

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16635

研究課題名(和文) キネシンの細胞内物質輸送における分子機構の解明を目指した化学修飾法の開発

研究課題名(英文) Novel chemical protein labeling approach for analyzing the intracellular cargo transport system in kinesin

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内の物質輸送を司るキネシンの動きをコントロールしながら、キネシンの相互作用タンパク質を網羅的に解析することを目的とし、相互作用タンパク質の網羅的・化学修飾法の開発とキネシンの運動を制御する手法の開発を行った。具体的には、酸化・還元状態に応じて標的タンパク質との反応性(求電子性)をスイッチングできる反応剤の候補を見いだすことに成功した。また、キネシンの動きを光で制御できる阻害剤を見出し、これを利用して光制御型キネシンを構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Kinesin is one of motor proteins, which is deeply involved in the important biophenomena including the intracellular transportation of cargo stuffs (organelles and vesicles). In this study, we developed the chemical methods for labeling the kinesin-specific protein-protein interaction to reveal the cargo systems in kinesin. The candidate of the new reactive handle which can change the reactivity based on redox conditions was successfully discovered. We also developed the light-switchable inhibitor to control the kinesin motility. Using this inhibitor, the light controllable kinesin was chemically constructed.

研究分野：生物有機化学

キーワード：キネシン 微小管 モータータンパク質 化学修飾

### 1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質キネシンは、ATP (アデノシン三リン酸) を加水分解することで生じた化学エネルギーを力学的な動きへと変換し、微小管上を一方方向に移動する。この移動過程で、キネシンは様々な物質 (細胞内オルガネラや小胞、膜受容体など) を荷物としてピックアップ・運搬・リリースする。細胞の物質輸送システムの中核を担うキネシンは、細胞分裂や神経の軸索輸送など重要な生命現象に深く関与しており、新たな創薬ターゲットとしても重要である。

これまでにキネシンは 45 種類の遺伝子が同定され、キネシンスーパーファミリーを形成している。しかし、それぞれのキネシンがどのような荷物を運搬しているのかは未だ網羅的な解析がなされていない。さらに、キネシンの本質的な役割である荷物のピックアップ・運搬・リリースといった一連の動的なメカニズムの詳細および時空間的な荷物の運搬機構 (キネシンがいつ・どこで荷物をピックアップし、リリースするのか) に関してもほとんど解明されていない。この要因として、荷物となる標的タンパク質の他にも様々な足場タンパク質が複雑に相互作用し、巨大複合体を形成するため、詳細に解析するのは容易ではないことが挙げられる。既存の手法では、もっぱら生化学的・分子生物学的手法が用いられてきたが、多大な時間と労力を要するため網羅的な解析は困難であった。しかも、キネシン・荷物複合体の形成・解離を時空間的に制御する手法も存在しないため、「いつ・どこで」といった時空間的情報に依存した解析は困難である。したがって、キネシン関連複合体を時空間制御しつつ、網羅的に同定する手法の開発が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに最も研究が進んでいる conventional kinesin (キネシン-1) を用い、キネシン-1 の動きを時空間的に制御しつつ、これに関与する相互作用タンパク質を網羅的に同定することを目的とし、相互作用タンパク質を特異的かつ任意のタイミングで化学修飾できる新規反応基の開発とキネシンの動きを時空間制御するための手法の確立を目指した。より具体的には、①酸化還元状態に応じて反応性を OFF/ON スwitching できるタンパク質化学修飾のための反応基の開発、および②キネシン-1 の動きを光で OFF/ON 制御する手法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

以下の 2 つの戦略を並行して進めた。

(1) キネシン相互作用タンパク質を網羅的に化学修飾するための反応性スウィッチング型反応基の開発

キネシンの物質輸送過程における相互作用タンパク質を特異的に化学修飾できるリガンド切り離し型の反応基を開発する。特定

の刺激で、相互作用タンパク質との反応性が OFF の状態から ON の状態へスウィッチングできる反応基を開発するのに際し、NAD<sup>+</sup> (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) / NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) に着目した。

NAD<sup>+</sup> は、pH 10 の塩基性条件において非常に不安定であり、加水分解によるニコチンアミドの脱離が容易に進行する。つまり、「水による求核置換反応が効率的に進行している」ことを意味する。一方で、還元型である NADH は塩基性条件では安定である。つまり、「水による求核攻撃は受けにくい」ことを示唆する。以上の知見から、リボース環 1 位の炭素上の求電子性が変化することで、水の求核攻撃に対する応答性が異なっている (図 1)、すなわち酸化還元状態の変化に応じて求核攻撃に対する反応性をスウィッチングできることが期待できる。

さらに、ADP (アデノシン二リン酸) リボース化の酵素反応に注目した。ADP リボース化は、NAD<sup>+</sup> (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を基質としてヒストンなどの基質タンパク質の求核性アミノ酸残基 (Cys, Arg, Asp, Glu など) に、ADP リボースを付与する翻訳後修飾の一つである。ADP リボース化を触媒する酵素は、NAD<sup>+</sup> を活性化させると同時に、基質タンパク質と NAD<sup>+</sup> を近接させることで ADP リボース化を達成している (B. Lüscher *et al. Mol. Cell.* **2008**, *32*, 57.)。さらに、この酵素反応は酸化還元反応ではないにも関わらず、NAD<sup>+</sup> 特異的であり、還元体である NADH では生じないことから、やはり炭素上の求電子性に依存した反応であると考えられる。

これらの知見に基づき、ピリジニウム・ジヒドロピリジン型反応基を開発し、酸化・還元状態において反応性をスウィッチングすることを目指した。

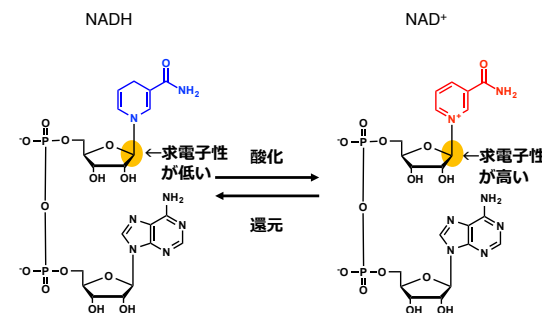


図 1 NAD<sup>+</sup> (ピリジニウム体)・NADH (ジヒドロピリジン体) における 1 位炭素の求電子性の違い

(2) キネシンを時空間制御するための光応答性阻害剤の開発と応用

キネシンがいつ・どこで・どのような荷物を運搬するのかを明らかにするためには、キネシンの動きを時空間的に制御する必要がある。キネシンの動きを制御するための刺激として、前述の化学修飾のための反応性ス

ツチングの刺激（酸化・還元状態）とは直交し、時空間制御に優れた刺激である「光」を選択した。

キネシン-1 が荷物を認識していない場合、キネシンC末端側に位置するテイルドメインが、キネシンN末端側に位置するモータードメイン部分の間に入り込み、ATPの無駄な消費を防ぐシステムが備わっている。これを利用し、テイルドメインの一部のペプチド配列とN末端側に光応答分子であるアゾベンゼンを導入したアゾベンゼン連結ペプチド（以降、アゾペプチド。Tamaoki, N. *et al.* *ACS Nano*, **2014**, *8*, 4157-4165.）に着目した（図2）。

アゾペプチドは、アゾベンゼンのcis-trans 光異性化反応に応じて、キネシンの阻害状態と非阻害状態を可逆的に変換できる。しかし、アフィニティが $10^{-3}$  Mオーダーと極めて低く、実用性に乏しかった。そこで、キネシンとテイルペプチドとのx線共結晶構造解析（Kaan, H. Y. K.; Hackney, D. D.; Kozielski, F. *Science*, **2011**, *333*, 883-885.）を参考に、構造活性相関研究を通じて、阻害剤構造を最適化し、アフィニティの向上を目指した。さらに、アゾペプチドをキネシン自体に直接化学修飾することによって、タンパク質レベルでキネシンの活性（動き）を制御することとした。

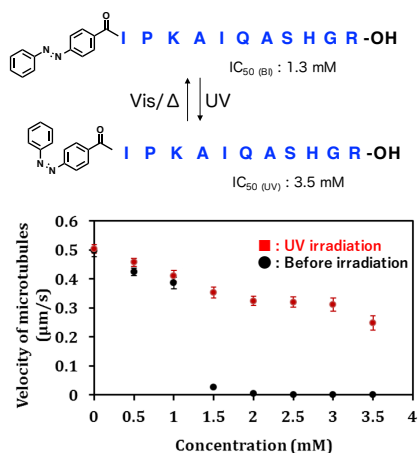


図2 アゾペプチドの光応答性

#### 4. 研究成果

(1)反応性スイッチング型反応基の開発に関する成果

ピリジニウム構造とジヒドロピリジン構造のどちらがより高い求電子性を有するかを明らかにするため、 $\text{NAD}^+$ と $\text{NADH}$ を用いてBSA（ウシ血清アルブミン）への化学修飾に関して検討したところ、高濃度の $\text{NAD}^+$ においてBSAへの化学修飾が確認できた（図3a）。そこで、より活性が高いと考えられるピリジニウムイオンを反応基として精査することとした。

タンパク質リガンドよりも高度に近接効果が機能すると考えられる小分子リガンドを利用し、反応性を検討した。リガンド分子（インドメタシン）とピリジニウムイオンお

よびプローブ分子としてジエチルアミノクマリンを導入した化合物を設計・合成し、BSAとの反応性を検討した（図3bおよび3c）。

その結果、確かにBSAとの反応が質量分析およびSDS-PAGEから確認できたが、その程度は極めて低く、おおよそ3%程度であった。以上から、酸化・還元状態に基づき、反応性をスイッチングできることが示唆され、タンパク質の化学修飾のための新規反応剤の候補を得ることに成功した。しかし、網羅的な化学修飾を目指すためには、より高活性な反応剤が必要となる。今後は、ピリジン環への置換基導入あるいはベンジル部位の変換により反応性を制御することで、より高活性な反応剤を得る予定である

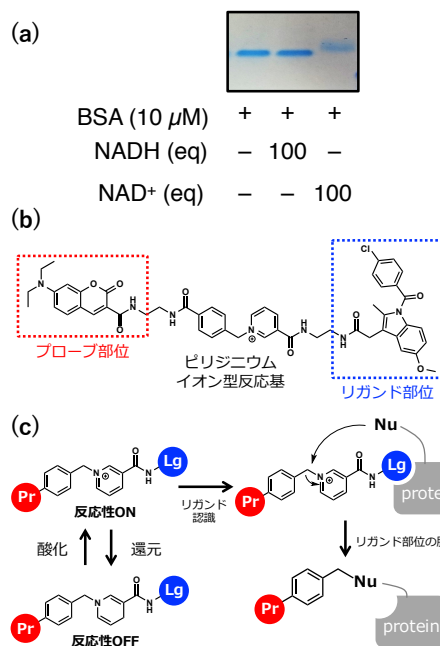


図3 (a)  $\text{NAD}^+$ と $\text{NADH}$ によるタンパク質との反応性、(b)検討したピリジニウム型反応剤、(c)ピリジニウムイオン型反応剤によるタンパク質ラベリングの概要

(2)キネシンを時空間制御するための光応答性阻害剤に関する成果

より効率的にキネシン-1の動きを時空間的に制御するため、より高い親和性を持つ新規アゾペプチドの開発を行った。新規アゾペプチドの評価は、精製キネシン-1と微小管を用いたin vitro motility assay法により行った。

その結果、既存のアゾペプチドでは、 $\text{IC}_{50}$ で $10^{-3}$  M程度のアフィニティであったが、キネシンの結晶構造を基に、精密にチューニングすることで $\text{IC}_{50}$ が $10^{-6}$  Mのアフィニティまで向上させることに成功した。

さらに、この高親和性アゾペプチドを、キネシン-1に直接化学修飾するため、求電子性反応基（ベンジルクロライド基）を導入したアゾペプチドを設計・合成した。これを用い、精製キネシンと反応させたところ、キネシン

への化学修飾が確認でき、得られたアゾベンゼン修飾キネシンは、アゾベンゼンの光異性化反応に対応して活性（動き）を OFF/ON 制御できた（図 4）。

今後はこのシステムを細胞内へと展開し、細胞内キネシンの動きをピンポイントに制御することで、キネシンの荷物運搬過程を制御する。

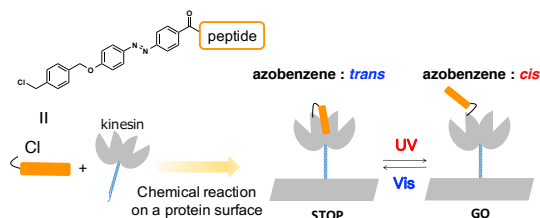


図 4 光制御型キネシンの化学的な構築

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Kazuya Matsuo, Yuki Nishikawa, Marie Masuda, Itaru Hamachi

Live-cell Protein Sulfenylation Based on Proximity-driven N-Sulfonyl Pyridone Chemistry

Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57, 659-662. (査読有)

DOI: 10.1002/anie.201707972.

② Amrutha A. S., Kumar K. R. S., Kazuya Matsuo, Nobuyuki Tamaoki

Structure-property relationships of photoresponsive inhibitors of the kinesin motor

Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 7202-7210. (査読有)

DOI: 10.1039/C6OB00951D.

〔学会発表〕（計 10 件）

① 松尾 和哉、玉置 信之

アフィニティ駆動型化学修飾を利用した光制御型キネシンの開発

日本薬学会 第 138 年会

2018 年 3 月 26 日

TKP 金沢カンファレンスセンター（石川県金沢市）

② 松尾 和哉、玉置 信之

ケミカルエンジニアリングによるモータータンパク質の機能改変

第 3 回 北大部局間横断シンポジウム

2018 年 1 月 26 日

北海道大学（北海道札幌市）

③ Kazuya Matsuo, Nobuyuki Tamaoki

A Reversibly Photoswitchable Biomachine Constructed by Chemical Protein

Engineering

The 18th RIES-Hokudai International Symposium

2017. 11. 30.

Chasseresse Gateaux Kingdom, Sapporo, Hokkaido.

④ Fumiya Ashino, Kazuya Matsuo, Takashi Kikukawa, Nobuyuki Tamaoki

In vitro the driving and controlling of kinesin with visible light sensitive azobenzene-based triphosphates

The 18th RIES-Hokudai International Symposium

2017. 11. 30.

Chasseresse Gateaux Kingdom, Sapporo, Hokkaido.

⑤ 松尾 和哉、玉置 信之

化学修飾による光応答性モータータンパク質の構築

第 5 回アライアンス若手研究交流会

2017 年 8 月 21 日

東京工業大学 すすかけ台キャンパス（神奈川県横浜市）

⑥ 松尾 和哉、玉置 信之

可逆的に光制御できるキネシン阻害剤の開発とその応用

日本化学会 第 97 回春季年会

2017 年 3 月 17 日

慶応義塾大学 日吉キャンパス（神奈川県横浜市）

⑦ 芦野 史弥、松尾 和哉、玉置 信之

新規アゾベンゼン三リン酸によるキネシンの駆動と in vitro 光制御

日本化学会 第 97 回春季年会

2017 年 3 月 17 日

慶応義塾大学 日吉キャンパス（神奈川県横浜市）

⑧ Kazuya Matsuo, Nobuyuki Tamaoki

Rational Design of Potent Photoreversible Kinesin-1 Inhibitors

The 17th RIES-Hokudai International Symposium

2016. 12. 13.

Chasseresse Gateaux Kingdom, Sapporo, Hokkaido.

⑨ 松尾 和哉、玉置 信之

モータータンパク質キネシンの光制御型阻害剤における構造活性相関

第 4 回アライアンス若手研究交流会

2016 年 11 月 9 日

北海道大学（北海道札幌市）

⑩ Kazuya Matsuo, Nobuyuki Tamaoki

Structure-Activity Relationship of

Photochromic Inhibitors for Kinesin-1  
HOKUDAI-NCTU Joint Symposium on Nano,  
Photo and Bio Sciences in 2016  
2016.10.4.  
Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido.

[図書] (計 1 件)

① Ligand-directed tosyl/acyl imidazole  
chemistry

Kazuya Matsuo, Itaru Hamachi

Chemoselective and Bioorthogonal Ligation  
Reaction, Part I : Chemistries, 2017,  
Chapter 6, 147-165. WILEY - VCH.

[その他]

ホームページ等

<http://tamaoki.es.hokudai.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 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