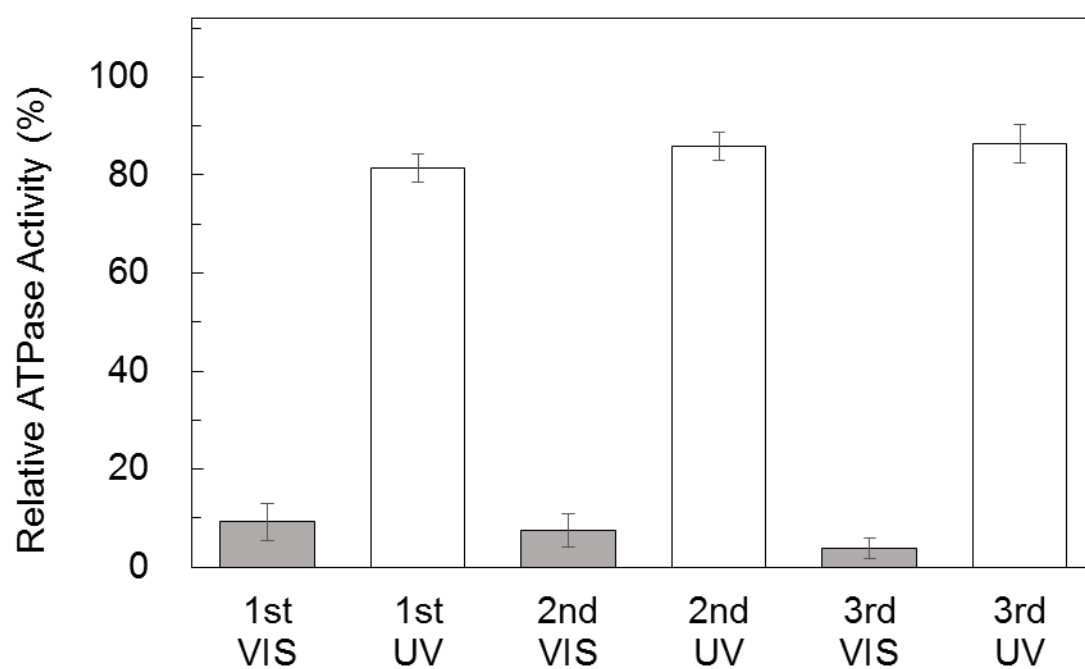


図3-19 BDPSBによるEg5 ATPase活性の可逆的な光制御。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。活性評価の条件は3.3.11に記した。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S.D) を示す。BDPSB濃度は100 μ Mで行った。

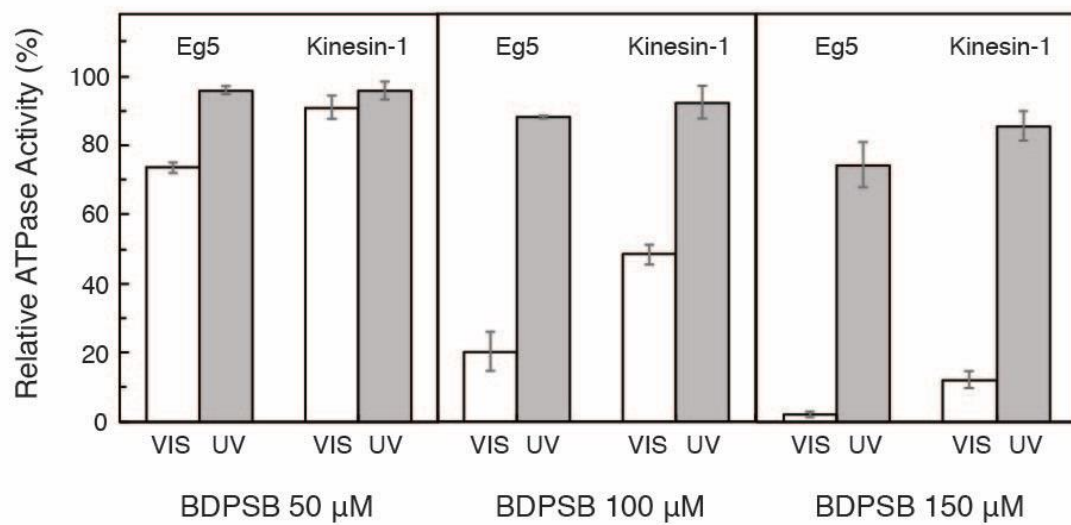


図3-20 BDPSBのEg5 ATPase活性に対する特異性。

ATPase活性はコントロールのときの値を100%とした。データは3回測定し、その平均値と標準偏差 (S. D) を示す。活性評価の条件は3. 3. 11に記した。

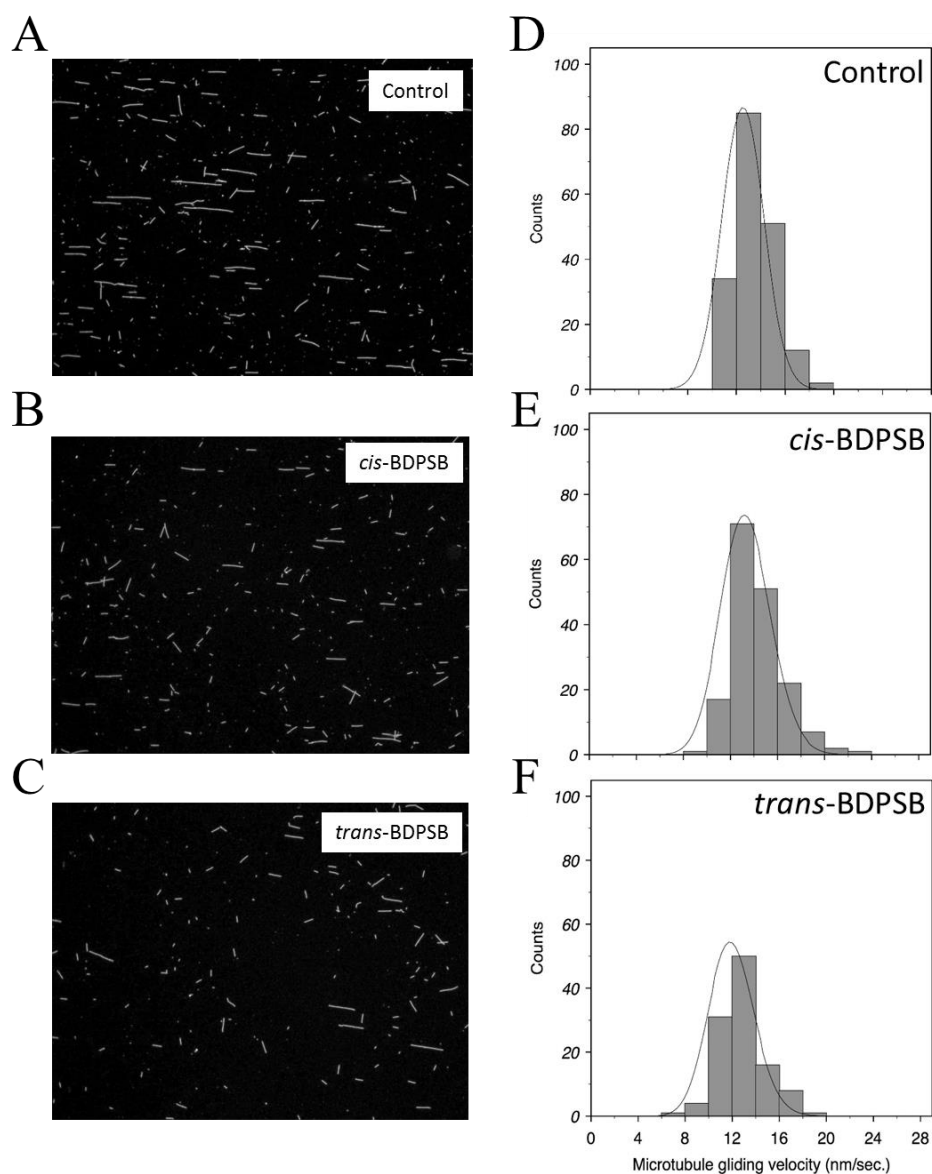


図3-21 50 μM BDPSBによるEg5モーター活性の光制御。

モーター活性は微小管速度の分布から測定した。横軸は微小管の滑り運動速度を示す。

(A-C)は微小管貼り付け操作直後における、フローセル内の様子を蛍光顕微鏡で撮影した写真を示す、(D) 5.0% DMF、(E) 50 μM *cis*-BDPSB、(F) 50 μM *trans*-BDPSB存在下における個々の微小管滑り運動速度を度数分布にした。

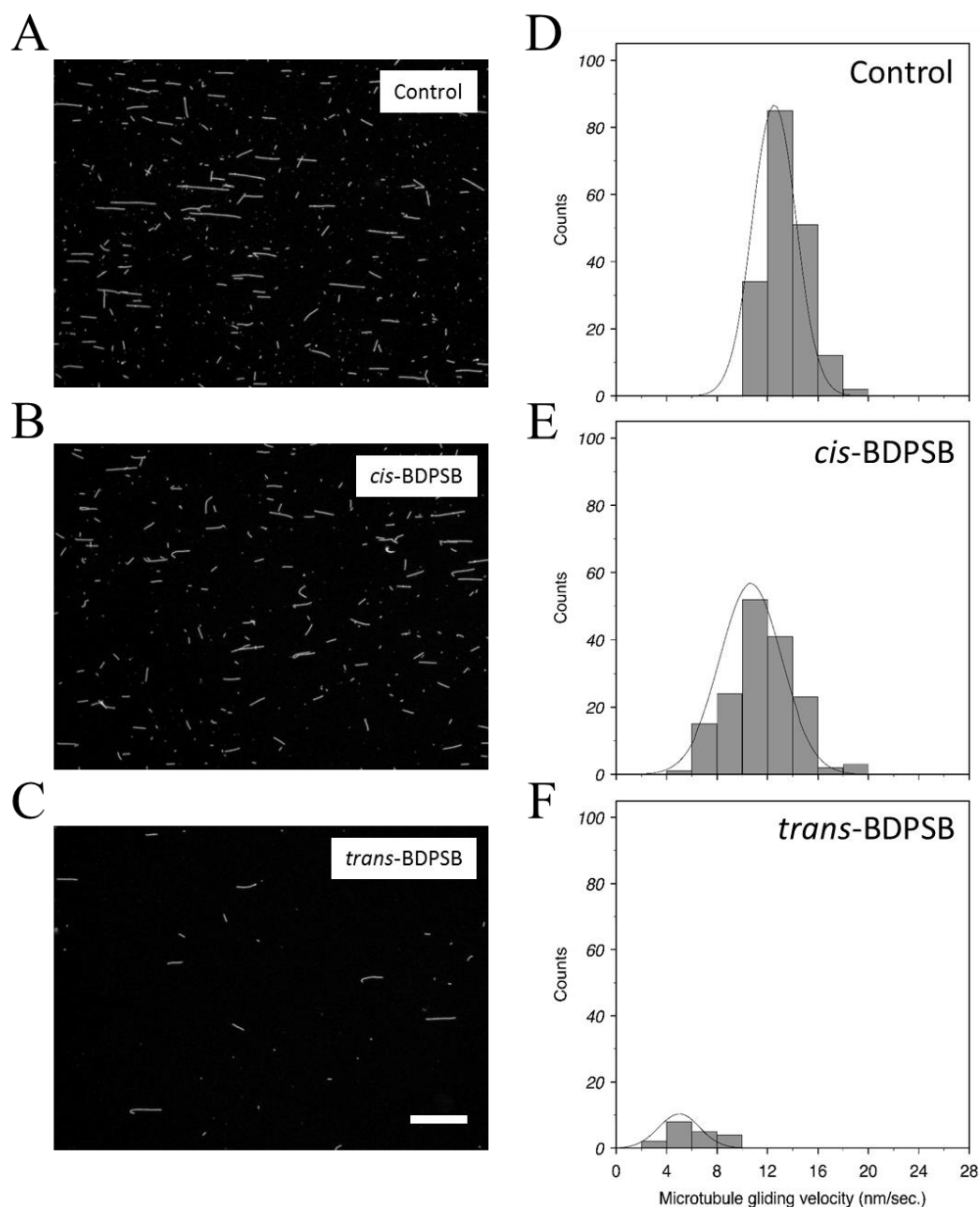


図3-22 100 μM BDPSBによるEg5モーター活性の光制御。

モーター活性は微小管速度の分布から測定した。横軸は微小管の滑り運動速度を示す。

(A-C)は微小管貼り付け操作直後における、フローセル内の様子を蛍光顕微鏡で撮影した写真を示す、(D) 5.0% DMF、(E) 100 μM *cis*-BDPSB、(F) 100 μM *trans*-BDPSB存在下における個々の微小管滑り運動速度を度数分布にした。

第4章

総括と展望

4.1 総括

本研究はスピロピランまたはアゾベンゼンを2つ導入したフォトクロミック Eg5 阻害剤を用いて、Eg5 活性の光制御効率を向上させることに成功した。Eg5 阻害剤の多くは、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスと Loop L5 から構成された阻害剤結合部位を標的として、ADP 放出とモーター活性を抑制する。一方で、PVZB1194 や BI8 といった比較的新しい Eg5 阻害剤の一部には、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスで構成された別の阻害剤結合部位を標的としている。Eg5 阻害剤は数多く存在しているが、その構造類似性や Eg5 の阻害機構には不明瞭な点も多い。これまでところ、Eg5 の阻害剤結合部位が他のキネシンには見られないことや、loop L5 によるアロステリック変化が阻害活性に重要であることは共通している。また、阻害機構の解明のためには Eg5 の生化学的特徴のさらなる理解も必要となる。本研究で合成したフォトクロミック Eg5 阻害剤は、Eg5 の阻害に関して既知の阻害剤と同程度の作用を示した。これらのフォトクロミック阻害剤は Eg5 活性の高効率な光制御を可能とした。さらに、STLC や BI8 などとは異なる阻害機構を持つ可能性も、生化学的な実験結果から予想された。Eg5 活性の光制御が可能となったことで、これを利用した阻害機構の解析も期待される。

第2章では、単一のスピロピランから既存の Eg5 阻害剤である STLC、ispinesib フォトクロミックアナログを合成/設計した。これらの阻害剤はスピロピランの極性と構造変化による光制御を狙って設計した。STLC アナログである L-cys-IASP は比較的、阻害活性と光制御に有意な結果を得られたが、室温下でも自己触媒作用による分解が起きる不安定な構造であった。L-cys-MASP は極めて高い阻害活性とその光制御に成功したが、微小管と Eg5 の結合部位を標的としていた。特に、Basal ATPase 活性にほとんど無効であったことから、キネシンと微小管の結合阻害剤であることと推測された。STLC アナログに代えて、ispinesb アナログとして SP-APA, SP-ABA, SP-lisine の異なる長さのアミノプロピルを持つフォトクロミック阻害剤を合成した。SP-ABA で最も阻害活性と光制御の差異が認められたが、Eg5 に対するアフィニティは非常に低かった。

第3章では、光異性体間で大きな阻害活性の差を得るためにスピロピランまたはアゾベンゼンを2つ導入した DSPPA を合成した。生化学的実験結果から、DSPPA は Eg5 活性とモーター活性の両方を阻害した。阻害活性は SP 型で MC 型を大きく上回り、光制御の効率も向上した。しかしながら、微小管に対する Eg5 の K_{mt} と V_{max} は DSSPA 存在下で光可逆的に減少した。DSPPA の阻害曲線は S 字型を示し、これは Eg5 に対して DSPPA が少なくとも2か所以上の結合部位を持つことを示唆した。DSPPA によるモーター活性の光制御は、ATPase 活性の結果から期待されたほど、有意に行われなかった。一方でモーター活性によって運動する微小管の解離が時間依存的に見られたことから、DSPPA は微小管と Eg5 の相互作用も光制御している可能性が示唆された。PVZB1194 や GSK-1 といったアゾベンゼンに類似した Eg5 阻害剤が報告されていることから、2つのアゾベンゼンを導入したフォトクロミック阻害剤 BDPSB を合成した。BDPSB の微小管依存性 ATPase 阻害活性は、DSPPA と比較して10倍以上低下したが、光制御の効率は劇的に向上した。trans-体で見られる阻害活性は、cis-体ではほとんど見られなかった。このことは、BDSPB が Eg5 活性の光スイッチとして十分に機能したことを示唆した。さらに興味深いことに、微小管非存在下における Basal ATPase 活性では BDPSB によって Eg5 活性の亢進が見られた。この亢進作用も、光可逆的に制御されており、trans-型では 25 μ M 付近をピークに減少し、100 μ M 以上では阻害作用に転じていた。また、微小管滑り運動の結果から微小管の結合とモーター活性の両方が光可逆的に制御された。したがって、BDPSB を用いることで Eg5 活性はほぼ完全に光制御することに成功した。

4.2 課題と展望

2つのフォトクロミック Eg5 阻害剤、DSPPA と BDPSB は異なるフォトクロミック分子を利用したにも関わらず微小管依存性 ATPase 活性に対する阻害曲線はS字形となった。また、Basal ATPase 活性において、DSPPA で阻害、BDPSB では促進作用がそれぞれ見られたことから、これらのフォトクロミック阻害剤は微小管ではなく Eg5 に結合していることは明らかである。したがって、本研究では合成されたフォトクロミック Eg5 阻害剤は Eg5 に対して2つの結合部位を持っていることが強く示唆された。また、微小管滑り運動においてキネシン Eg5 と微小管の結合が光可逆的に阻害された。阻害剤が結合した Eg5 が、微小管に影響する現象については、BRD9876 による Eg5 活性の阻害を介して、Eg5 による微小管のチューブリンポリマーの安定化を破壊することが報告されている[87]。また同グループでは、細胞レベルでも Eg5 の不活性化が微小管自体の構造安定性に影響することを示唆している。PVZB1194 や BI8 による Eg5 の阻害は、ヌクレオチド結合部位に結合しないにも関わらず、ATP 競合型の阻害を示す[57, 88]。これは阻害剤が結合したことで、Eg5 の構造が ATP 結合状態に変化(アロステリック変化)したことが原因であること示唆されている。その結果、STLC などが Eg5・ADP 状態で微小管との相互作用が弱くなる一方で、微小管との相互作用は強くなる。これらの報告と DSPPA, BDPSB の微小管に対する阻害効果を考慮すると、Eg5 への阻害剤結合が微小管との相互作用部位にアロステリックな変化を誘導していることも十分に考えられる。

DSPPA と BDPSB の Eg5 に対する結合部位として、既存の $\alpha 2$, $\alpha 3$ ヘリックスと loop L5 で構成された結合部位 (仮に STLC 結合部位と呼称)、 $\alpha 4$, $\alpha 6$ ヘリックスで構成された結合部位 (仮に PVZB1194 結合部位と呼称)、または微小管結合部位の3カ所が予想される(図4-1)。BI8 のように、Eg5 に対して2つの結合部位 (STLC 結合部位と PVAB1194 結合部位)を持つ阻害剤があることから[56]、BDPSB と DSPPA も上記2つの結合部位を持つと考えられる。しかしながら微小管と Eg5 の相互作用への阻害剤の効果を考慮すると、PVZB1194 結合部位は相互作用を強くすることから、相互作用を阻害する BDPSB や DSPPA は STLC 結合部

位または微小管結合部位を標的とする可能性が高いと予想された。一方で、BDPSB に関しては、Basal ATPase 活性の結果から微小管アナログのような機能を持つことも推測される。BDPSB が微小管のキネシン触媒作用のようにはたらく場合、ATPase 活性の亢進が起きたと予想できる。いずれにせよ、阻害剤の結合部位に関しては既存の報告例を含めて、新規の可能性も考えた結合部位の特定が必要である。

BDPSB と DSPPA が Eg5 と微小管との相互作用を阻害する点は、既存の Eg5 阻害剤には見られない。したがって、BDPSB と DSPPA は既存の STLC や PVZB1194 と異なる阻害機構を有している可能性は、阻害剤の結合部位と同様に非常に高い。Eg5 阻害剤による阻害機構は、STLC や Monastrol などの初期に報告された化合物については、よく議論と理解が進んでいる。しかしながら、他に報告された多くの阻害剤については、十分な阻害機構の分子レベルでの解析は進んでいない。新たな阻害剤結合部位が発見されたように、これらの Eg5 阻害剤は結合部位を共有するが、ATP 加水分解サイクルにともなう構造レベルでの阻害機構には違いがあると考えられる。図 4-2A は、これまでに解明された Eg5 阻害剤が Eg5 の ATPase サイクルをどの段階で停止させているか、図に示したものである。前述のように、各阻害剤が Eg5 ATPase サイクルのどの段階に影響しているかには、違いがある。STLC は微小管との相互作用が弱い ADP 放出の段階を阻害している。一方、Ispinesib や Monastrol は ADP・Pi 状態からリン酸イオン (Pi) を放出し、ADP 状態になる段階を阻害していると予想される。また、結合部位が異なる PVZB1194 は微小管との相互作用が強くなる ATP 結合の段階を阻害している。山本ら[89]は石川が合成したアゾベンゼン STLC アナログ ACTAB が、蛍光標識 ATP を使用した速度論的解析を用いて、ATP 加水分解の段階を阻害している可能性を示唆した。本研究で合成した DSPPA と BDPSB は、いずれも Eg5 と微小管の相互作用も阻害したことから、Eg5・ADP 状態における微小管結合ステップに影響したと推測された(図 4-2B)。阻害剤の結合部位と合わせ、阻害機構が明らかとなれば、光制御の効率が向上した仕組みを理解することが可能である。

フォトクロミック Eg5 阻害剤による Eg5 活性の光制御に成功したが、次の目標として細胞分裂の光制御を試みている。図 4-3 は石川らが合成したフォトクロミック Eg5 阻害剤である ACTAB を用いた、細胞分裂の光制御の予備的実験結果である。アゾベンゼン由来の ACTAB は細胞培養条件の 37°C では trans-体として安定的に存在してしまうため、一定間隔で 400 nm の青色 LED 光を照射して cis-体を維持した。Hela 細胞は 10%牛胎仔血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を 6-well plate に播種したものを、24 時間培養してから使用した。培養 24 時間後に、DMSO に溶解したフォトクロミック Eg5 阻害剤を 0.20% 含む 10%FBS/DMEM で培地を全量交換した。そのため、細胞周期の同期などの処理は行っていない。Hela 細胞を 20 μ M ACTAB 存在下で培養した結果、48 時間後の増殖率に変化が見られた (図 4-3)。興味深いことに、in vitro では trans-体の方が cis-体よりも阻害活性が高いにも関わらず[20]、in vivo では逆転した。これは cis-体に光異性化したことで、細胞膜透過性が変化したためと推測される。図 4-4 は実際に 20 μ M ACTAB で 48 時間処理した Hela 細胞の紡錘体形成を観察した結果である。Trans-ACTAB ではコントロールと同じように双極紡錘体が多く見られた。しかし、cis-ACTAB では STLC 処理などで Eg5 活性を阻害したときに見られる単極紡錘体が観察された。未だ統計学的な処理や細胞周期の解析などは継続中であるが、フォトクロミック Eg5 阻害剤を用いた細胞分裂の光制御が可能であることが示された。本研究で合成した DSPPA に関しては、同様に HeLa 細胞への添加を行ったが、どちらの光異性体でも細胞への影響は見られなかった (data not shown)。細胞内への導入には何らかの工夫が必要であるが、ACTAB を含め、細胞分裂の光制御はフォトクロミック阻害剤で可能であることが推測された。

フォトクロミック Eg5 阻害剤による Eg5 活性の光制御の成功は、フォトスイッチング機構を持ったナノデバイスによる生体分子及び細胞機能の光制御に向けての基礎的な研究結果を提供した。図 4-5 に示したように、光スイッチング機構とを持ったナノデバイスは 3 つのアプローチが計画される。本研究は、(1) で示したフォトクロミック阻害剤を介した“間接的な”方法による生体分子や細胞機能の制御である。石川らが確立した ACTAB よりも、

2つのフォトクロミック分子を同時に導入することで高効率なフォトクロミック Eg5 阻害剤によって本アプローチは一定の成果を得た。また、岩田らはケージド化合物を用いて G タンパク質の 1 つで細胞内シグナル伝達に重要な Ras タンパク質の多量体形成を、光制御することに成功した[90]。これらの光スイッチングナノデバイスは、間接的または直接的な方法で生体分子を制御するが、(3) は光応答性タンパク質と Eg5 を組み合わせ、光制御可能な生体分子を合成するアプローチである。(1)、(2) のアプローチによる生体分子の光制御に成功したことから、(3) による直接的な光制御は十分可能であると考えられる。本研究で開発したフォトクロミック阻害剤を外部制御因子として応用すれば、より複雑な光制御が可能なバイオナノマシンとなりえる。

付図・付表

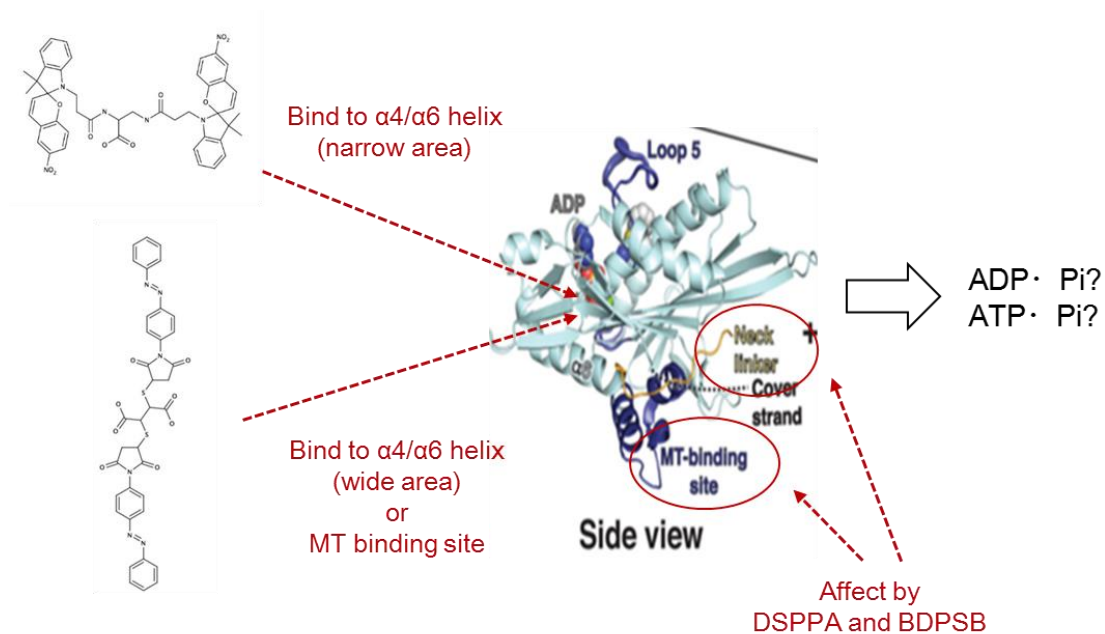
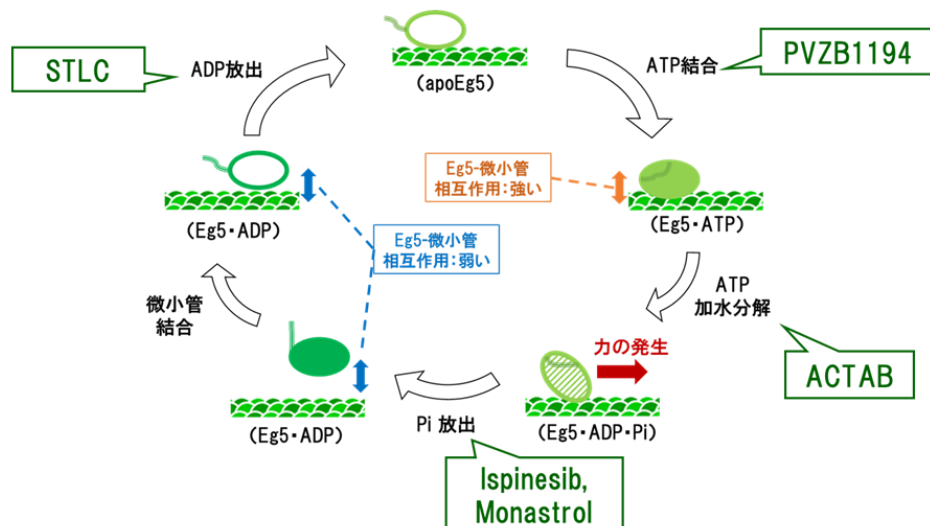


図 4-1 DSPPA 及び BDPSB の Eg5 阻害剤結合部位の考察。

DSPPA と BDPSB は $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ヘリックスと loop L5 で構成された“STLC 結合部位”と、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ ヘリックスで構成された“BI8 結合部位”の両方あるいはどちらかに優先的に結合すると予想される。BI8 結合部位を標的としている場合は、周辺の微小管結合部位 (MT-binding site) や Neck リンカーの構造変化に影響していると推測される。

A



B

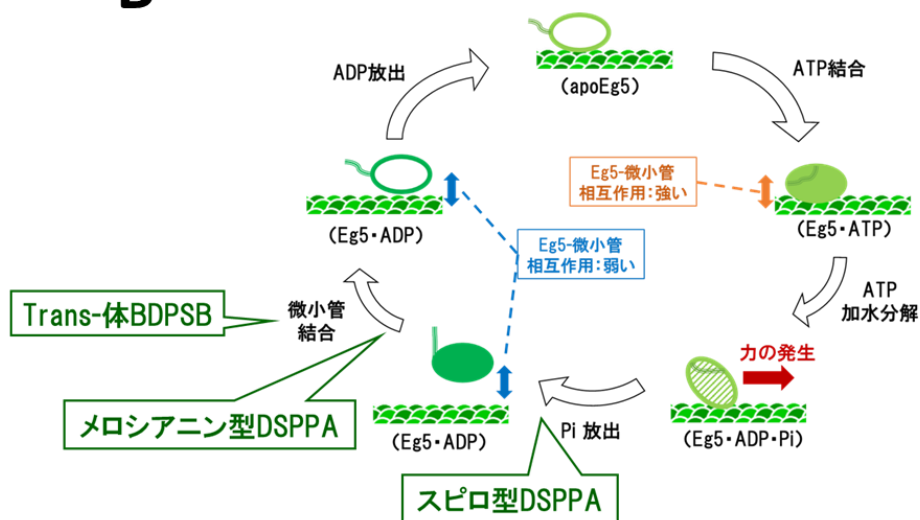


図 4-2 DSPPA 及び BDPSB の Eg5 阻害機構の仮説。

キネシンの機械的な仕組みはA T P加水分解サイクルと同調している。主に、ATP 加水分解の各段階において、キネシンの構造と、それに伴う微小管との相互作用が変化する。(A) 既存の Eg5 阻害剤 (Ispinesib, Monastrol, PVZB, STLC) 及びフォトクロミック Eg5 阻害剤 (ACTAB) が阻害する ATPase サイクルの段階の模式図。(B) 本研究で扱ったフォトクロミック阻害剤 (DSPPA, BDPSB) が阻害すると予想される ATPase サイクルの段階の模式図。

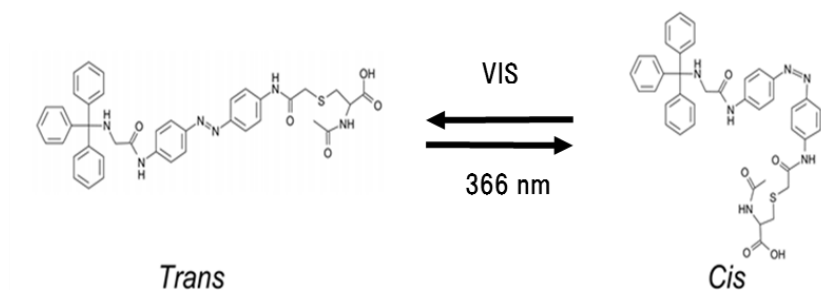
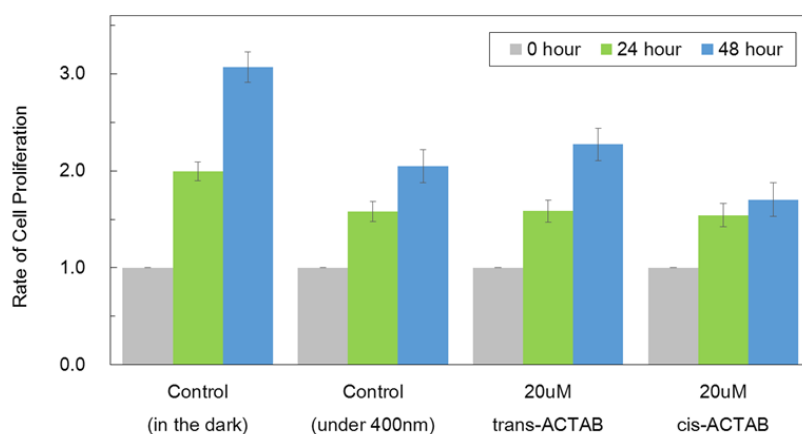
A**B**

図 4-3 フォトクロミック Eg5 阻害剤 ACTAB による細胞増殖の光制御.

HeLa 細胞は 10% 牛胎仔血清 (FBS) を含む DMEM 培地で培養した。継代後 48 時間、細胞を前培養したあと、0.2% DMSO (コントロール) または 20 μ M ACTAN を含む培地に全交換して 48 時間培養を行った。trans-ACTAB は 37°C の細胞培養条件では安定して存在する。Cis-ACTAB は 30 分に 3 分間、400 nm LED 光を照射することで光異性化を保った。0、24、48 時間後の細胞増殖数は 4 か所の定点観察写真から測定した。培地を全交換して 2 時間後を 0 時間とし、そのときの細胞数を 1.0 として増殖率を計算した。(A) アゾベンゼン由来 STLC アナログ; ACTAB の光異性化と化学構造式。(B) 20 μ M ACTAB 存在下における HeLa 細胞の増殖率。

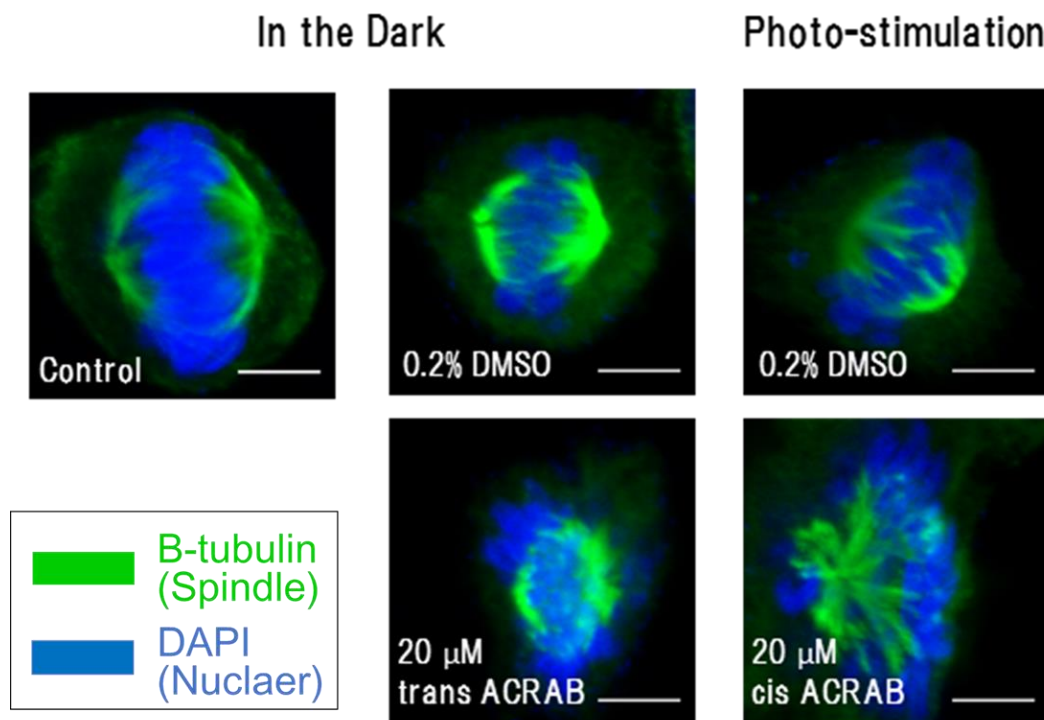


図 4-4 フォトクロミック Eg5 阻害剤 ACTAB による紡錘体形成の光制御。

HeLa 細胞の培養方法は図 4-3 に同じである。培養 48 時間後、細胞を 0.4% PFA で固定し、0.1% Triton X-100 で処理したら免疫蛍光染色を行った。紡錘体を形成する微小管は一次抗体にマウス IgG α/β チューブリンを、二次抗体に Alexa488 を使用した。染色体は DNA を染色する DAPI と用いて検出した。免疫染色後、共焦点顕微鏡 (Leica SP8) を用いて各条件で培養した HeLa 細胞を観察した。緑色は紡錘体、青色は染色体をそれぞれ示す。スケールバーは全て 5 μm である。

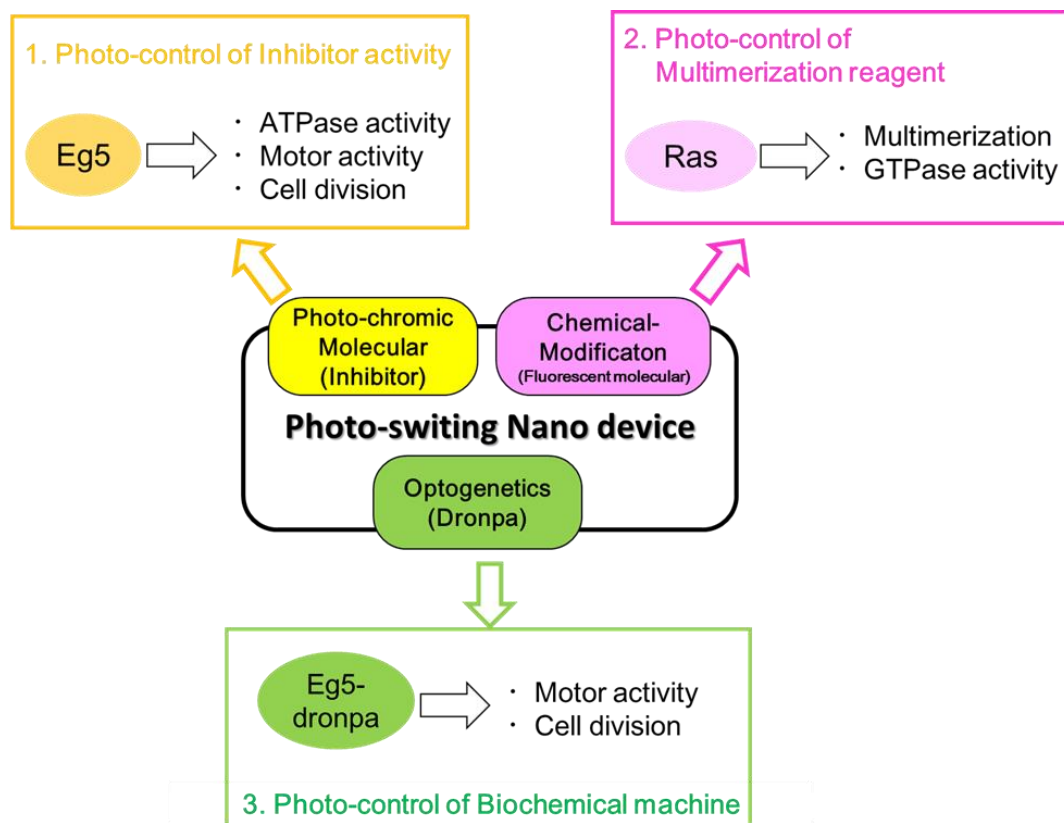


図 4-5 光スイッチングナノデバイスによる生体分子の光制御に関する 3 つのアプローチ。石川 (Ishikawa, 2014 [20]) 及び本研究で扱ったフォトクロミック阻害剤は、間接的な Eg5 の光制御が十分に可能であることを証明した (1. Photocontrol of inhibitory activity)。化学修飾法は、岩田 (岩田, 2015 [90]) によって多量体の形成の光制御が可能であることを示した (2. Photocontrol of Multimerization reagent)。1 と 2 のアプローチは化学物質を用いる手法であり、光応答性タンパク質などの Optogenetics による生体分子機械の制御も、機械的仕組みに対する導入によって可能である (3. Photocontrol of Biochemical machine)。

参考文献

- 1 Woehlke G, Schliwa M. (2000) Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:50-8
- 2 Vale RD, Milligan RA. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288:88-95.
- 3 Carter AP (2013) Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *J Cell Sci.* 126:705-13
- 4 Kato Y, Miyakawa T, Tanokura M. (2017) Overview of the mechanism of cytoskeletal motors based on structure. *Biophys Rev.* 10:571-581
- 5 Martin G. L. van den Heuvel, Cees Dekker (2007) Motor Proteins at Work for Nanotechnology. *Science.* 317:333-336
- 6 Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science.* 299:1743-7.
- 7 Edward S Boyden, Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel & Karl Deisseroth (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nature Neuroscience.* 8:1263-1268
- 8 Stéphanie Cabantous, Hau B. Nguyen, Jean-Denis Pedelacq, Faten Koraïchi, Anu Chaudhary, Kumkum Ganguly, Meghan A. Lockard, Gilles Favre, Thomas C. Terwilliger & Geoffrey S. Waldo (2013) A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association. *Scientific Reports.* 3:2854
- 9 Satoshi Habuchi, Ryoko Ando, Peter Dedecker, Wendy Verheijen, Hideaki Mizuno, Atsushi Miyawaki, and Johan Hofkens (2005) Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *PNAS.* 102:9511-9516
- 10 Karl Deisseroth (2011) Optogenetics. *Nature Methods.* 8:26-29
- 11 Irie M. (2000) Photochromism: Memories and switches. *Chem. Rev.* 1683-1684
- 12 Levitus M., Aramendia P.F. (1999) Photochromism and Thermochromism of Phenanthrospiropyrans in Poly(Alkyl Methacrylates). *J. Phys. Chem. B.* 1864-1870
- 13 Andersson J, Li S, Lincoln P, Andréasson J (2008) Photoswitched DNA-binding of a photochromic spiropyran. *J Am Chem Soc.* 130:11836-11837
- 14 Hammarson M, Andersson J, Li S, Lincoln P, Andréasson J. (2010) Molecular AND-logic for dually controlled activation of a DNA-binding spiropyran. *Chem Commun.* 46:7130-7132
- 15 C Dohno, S Uno, K Nakatani. (2007) Photoswitchable molecular glue for DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:11898-11899
- 16 G.A. Woolly. (2005), Photocontrolling peptide alpha helices. *Acc. Chem. Res.* 38, 486-493
- 17 Yamada MD, Nakajima Y, Maeda H, Maruta S. (2007) Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *J Biochem.* 142:691-8
- 18 Nomura A, Uyeda TQ, Yumoto N, Tatsu Y. (2006) Photo-control of kinesin-microtubule motility using caged peptides derived from the kinesin C-terminus domain. *Chem Commun*

(*Camb*). 34:3588-90

- 19 Kumar KR, Kamei T, Fukaminato T, Tamaoki N. (2014) Complete ON/OFF photoswitching of the motility of a nanobiomolecular machine. *ACS Nano*. 8:4157-65
- 20 Ishikawa K, Tohyama K, Mitsuhashi S, Maruta S. (2014) Photocontrol of the mitotic kinesin Eg5 using a novel S-trityl-L-cysteine analogue as a photochromic inhibitor. *J Biochem*. 155:257-63
- 21 Kull FJ1, Endow SA.J (2013) Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *Cell Sci*. 126:9-19
- 22 Banga I, Szent-Gyorgyi A (1941-1942) Preparation and properties of myosin A and B. IN: Szent-Gyorgyi A (ed) Studies from the Institute of medical chemistry-University of Szeged. Vol. I. S. Karger AG, Basel, 5-15,
- 23 Huxley H, Hanson J (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. 173: 973-976
- 24 Gibbons IR, Rowe AJ. (1965) Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science*. 49:424-6.
- 25 Gilbert SP, Sloboda RD. (1986) Identification of a MAP 2-like ATP-binding protein associated with axoplasmic vesicles that translocate on isolated microtubules. *J Cell Biol*. 103:947-56.
- 26 Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*. 42:39-50.
- 27 Burgess SA, Walker ML, Sakakibara H, Knight PJ, Oiwa K. (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature*. 421:715-8
- 28 Carter AP1, Cho C, Jin L, Vale RD. (2011) Crystal structure of the dynein motor domain. *Science*. 331:1159-65
- 29 Andrew P. Carter (2013) Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *Journal of Cell Science*. 126:705-713
- 30 Roberts AJ, Numata N, Walker ML, Kato YS, Malkova B, Kon T, Ohkura R, Arisaka F, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. (2009) AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell*. 136:485-95
- 31 Vale RD. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol*. 135:291-302.
- 32 Sablin EP1, Kull FJ, Cooke R, Vale RD, Fletterick RJ. (1996) Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature*. 380:555-9
- 33 Kull FJ, Endow SA. (2013) Force generation by kinesin and myosin cytoskeletal motor proteins. *J Cell Sci*. 126:9-19
- 34 Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:682-96.
- 35 Verhey KJ, Hammond JW. (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:765-77

- 36 Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7004-7011
- 37 Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM, Schmidt CF. (2005) The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature.* 435:114-8
- 38 Kapoor TM, Mitchison TJ. (2001) Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. *J Cell Biol.* 154:1125-33.
- 39 Blangy A, Lane HA, d'Hérin 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.* 83:1159-69.
- 40 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.* 163:1109-16.
- 41 Sarli V, Giannis A. (2006) Inhibitors of mitotic kinesins: next-generation antimitotics. *ChemMedChem.* 1:293-8
- 42 Muretta JM, Jun Y, Gross SP, Major J, Thomas DD, Rosenfeld SS. (2015) The structural kinetics of switch-1 and the neck linker explain the functions of kinesin-1 and Eg5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E6606-6613
- 43 Waitzman JS, Rice SE. (2014) Mechanism and regulation of kinesin-5, an essential motor for the mitotic spindle. *Biol Cell.* 106:1-12.
- 44 Troy C. Krzysiak and Susan P. Gilbert. (2006) Dimeric Eg5 Maintains Processivity through Alternating-site Catalysis with Rate-limiting ATP Hydrolysis. *J Biol Chem.* 281: 39444-39454.
- 45 Joshua S. Waitzman, Adam G. Larson, Jared C. Cochran, Nariman Naber, Roger Cooke, F. Jon Kull, Edward Pate, Sarah E. Rice. (2011) The Loop 5 Element Structurally and Kinetically Coordinates Dimers of the Human Kinesin-5, Eg5. *Biophys J.* 101: 2760-2769.
- 46 Oliver Rath and Frank Kozielski. (2012) Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer.* 12:527-39
- 47 Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. (2003) Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene.* 22:3952-63
- 48 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 tumourigenesis. *J Pathol.* 221:221-8
- 49 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.* 29:286:971-974.
- 50 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.* 276:25496-502
- 51 Maliga Z, Xing J, Cheung H, Juszczak LJ, Friedman JM, Rosenfeld SS. (2006) A pathway of structural changes produced by monastrol binding to Eg5. *J Biol Chem.* 281:7977-82

- 52 Skoufias DA, DeBonis S, Saoudi 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.* 281:17559-69.
- 53 Cochran JC, Gilbert SP. (2005) ATPase mechanism of Eg5 in the absence of microtubules: insight into microtubule activation and allosteric inhibition by monastrol. *Biochemistry.* 44:16633-48
- 54 Lad L, Luo L, Carson JD, Wood KW, Hartman JJ, Copeland RA, Sakowicz R. (2008) Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry.* 47:3576-85
- 55 Talapatra SK, Schüttelkopf AW, Kozielski F. (2012) The structure of the ternary Eg5-ADP-ispinesib complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 68:1311-9.
- 56 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.* 135:2263-72.
- 57 Yokoyama H, Sawada J, Katoh S, Matsuno K, Ogo N, Ishikawa Y, Hashimoto H, Fujii S, Asai A. (2015) Structural basis of new allosteric inhibition in Kinesin spindle protein Eg5. *ACS Chem Biol.* 10:1128-36.
- 58 Szymański W, Beierle JM, Kistemaker HA, Velema WA, Feringa BL. (2013) Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem Rev.* 113:6114-78.
- 59 Rau H. (1990) PHotoisomerizaion of azobenzene. J.S. Rebek (Ed.), Photochemistry and Photophysics, CRC Press, Boca Raton
- 60 J.Chen, D.Wang, A.Turshatov, R. Muñoz-Espí, U. Ziener, K. Koynov and K. Landfester. (2013) One-pot fabrication of amphiphilic photoswitchable thiophene-based fluorescent polymer dots. *Plym. Chem.* 4:773-781
- 61 Chen E, Kumita JR, Woolley GA, Kliger DS. (2003) The kinetics of helix unfolding of an azobenzene cross-linked peptide probed by nanosecond time-resolved optical rotatory dispersion. *J Am Chem Soc.* 125:12443-9.
- 62 Angelini N, Corrias B, Fissi A, Pieroni O, Lenci F. (1998) Photochromic polypeptides as synthetic models of biological photoreceptors: a spectroscopic study. *Biophys J.* 74:2601-10.
- 63 Lee H, Wu W, Oh JK, Mueller L, Sherwood G, Peteanu L, Kowalewski T, Matyjaszewski K. (2007) Light-induced reversible formation of polymeric micelles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46:2453-7
- 64 Tischer D, Weiner OD. (2014) Illuminating cell signalling with optogenetic tools. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:551-8
- 65 Tye, K. M. Deisseroth, K. (2012) Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat. Rev. Neurosci.* 13:251-66
- 66 Zhou XX, Chung HK, Lam AJ, Lin MZ. (2012) Optical control of protein activity by

fluorescent protein domains. *Science*. 338:810-814

- 67 Pudasaini A, El-Arab KK, Zoltowski BD. (2015) LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Front Mol Biosci*. 2:18
- 68 Vanneste D, Ferreira V, Vernos I. (2011) Chromokinesins: localization-dependent functions and regulation during cell division. *Biochem Soc Trans*. 39:1154-60
- 69 Wojcik EJ1, Buckley RS, Richard J, Liu L, Huckaba TM, Kim S. (2013) kinesin-5: cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. *Gene*. 531:133-49
- 70 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*. 425:55-60
- 71 Klajn R. (2014) Spiropyran-based dynamic materials. *Chem Soc Rev*. 43:148-84.
- 72 Hackney DD. (1988) Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:6314-8.
- 73 Ishikawa K, Tamura Y, Maruta S. (2014) Photocontrol of mitotic kinesin Eg5 facilitated by thiol-reactive photochromic molecules incorporated into the loop L5 functional loop. *J Biochem*. 155:195-206
- 74 Chen J, Zeng F, Wu S, Zhao J, Chen Q, Tong Z. (2008) Reversible fluorescence modulation through energy transfer with ABC triblock copolymer micelles as scaffolds. *Chem Commun (Camb)*. 43:5580-5582
- 75 Youngburg, G.E. and Youngburg, (1930) M.V. A system of blood phosphorous analysis. *J. Lab. Chin. Med*. 16:158-166
- 76 Howard J, Hyman AA. (1993) Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol*. 39:105-13.
- 77 Y. Kalisky, T. E. Orlowski, and D. J. Williams. (1983) Dynamics of the spiropyran-merocyanine conversion in solution. *J. Phys. Chem*. 87:5333-5338
- 78 Burris HA 3rd, Jones SF, Williams DD, Kathman SJ, Hodge JP, Pandite L, Ho PT, Boerner SA, Lorusso P. (2011) A phase I study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered weekly for three consecutive weeks of a 28-day cycle in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*. 29:467-472
- 79 Wu Y, Sasaki T, Kazushi K, Seo T, Sakurai K. (2008) Interactions between spiropyran and room-temperature ionic liquids: photochromism and solvatochromism. *J Phys Chem B*. 112:7530-7536
- 80 Myers SM, Collins I. (2016) Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. *Future Med Chem*. 8:463-89.
- 81 Luo L, Parrish CA, Nevins N, McNulty DE, Chaudhari AM, Carson JD, Sudakin V, Shaw AN, Lehr R, Zhao H, Sweitzer S, Lad L, Wood KW, Sakowicz R, Annan RS, Huang PS, Jackson JR, Dhanak D, Copeland RA, Auger KR. (2007) ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nat Chem Biol*. 3:722-6
- 82 Steinwand S, Yu Z, Hecht S, Wachtveitl J. (2016) Ultrafast Dynamics of Photoisomerization

- and Subsequent Unfolding of an Oligoazobenzene Foldamer. *J Am Chem Soc.* 138:12997-13005
- 83 Fries KH, Driskell JD, Samanta S, Locklin J. (2010) Spectroscopic analysis of metal ion binding in spiropyran containing copolymer thin films. *Anal Chem.* 82:3306-14
- 84 Angelini N, Corrias B, Fissi A, Pieroni O, Lenci F. (1998) Photochromic polypeptides as synthetic models of biological photoreceptors: a spectroscopic study. *Biophys J.* 74:2601-10
- 85 Maliga Z, Kapoor TM, Mitchison TJ. (2002) Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol.* 9:989-96
- 86 Behrendt R, Renner C, Schenk M, Wang F, Wachtveitl J, Oesterhelt D, Moroder L. (1998) Photomodulation of the Conformation of Cyclic Peptides with Azobenzene Moieties in the Peptide Backbone. *Angew Chem Int Ed Engl.* 38:2771-2774.
- 87 Chen GY, Kang YJ, Gayek AS, Youyen W, Tüzel E, Ohi R, Hancock WO. (2017) Eg5 Inhibitors Have Contrasting Effects on Microtubule Stability and Metaphase Spindle Integrity. *ACS Chem Biol.* 12:1038-1046
- 88 Sheth PR, Shipps GW Jr, Seghezzi W, Smith CK, Chuang CC, Sanden D, Basso AD, Vilenchik L, Gray K, Annis DA, Nickbarg E, Ma Y, Lahue B, Herbst R, Le HV. (2010) Novel benzimidazole inhibitors bind to a unique site in the kinesin spindle protein motor domain. *Biochemistry.* 49:8350-8
- 89 山本龍眞, (2017) 有糸分裂キネシン Eg5 の ATP 加水分解サイクルにおけるフォトクロミック阻害剤の作用機序. 創価大学大学院工学研究科修士論文
- 90 岩田聖悟, (2015) 低分子量 G-蛋白質 Ras の光応答性ナノデバイスを用いた光制御, 創価大学大学院工学研究科博士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、温かい激励とご指導を頂いた創価大学理工学部教授 丸田 晋策先生に心より感謝を申し上げます。また、本論文の審査に当たって、貴重かつ細かなご指導と助言を頂いた創価大学理工学部教授 木暮 信一 先生と、元創価大学理工学部准教授 山之端 万里 先生に心より感謝を申し上げます。

本研究に関する様々な実験について、様々な方からのご指導に感謝申し上げます。

遺伝子操作について、ご指導して頂いた創価大学理工学部准教授 近藤 和典 先生に心より感謝申し上げます。化合物の同定、精製法や FAB-MS の使用方法など、有機合成に関する全般にぎ助言を頂いた創価大学理工学部准教授 新津 隆士先生に心より感謝を申し上げます。哺乳類細胞に関する実験系に関して協力、助言を頂いた長崎大学教授 宮西 隆幸先生と、宮西研究室関係者の方々に心より感謝を申し上げます。留学先のテキサス大学タイラー校での細胞培養系への応用実験に関して、実験環境の提供と研究全般に関して助言を頂いた University of Texas Health Science Center at Tyler, School of Medical Biological Sciences, Mitsuo Ikebe, PHD と、その研究室の関係者の方々には、留学生活における身边のお世話も含め、心より感謝を申し上げます。

本研究を進めるにあたって、丸田研究室の様々な方のご協力に感謝申し上げます。

丸田研究室における様々な先行研究を確立し、助言やご支援を頂いた創価大学卒業生 宍戸 英樹 博士、田中 啓子 博士、梅津 のぞみ 博士、岩田聖悟 博士、石川 久美子 博士に心より感謝を申し上げます。主に Eg5 に関する研究を共に進めた丸田研究室の瀬尾 英雄さん、當山 奏子さん、田村 勇樹さん、山本 龍真さん、高市 真央さん、Islam MD Alrazi さんに心より感謝を申し上げます。

そして、様々な形で激励してくださった創立者 池田 大作 先生と奥様に心より感謝を申し上げます。最後に、大学院入学を快く承諾し、常に見守り応援してくれた祖母と母、弟に心より感謝を申し上げます。