

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32690

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650276

研究課題名(和文)光可逆的活性を示すフォトクロミック抗ガン剤・キネシンEg5阻害剤の開発

研究課題名(英文)Development of photochromic anti-cancer agent : kinesin Eg5 inhibitor

研究代表者

丸田 晋策 (Maruta, Shinsaku)

創価大学・工学部・教授

研究者番号：40231732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：有糸分裂キネシンEg5のATPase活性を特異的に阻害する化合物はガン細胞の増殖を抑えることによりアポトーシスを誘導することから、抗がん剤として注目されている。しかし、これらの抗ガン剤は正常細胞のEg5も阻害することから副作用の問題がある。目的の部位で特異的に、必要な時にだけ作用する副作用が少ない抗ガン剤が必要となる。そこで、光スイッチ機構をもつ抗ガン剤・キネシンEg5阻害剤を開発することを試みた。光制御型Eg5阻害剤のアゾベンゼン誘導体ACTABを合成した。そしてACTABを用いて光可逆的にEg5のATPase活性と微小管の滑り運動を制御することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The mitotic kinesin Eg5 is essential for the formation of bipolar spindles during eukaryotic cell division, it has been considered as a potential target for cancer treatment. STLC is one of the inhibitors of Eg5 whose molecular mechanism of inhibition was well studied. In this study, we synthesized a novel photochromic STLC analogues, ACTAB, composed of a trityl group, azobenzene, and Acetyl-L-cysteine, which exhibits cis-trans photoisomerization in order to photocontrol the function of Eg5. ACTAB exhibited cis-trans photoisomerization upon alternating irradiation at two different visible wavelengths. ACTAB induced reversible changes in the inhibitory activity of ATPase and motor activities correlating with the cis-trans photoisomerization. Compared to cis-ACTAB, trans-ACTAB reduced ATPase activity and microtubule gliding velocity more significantly. These results suggest that ACTAB could be used as photochromic inhibitor of Eg5 to achieve photocontrol of living cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学 生体材料学

キーワード：ナノバイオロジー ナノメディスン

1. 研究開始当初の背景

Eg5 はキネシンスーパーファミリーに属する ATP 駆動型のモーター蛋白質であり、有糸分裂前期の中心体分離および双極有糸分裂紡錘体の集合など細胞分裂に重要な生理的な役割を担っている。ガン細胞は細胞分裂を繰り返すことで増殖するが、その細胞分裂には染色体を分離するために、対をなしている中心体が細胞の両極へと移動することが必須である。Monastrol は、その中心体の両極への移動を司るキネシン Eg5 の作用を特異的に阻害することにより中心体の分離を妨げ、その結果、癌細胞の細胞周期を分裂期で停止させガン細胞にアポトーシスを誘導する抗ガン剤である。最近の結晶構造や遺伝子工学的研究により、Monastrol が Eg5 モータードメインのループ L5 近傍のポケットに安定に結合して ATPase 活性を阻害する分子機構が明らかにされている。また、最近 Monastrol の他に同様の分子機構で Eg5 の機能を強く阻害する S-Trityl-L-Cysteine (STLC) という化合物も見つかっている。このことは分子デザインをすることにより、さらに効果的な Eg5 特異的阻害剤を合成することが可能である事を示唆している。

最近の研究により、キネシンは ATP の化学的なエネルギーを力学的な運動エネルギーに変換する機械的な仕組みが分子レベルで明らかになってきた。申請者らは、この機械的な仕組みをもつキネシンのエネルギー変換部位に、人工的な光スイッチとして作用する異なる波長の光で可逆的に異性化するフォトクロミック分子を導入して、光でキネシンを可逆的に制御する一連の研究を展開してきた[新学術領域研究(H20～H22)“光駆動型バイオナノマシンの研究”]。さらに、この研究において、フォトクロミック分子を導入した ATP を合成してキネシンの微小管滑り運動速度を可逆的に制御することにも成功している。これらの研究結果は、Eg5 の特異的な阻害剤にフォトクロミック分子を導入することにより Eg5 の機能を光可逆的に制御できる可能性を示唆している。

これまでの抗ガン剤は微小管の形成を阻害するものが使用されていたため、極めて強い副作用が見られていた。Eg5 の特異的な阻害剤である Monastrol は、微小管形成の阻害に伴う強い副作用は見られないが、正常細胞においても Eg5 は細胞分裂の重要な役割を担っており、Eg5 機能阻害によ

る副作用を避けることはできない。そこで本研究計画では申請者らがこれまでに確立してきた生体分子機械のフォトクロミック分子を用いた光制御の技術を導入して、光可逆的に薬剤の活性を制御することにより副作用を抑えた効果的な治療を目指した抗ガン剤の開発を試みる。これまでに、光可逆的に活性化、不活性化される試薬は報告はほとんど行われておらず、この分野において新しい試みである。この光制御薬剤の技術は抗ガン剤ばかりでなく、その他の部位特異的治療用薬剤に利用できることが強く期待される。従ってこの新規技術は医療の分野において大きく貢献できると思われる。

この技術は、抗ガン剤だけでなく、その作用機構が明らかになっている他の病気の特異的薬剤にも同様に応用することが可能であり、副作用を抑えるだけでなく、必要な時に活性化させることにより状態に合わせた分子レベルでの薬剤作用の制御が可能である。臨床現場における応用性は極めて高い技術になり得ると期待される。

この研究計画における薬剤に積極的に人工的なスイッチ機構を導入するアイデアは、キネシン Eg5 と Monastrol の分子機構が明らかになったことに基づいている。現在までに分子機構が明らかにされている薬剤に対してスイッチ機構を導入した新規薬剤のデザインをすることは可能であると考えられる。スイッチ機構は熱、pH、磁場、電場などの変化で応答する化合物が考えられるが、生体に応用する場合、カテーテルの技術を利用した光による制御が最も具体的であると思われる。ケージド化合物のように光で保護基が遊離して薬剤が活性化する方法も候補の一つであるが、この場合は非可逆的な反応であり、いったん活性化された薬剤を不活性化させることはできない。従って、目的の作用が終了した時点で不活性化させることはできないので、副作用を低減させる目的には相応しくないと考えられる。これに対して、フォトクロミック分子は異なる波長の光で可逆的にその構造と性質を変化させることができる化合物であり、分子デザインされたフォトクロミック薬剤では、その活性を光可逆的に制御することが可能となる。これまでの強力な作用を示す抗ガン剤は、微小管の形成を阻害してアポトーシスを誘導するものであり、細胞機能に必須の微小管が影響を受けることにより、強い副作用が伴っていた。キネシ

ン Eg5 は細胞周期の M 期において有糸分裂を担う生理的な機能を担っており、ガン細胞では過剰に発現して著しい細胞増殖を誘導している。このガン細胞において特異的に過剰な作用を示す Eg5 を阻害する Monastrol や STLC は抗ガン剤として適していると考えられる。しかし、正常細胞でも Eg5 は有糸分裂を行っており、Eg5 が阻害されれば副作用を避けることはできない。従って、作用後は速やかに不活性化する薬剤の開発は副作用を抑えるために重要なテーマである。

最近の臨床の現場においてカテーテルを用いた技術は飛躍的に発達しており、目的の患部組織に光ファイバーのカテーテルを導入したり、薬物を特異的に投与することは可能になってきている。この手法と本研究計画で開発する新規機能性薬剤をカップリングさせることにより、患部組織において特異的に薬剤を活性を光制御することが可能になり、副作用を抑えた効果的な治療が可能となる。また副作用だけでなく、その薬剤活性を自在にコントロールすることが可能であることから、患部の状況に対応した効率のよい薬剤の作用が期待できる。

この方法は抗ガン剤だけでなく、その他の病気の薬剤への応用が可能である。特に強い作用のために副作用が問題になっている薬剤への応用が強く期待される。さらに病気の治療だけでなく細胞機能の基礎研究への応用も考えられる。光による遠隔操作で特定の機能を可逆的に制御することにより、細胞の増殖などをコントロールすることが可能になると期待できる。

2. 研究の目的

キネシン Eg5 は、細胞の有糸分裂を担う ATP 駆動型のモーター蛋白である。細胞周期の M 期の進行において Eg5 は細胞有糸分裂の重要な役割を担っている。がん細胞では Eg5 が過剰発現して著しく細胞増殖が進行する。Eg5 の ATPase 活性を特異的に阻害する Monastrol や STLC は、Eg5 による有糸分裂を停止させて、ガン細胞の増殖を抑えることによりアポトーシスを誘導することが示されており、抗がん剤として注目されている。しかしながら、これらの抗ガン剤は正常細胞の Eg5 も阻害することから副作用の問題がある。目的の部位で特異的に、必要な時にだけ作用する副作用が少ない抗ガン剤が必要となる。そこで本研究計画では、異なる波長の光で可逆的に

活性が制御できる光スイッチ機構をもつ抗ガン剤・キネシン Eg5 阻害剤を開発することを試みる。

3. 研究の方法

まずはじめに、Eg5 の特異的阻害剤である Monastrol と STLC の構造を基に基本的な作用を保持したフォトクロミック分子、アゾベンゼン誘導体あるいはスピロピラン誘導体からなる光応答性 Eg5 阻害剤を Eg5 結晶構造における阻害剤結合部位の構造に対応させてデザインする。実際にこれらの阻害剤を申請者らがこれまでに確立してきたフォトクロミック化合物誘導体の方法に従って合成を行う。そして、Eg5 との相互作用の基礎実験を行い、ATPase 活性を効率良く光可逆的に阻害する光応答性阻害剤をスクリーニングする。ATPase 活性を効率良く光可逆的に阻害する化合物を用いて Eg5 の微小管滑り運動活性の光可逆的阻害を調べる。また光照射を行い、効率よく制御するための波長、光強度、照射時間などの最適条件の検索を試みる。

(1) 光応答性 Eg5 阻害剤のデザイン

Eg5 モータードメインに Monastrol (pdb ID:1X88) と STLC (pdb ID:2W0G) が結合した結晶構造が明らかにされているので、この構造を基に可能なフォトクロミック分子を導入した Eg5 阻害剤のデザインを行う。結晶構造では Monastrol と STLC の疎水性部分を Eg5 のループ L5 が疎水性の相互作用で押さえ込むことにより結合部位で安定化していることが観察されている。従って、これらの阻害剤の疎水性部分に対応した位置に、光異性化で疎水性-親水性の性質が変化するフォトクロミック分子を導入した阻害剤アナログを合成することにより、光可逆的な結合により Eg5 の活性阻害の制御が誘導できると考えられる。

本研究計画では様々なフォトクロミック分子の中から、アゾベンゼンとスピロピランの誘導体を利用する。アゾベンゼンは、紫外線で親水性の cis 型へ、そして可視光線で疎水性の trans 型へ異性化する。またスピロピランは紫外線でイオン化した Merocyanin 型へ、可視光線で疎水性の閉環した Merocyanin 型へ異性化する。このように、これらのフォトクロミック分子は光異性化により、劇的に構造変化して疎水性と親水性の性質が可逆的に変化する。従って、これらを導入した Eg5 阻害剤は光可逆的に

Eg5 へ結合することが強く期待できる。

分子モデリングソフト (Hyper-chem) を用いて、Eg5 の結合部位に対応したアゾベンゼンとスピロピラン誘導体から構成される様々な阻害剤の候補をデザインする。

(2) 光応答性 Eg5 阻害剤の合成

申請者らは、これまでに様々なタンパク質架橋性のアゾベンゼンとスピロピランの誘導体の合成を行い、キネシンの機能部位に導入することにより光可逆的にキネシンを制御する研究を試みてきた。この研究においてこれらの誘導体の合成法は確立しており同様の方法で Manastrol と STLC アナログとして作用する誘導体を合成することが可能である。アゾベンゼンとスピロピランに様々な官能基を導入した様々な誘導体を合成して、Eg5 の阻害剤結合部位への親和性が光異性化により大きく変化する化合物をスクリーニングする。既に予備的な実験として Phenylazobenzoic-maleimide と N-acetyl-cystein をカップリングすることにより、光応答性の STLC アナログの合成に成功している。またその他の化合物に関しても一部は合成を開始している。合成の確認は、申請者の所属する研究機関に設置されている FT-IR, FAB-MS, NMR (500MHz) を用いて行う。

(3) 光応答性 Eg5 阻害剤の物理化学的性質と分光学的性質の解析

合成した光応答性 Eg5 阻害剤の溶解度や溶液中での安定性など物理化学的性質を明らかにする。また特性吸収での分子吸光係数の決定を行う。アゾベンゼンとスピロピランの光異性化は吸収スペクトルの変化から容易にモニターできることが分かっている。合成したこれらのフォトクロミック分子から構成される Eg5 阻害剤の光異性化に伴う吸収スペクトルの変化を測定する。そして光異性化に要する照射時間と各異性体の安定性について実験を行う。スピロピラン誘導体は蛍光を持つので、光異性化に伴う蛍光スペクトル変化についても測定を行う。

(4) Eg5 の光可逆的 ATPase 活性の阻害

合成した光応答性の monastrol と STLC アナログの中から、光可逆的に Eg5 の機能を阻害するものをスクリーニングするために Eg5 の ATPase 活性の阻害を調べる。ATPase 活性の測定は、加水分解に伴い遊

離してくるリン酸を申請者らが確立している方法により定量することにより行う。この段階で、光可逆的では無いが効果的な阻害が確認された化合物に関しては、この構造を基にさらに分子モデリングを行い、構造を修正した新たな分子の合成を検討する。

(5) 光可逆的微小管滑り運動活性の阻害

Eg5 の ATPase 活性を光可逆的 Eg5 阻害する化合物を用いて、Eg5 による微小管の滑り運動に対する阻害効果を調べる。申請者の研究室で確立している *In vitro* motility assay 法に従って Eg5 を吸着させたスライドガラス上を蛍光標識した微小管が滑る様子を光可逆的 Eg5 阻害存在下で観察する。

4. 研究成果

(1) 光制御型 Eg5 阻害剤のデザインと合成

Eg5 の特徴の 1 つである特異的阻害剤を利用した光制御を行うために、Eg5 特異的阻害剤である STLC の構造を基に、フォトクロミック分子を導入した光制御型 Eg5 阻害剤を合成した。1 つ目は、STLC のトリチル基部位をフォトクロミック分子アゾベンゼンの両端に結合させた 4,4'-bis(N-(2-(triphenylmethylamino)acetyl)amino)azobenzene [BTBA] (図 1A) である。紫外線照射によって、アゾベンゼンを *cis* 体にすることによって、両端のトリチル基が近接し合い、Eg5 の阻害剤結合ポケットに結合しにくくなると考えた。2 つ目は、STLC のトリチル基部位とシステイン部位をアゾベンゼンで架橋した 4-(N-(2-(N-acetylcysteine-S-yl) acetyl) amino)-4'-(N-(2-(N-(triphenylmethyl)amino)acetyl) amino)azobenzene [ACTAB] である (図 1B)。システイン部位は N-アセチル-L-システインを使用した。これらの阻害剤のアゾベンゼン

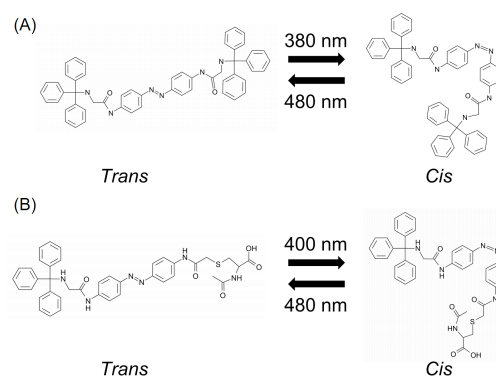


図 1 光制御型阻害剤の構造式 (A) BTBA, (B) ACTAB

部分の *cis* 体, *trans* 体は、それぞれ異なる阻害剤結合ポケットへの親和性が期待できる。

(2) 光制御型阻害剤による Eg5 の光制御

BTBA と ACTAB により、Eg5ATPase 活性が光可逆的に制御できることが示された。アゾベンゼンが *trans* 体のとき、*cis* 体のときよりも、Eg5 の活性をより大きく阻害した。ACTAB は Eg5 との親和性も高く、*cis*-ACTAB の 50%阻害濃度(IC₅₀)は 9.1 μM, *trans*-ACTAB の IC₅₀ は 5.2 μM であり、既存の Eg5 阻害剤 *monastrol* の IC₅₀= 17μM と比較しても Eg5 阻害剤として十分な親和性であると考えられる(図 2)。さらに、光異性化する波長を検討したところ、BTBA は 380 nm の紫外線照射で *cis* 体に、480 nm の可視光線照射で *trans* 体に光異性化し、ACTAB は 400 nm の可視光線照射で *cis* 体に、480 nm の可視光線照射で *trans* 体に光異性化することが確認できた。可視光線のみで光制御が可能な ACTAB は細胞への応用が期待できる。

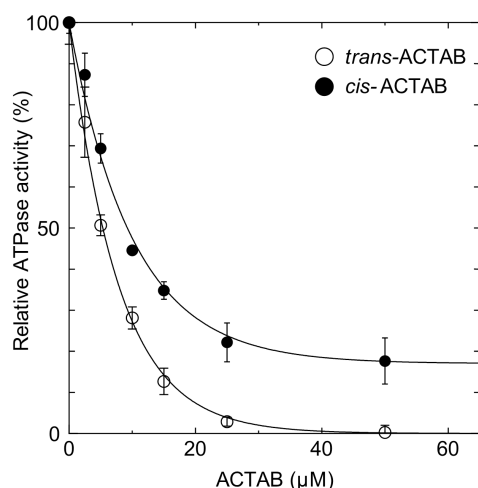


図 2 ACTAB による Eg5 の ATPase 活性の光制御
0.1 μM Eg5 の活性を 3 μM の微小管、0-50 μM ACTAB 存在下で測定した。

(3) 光制御型阻害剤による Eg5-微小管滑り運動の光制御

顕微鏡下で、キネシン上の微小管滑り運動を観察する方法(*in vitro* motility assay)を用いて、光制御型阻害剤存在下での微小管-キネシン間の滑り速度を観察した。光異性化させた *trans*-ACTAB もしくは *cis*-ACTAB を、キネシンと微小管を貼り付けたスライドグラスとカバーグラスで作製したフローセルに流し入れ、滑り速度の変化を測定した。 *trans*-ACTAB 存在下のときに、滑り速度の減少が観察された。これらの結果から、光制御型阻害剤は、

Eg5 の活性だけでなく、微小管滑り運動の制御も可能であることが明らかになった。

(4) 結論

本研究では、Eg5 の人工的制御法として、機械的な仕組みの機能部位にフォトクロミック分子を修飾する方法と、外部因子である光制御型阻害剤を用いる方法が可能であることを明らかにした。フォトクロミック分子を Eg5 の L5 に修飾することにより、Eg5 の活性および STLC による阻害効果を光制御できることを示した。フォトクロミック分子導入部位により、光制御の効率が大きく異なり、W127C と D130C の結果から、Eg5 の人工的制御の仕掛け部位として L5 の C 末が適しているのではないかと考えられる。

また、光制御型阻害剤により、光照射によって Eg5 の阻害効果と微小管-キネシン間の滑り速度を光制御できることを示した。外部因子である阻害剤を利用した光制御は遺伝子操作などが不必要であり、タンパク質は native なものが使用できることが利点である。また、可視光線領域の光でのみ光制御可能な ACTAB は、紫外線による生体分子損傷の心配がないため、今後、*in vivo* でのナノデバイスとしての利用だけでなく、細胞や組織レベルでの応用が期待できる。さらに、Eg5 阻害剤は新たな抗がん剤としても注目されており、光制御型 Eg5 阻害剤の開発は、光照射によって効果が制御可能な、副作用の少ない抗がん剤としての応用が強く期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ishikawa, K., Tohyama, K., Mitsuhashi, S., & Maruta, S. "Photocontrol of the mitotic kinesin Eg5 using a novel S-trityl-L-cysteine analogue as a photochromic inhibitor" (2014) J. Biochem. 155, 257-263. 査読有
- ② Ishikawa, K., Tamura, Y., & Maruta, S. "Photocontrol of mitotic kinesin Eg5 facilitated by thiol-reactive photochromic molecules incorporated into the loop L5 functional loop" (2014) J. Biochem. 155, 195-206. 査読有
- ③ Yasuda, S., Yanagi, T., Yamada, M. D., Ueki, S., Maruta, S., Inoue A, & Arata T. "Nucleotide-dependent displacement and dynamics of the α-1 helix in kinesin revealed by site-directed spin labeling EPR" (2014) Biochem. Biophys. Res. Commun. 443, 911-916 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① Kumiko Ishikawa, Shinsaku Maruta
“Photo-regulation of kinesin in which functional loop L5 was modified by photochromic molecule” 第 49 回日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 16 日 姫路
- ② 石川 久美子, 丸田 晋策
“Photo-regulation of kinesin utilizing the loop L5 of kinesin modified by photochromic molecule” 第 84 回日本生化学会合同大会、2011 年 9 月 22 日 京都
- ② Kumiko Ishikawa, Shinsaku Maruta
“INCORPORATION OF PHOTOCROMIC MOLECULE INTO THE FUNCTIONAL LOOP L5 OF KINESIN FOR THE PURPOSE OF PHOTO-REGULATION” 第56回米国生物物理学会 2012年2月27日 San Diego, CA USA.
- ④ Kei SADAKANE, Kumiko ISHIKAWA, Hideo SEO, Banri YAMANOHA, and Shinsaku MARUTA
“キネシン Eg5 に対するフォトクロミック阻害剤を用いた細胞分裂の光制御” 第 50 回日本生物物理学会年会 2012 年 9 月 名古屋
- ⑤ Kumiko ISHIKAWA, Hideo SEO, Kanako TOUYAMA and Shinsaku MARUTA
“フォトクロミック阻害剤を用いた有糸分裂キネシン Eg5 の光制御” 第 50 回日本生物物理学会年会 2012 年 9 月. 名古屋
- ⑥ Hideo SEO, Kumiko ISHIKAWA, Kanako TOUYAMA and Shinsaku MARUTA
“フォトクロミック阻害剤を利用したキネシン Kif18A の光制御” 第 50 回日本生物物理学会年会 2012 年 9 月. 名古屋
- ⑦ 石川 久美子, 瀬尾 英雄, 當山 奏子, Balamurugan Subramaniam, Guan-Yeow Yeap, 丸田 晋策 “フォトクロミック阻害剤を用いた有糸分裂キネシン Eg5 および Kif18a の光制御” 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 福岡
- ⑧ Kei SADAKANE, Kumiko ISHIKAWA, Hideo SEO, Kanako TOHYAMA, Banri YAMANOHA and Shinsaku MARUTA “Photo - regulation of cell division using photochromic inhibitors for kinesin Eg5” 第57回米国生物物理学会 2013年2月 Philadelphia PA USA
- ⑨ Kumiko ISHIKAWA, Hideo SEO, Kanako TOUYAMA, Subramaniam BALAMURUGAN, Guan Yeow YEAP and Shinsaku MARUTA “Synthesis of novel photochromic inhibitors of mitotic kinesins Eg5 and kif18a and their photoresponsive interaction with the kinesins” 第57回米国生物物理学会 2013 年2月 Philadelphia PA USA
- ⑩ Hideo SEO, Kumiko ISHIKAWA, Kanako TOHYAMA, Hiromi SUENAGA and Shinsaku MARUTA “Photocontrol of atpase activity of kinesin Kif18A using various existing azobenzene derivatives” 第57回米国生物物理学会

2013年2月 Philadelphia PA USA

- ⑪ Kanako Tohyama, Kumiko Ishikawa and Shinsaku Maruta “Photo regulated inhibitor composed of photochromic molecules for mitotic kinesin Eg5” 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 29 日 京都
- ⑫ Kumiko Ishikawa, Yuki Tamura and Shinsaku Maruta “Incorporation of photochromic molecule into the functional loop L5 of mitotic kinesin Eg5 and its photo regulation” 第 51 回日本生物物理学会年会 2013 年 10 月 29 日 京都
- ⑬ 石川 久美子, 當山 奏子, 丸田 晋策
“フォトクロミック阻害剤を用いた有糸分裂キネシン Eg5 の光制御” 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 横浜
- ⑭ 當山 奏子, 石川 久美子, 丸田 晋策
“キネシン Eg5 の新規フォトクロミック阻害剤の合成と相互作用” 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 13 日 横浜
- ⑮ Kanako Tohyama, Kumiko Ishikawa, Shinsaku Maruta “PHOTO-REVERSIBLE INHIBITION OF MITOTIC KINESIN EG5 BY PHOTOCROMIC STLC ANALOGUES COMPOSED OF AZOBENZENE” 第58回米国生物物理学会年会 2013年 2月 19日 San Francisco, CA USA
- ⑯ Kumiko Ishikawa, Yuhki Tamura, Shinsaku Maruta
“PHOTOCNTROL OF MITOTIC KINESIN EG5 BY INCORPORATING OF PHOTOCROMIC MOLECULE INTO THE FUNCTIONAL LOOP L5” 第58回米国生物物理学会年会 2013年 2月 19日 San Francisco, CA USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸田 晋策 (MARUTA Shinsaku)
創価大学・工学部・教授
研究者番号：40231732