

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15709

研究課題名(和文) モータータンパク質が駆動する細胞分裂の光操作法

研究課題名(英文) Development of photocontrol techniques for cell division driven by motor proteins

研究代表者

松尾 和哉 (Matsuo, Kazuya)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：90764952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパク質は、ATPを加水分解することで生じた化学エネルギーを、動きに変換できるタンパク質であり、細胞分裂などのダイナミックに「動く」生命現象に深く関与する。本研究では、細胞が分裂する過程で機能するモータータンパク質であるCENP-Eやミオシンを、外部刺激(光や還元刺激など)によって制御できる阻害剤を開発することで、染色体の動きや細胞質分裂を操作することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したケミカルツール(外部刺激応答性CENP-E阻害剤やミオシン阻害剤)を利用し、細胞分裂を通じて次世代へと系譜する性能を自在に操作することで、細胞運命を元の細胞から劇的に変化させる手段となる。これにより、種々の疾患モデル細胞を構築する方法や、疾患状態にある細胞を正常な状態へと細胞レベルで治療する方法など、新たな細胞工学法の開発に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Motor proteins are the energy converters of chemical energy generated by ATP hydrolysis into mechanical movement. They are deeply involved in the dynamic biological phenomena such as cell division. In this research, we developed the CENP-E and myosin inhibitors controllable with external stimuli (such as light and reductive stimuli), which enabled to control the cell division.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：外部刺激 光異性化 阻害剤 モータータンパク質 細胞分裂

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は、1つの親細胞が2つ以上の娘細胞へ分かれる現象である。遺伝情報の発現や伝達などの中心的な役割を果たす染色体が複製され、等分配した後、細胞質が分裂するという一連の動的なプロセスが極めて高い正確性で達成されている。通常の体細胞分裂では、均一に対称分裂し、全く等しい性質を有する2つの娘細胞を得る。しかし、染色体や細胞質が不均一に分配される非対称性細胞分裂が生じると、細胞の性質・運命が劇的に異なる娘細胞が生まれ、細胞が異常に分化する要因となる。

細胞分裂はモータータンパク質の「力」によって駆動される。モータータンパク質とは、キネシンのように、ATPの加水分解により得られる化学的なエネルギーをメカニカルな動きに変換できるタンパク質であり、核分裂(特に染色体の配列)ではCENP-E (Centromere-associated protein E) が主体的に機能し、細胞質分裂ではミオシンが機能する。

CENP-Eは、キネトコアに局在するキネシン様タンパク質であり、染色体を赤道面に配列させる。CENP-E阻害剤やsiRNA法による選択的なknockdownを利用し、CENP-Eを阻害すると、複数の染色体が赤道面に整列せず、紡錘体極付近に異常配置することがよく知られている (K. W. Wood *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 5839.)。

また、代表的なモータータンパク質であるミオシンは主に細胞質分裂で駆動し、アクチンを収縮させることで細胞の形や分裂溝の位置を制御している。特に、細胞中央部分において、ミオシンが駆動し、収縮環(リング状のバンドル構造)がくびれ切れることで、細胞質が分離する(細胞質分裂)。このミオシンを阻害すると、細胞分裂がうまく進行せず、非対称な極の収縮や二核化による細胞の癌化が顕著に現れることが知られる (A. F. Straight *et al. Science*, **2003**, *299*, 1743. や E. Paluch *et al. Nature*, **2011**, *476*, 462.)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞核分裂・細胞質分裂で機能するモータータンパク質であるCENP-Eやミオシンの機能に着目し、これを制御することで、細胞分裂を操作する。細胞において、標的タンパク質の活性を制御するためには、操作性・時空間制御能に優れた外部刺激を用いるのが、最適であると考えた。そこで、外部刺激応答性のモータータンパク質(CENP-Eやミオシン)阻害剤を開発し、これを用いて、標的タンパク質を意のままに制御することで、細胞分裂を自在に操作することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

外部刺激に応答して機能する阻害剤を開発するため、「光刺激」と「還元刺激」に着目した。「光」は、操作性・時空間制御能に優れた非侵襲的な外部刺激であり、ピンポイントに操作することができる。「還元環境」は、化学的な薬剤投与によって誘導したり、酵素によって誘導できるため、刺激量のコントロールが容易である。本研究で重点的に検討した、光刺激に応答するCENP-E阻害剤と還元刺激に応答するミオシン阻害剤に関して、以下に詳細を記載する。

①光制御型 CENP-E 阻害剤に関して

これまで、キネシンの阻害剤に基礎的なフォトクロミック分子であるアゾベンゼンを導入し、可逆的な *cis-trans* 光異性化反応に応じてキネシンの動きを光スイッチングする手法を開発した (Org. Biomol. Chem., **2016**, *14*, 7202. など)。アゾベンゼンは、紫外光の照射により「ねじれ」構造の *cis* 体を生成し、可視光照射によって平面性の高い *trans* 体を生成する。この光照射に応じた大きな構造変化を利用し、阻害剤構造中にアゾベンゼン骨格を巧妙に組み込むことで、阻害能を可逆的に光スイッチングできる。

同様の戦略に基づき、光制御型 CENP-E 阻害剤を開発するため、代表的な CENP-E 阻害剤である **GSK923295** の構造活性相関研究 (X. Qian *et al. ACS. Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 30.) を参考に、アリルアゾピラゾール骨格を導入した化合物 **1** (PCEI-HU として現在、市販中、図 1a) を設計・合成し、¹H-NMR, ¹³C-NMR, HR-MS で構造・純度を確認した。

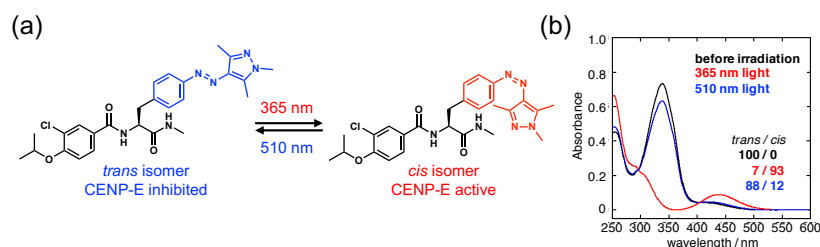


図 1. (a) 光制御型 CENP-E 阻害剤 PCEI-HU, (b) PCEI-HU の光応答性

②還元刺激応答性ミオシン阻害剤に関して

ミオシンの特異的阻害剤であるブレビスタチンの構造活性相関研究 (C. V. Stevens *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 85.) を参考に、化合物 **2** を設計・合成し、¹H-NMR, HR-

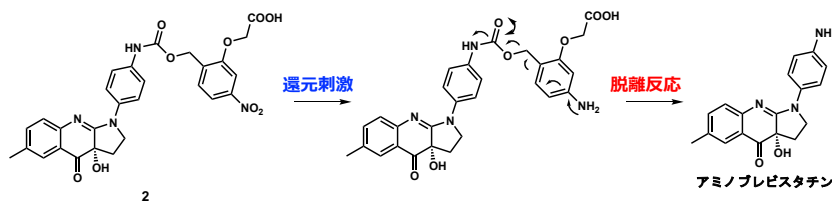


図 2. 還元刺激応答性ミオシン阻害剤 **2** の還元応答性

MS で構造・純度を確認した (図 2)。化合物 **2** では、還元環境をセンシングするためのニトロ基を有する骨格が、アミノブレビスタチンのアミノ基部分に導入されており、ミオシン阻害活性を有さないが、ニトロ基がアミノ基へ還元すると共に、自発的に 1,6-脱離し、分解することで、アミノブレビスタチンが放出され、ミオシン阻害活性を示すと期待した。さらに、化合物の水溶性を考慮し、親水性官能基としてカルボン酸を導入した。

4. 研究成果

①光制御型 CENP-E 阻害剤に関して

PCEI-HU の光応答性を検討した結果、アリルアゾピラゾール誘導体の *trans* 体に特徴的な非常によく分離した pi-pi*遷移 (340 nm 付近) と n-pi*遷移 (440 nm 付近) を示した (図 1b)。この溶液に、365 nm の紫外光を照射すると、*cis* 体が 93% 生成した。また、510 nm の可視光を照射すると、88% の *trans* 体が生成した。次に、CENP-E の阻害能を、*in vitro* 系で ATPase 活性を測定することで検討した。標準阻害剤として用いた **GSK923295** では IC₅₀ = 0.58 μM であったのに対し、**PCEI-HU** では IC₅₀ 値が光照射しない条件で 5.9 μM であり、PSS_{365 nm} (*cis* 体リッチな条件) で 120 μM、PSS_{510 nm} (*trans* 体リッチな条件) で 14 μM と、**GSK923295** よりは阻害能は低いものの 10 倍程度の CENP-E 阻害能の光スイッチングが確認できた。

細胞系で CENP-E 阻害活性を評価するため、cell viability assay を検討した。その結果、**GSK923295** では GI₅₀ = 30 nM であったのに対し、光照射しない条件および PSS_{510 nm} の条件で GI₅₀ = 0.29 μM であった。また、紫外光照射による PSS_{365 nm} の条件では GI₅₀ = 2.4 μM であり、やはり 10 倍程度の差が見られ、細胞系においても光スイッチングできることが示唆された。

CENP-E が阻害されると、染色体が赤道面に整列できず、紡錘体極付近に染色体が局在するとともに、CENP-E も極付近に局在する。そこで、CENP-E の局在を解析した (図 3)。光照射しない条件および可視光照射条件では、CENP-E 阻害に特徴的な異常配置の染色体が観測され、CENP-E 自体の局在も紡錘体極周辺に位置しており、CENP-E が阻害されていることが示唆された。一方、365 nm の光を照射した条件では、赤道面に整列した染色体が観測され、CENP-E の局在も赤道面に一致していたことから、CENP-E は阻害されていないことが示唆された。以上から、**PCEI-HU** は光に可逆的に応答して CENP-E を阻害できる光制御型 CENP-E 阻害剤であると結論づけた。

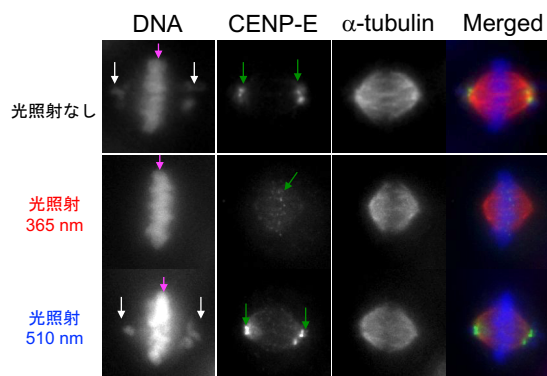


図 3. **PCEI-HU** による CENP-E の局在変化

開発した **PCEI-HU** を利用し、染色体の動きを光操作するため、共焦点レーザー走査顕微鏡に外部から LED 光源を導入し、細胞全体を光照射する光学系を新たに立ち上げた。生細胞中の分裂期染色体を近赤外蛍光試薬で染色し、**PCEI-HU** を投与した。光照射前には CENP-E は阻害状態のため、染色体は異常配置した状態であったが、365 nm の光を照射すると、紡錘体極付近の異常配置した染色体が赤道面方向に向かって移動し始めた。さらに、移動途中で、510 nm の可視光を照射すると、その動きは停止し、わずかに極方向へと徐々に動き出した (この動きは紡錘体の持続的な重合・脱重合によるものと考えられる)。この染色体の動きの光スイッチングは少なくとも 3 回繰り返すことができ、最終的に赤道面へと収束した (図 4)。以上から、染色体の動きを光で操作できるシステムの構築に成功した。

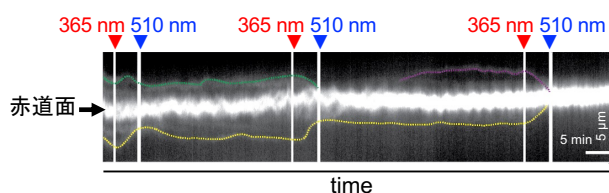


図 4. **PCEI-HU** による染色体の光操作 (kymograph)

②還元刺激応答性ミオシン阻害剤に関して

Nitroreductase (NTR) という還元酵素を利用し、化合物 **2** がニトロ基の還元反応に伴って、アミノブレビスタチンを放出することを、HPLC によって確認した (図 5a)。また、ミオシンの ATPase 活性を測定した結果、NTR で処理しなかった化合物 **2** は、ミオシンをほとんど阻害しなかった ($IC_{50} > 100 \mu M$) のに対し、NTR で処理した **2** は、 $IC_{50} = 13 \mu M$ でミオシンを阻害し、アミノブレビスタチン ($IC_{50} =$

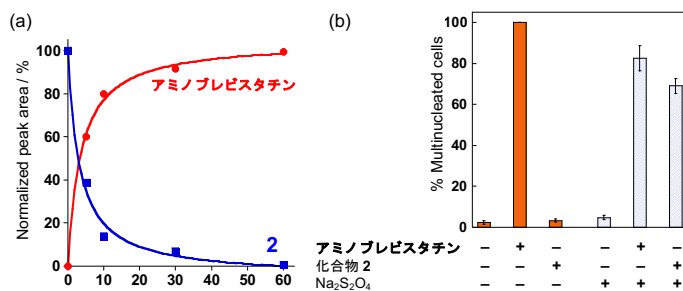


図 5. (a) **2** による NTR による分解反応の時間変化, (b) Na₂S₂O₄ による還元刺激を利用し多核化細胞の割合

12 μM) と同等の阻害活性を示した。以上より、化合物 **2** 自体は阻害活性がなく、NTR の還元に伴い保護基が外れることでアミノブレビスタチンが放出され、ミオシン阻害活性を示すことが確認できた。

化合物 **2** を利用し、細胞質分裂を操作することを試みた。培養細胞に化合物 **2** を添加し、その後、任意のタイミングで、還元性刺激として、sodium hydrosulfite (Na₂S₂O₄) を投与することで、ミオシンが阻害された場合に観測される多核化細胞 (ミオシンが阻害されると、収縮環のねじり切り運動が抑制されるため、細胞質分裂が起こらず、多核になった細胞が頻発する。) の割合をカウントした (図 5b)。その結果、還元性刺激をアプライした条件では、アミノブレビスタチンと同様に、有意に多核化細胞が観測されたことから、細胞質分裂を還元性刺激によって操作することに成功した。

以上から、本研究では、細胞分裂時に機能するモータータンパク質に着目し、それを外部刺激で制御できる阻害剤を開発した。さらに、開発したケミカルツールを利用することで、細胞分裂の複数の過程を外部刺激によって操作することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noushaba Nusrat Mafy, Kazuya Matsuo, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Nobuyuki Tamaoki	4. 巻 142
2. 論文標題 Photoswitchable CENP-E Inhibitor Enabling the Dynamic Control of Chromosome Movement and Mitotic Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1763-1767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b12782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松尾 和哉
2. 発表標題 「動く」タンパク質を標的とした光化学技術戦略とその展開
3. 学会等名 2019年度北海道高分子若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Matsuo
2. 発表標題 Optochemical Motion Control for Biomachines Under Live Cell Condition
3. 学会等名 ICPAC Yangon 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 和哉、Mafy Nusrat Noushaba、比留間 翔太、上原 亮太、玉置 信之
2. 発表標題 分裂期染色体の光操作
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Matsuo, Mafy Nusrat Noushaba, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 A photoswitchable inhibitor for the mitotic motor protein
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Chemical Biology and Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 和哉、Mafy Nusrat Noushaba、比留間 翔太、上原 亮太、玉置 信之
2. 発表標題 細胞分裂のオプトケミカルコントロール
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Matsuo, Mafy Nusrat Noushaba, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Nobuyuki Tamaoki
2. 発表標題 Development of the photoswitchable mitotic inhibitor
3. 学会等名 The 20th RIES-HOKUDAI International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 和哉、Mafy Nusrat Noushaba、比留間 翔太、上原 亮太、玉置 信之
2. 発表標題 モータータンパク質が駆動する分裂期染色体の光操作
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾 和哉
2. 発表標題 細胞分裂を操作する光薬理学ツール
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会（広島）（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関