

17. 機能性分子設計に基づくタンパク質活性の可逆的光制御

水上 進

東北大学 多元物質科学研究所 有機・生命科学研究部門 細胞機能分子化学研究分野

Key words : 光制御, 光薬理学, フォトクロミック化合物, メトトレキサート

緒言

21世紀は光の時代と言われ、生物学分野においても超解像イメージングやオプトジェネティクスなどの光技術が注目されている。光技術の医薬への応用に関しては、現段階では光線力学療法などがわずかに実用化されているのみであるが、生理活性を有する薬剤に光スイッチ構造を導入することで薬理効果を時空間的に光制御し、副作用や毒性の少ない薬剤開発を目指す光薬理学が近年注目を集めている[1]。従来の薬剤は、薬理活性の空間的制御が困難であるために、正常細胞までに薬理効果が及ぶ副作用の問題点を持っている。しかし、もし患部のみを光をあてて薬剤を活性化できれば、副作用を大きく軽減できると考えられる(図1)。そこで、抗がん剤およびリウマチの治療薬として知られているメトトレキサート(MTX)に光分子スイッチ構造を導入することで可逆性を持つ新しい光応答性の薬剤の開発を目指した。MTXは、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の阻害剤として知られており、その構造は基質であるジヒドロ葉酸と似た構造をもっている(図2a)。DHFRは、細胞の生育に重要な酵素で、阻害されると核酸の生合成が止まり、細胞死を引き起こすことが知られている。光応答性のMTX類縁体を開発することができれば、患部のみにある波長の光を照射することでMTX類縁体を活性化させる一方で、患部以外には不活性化した状態が保たれると期待できる。

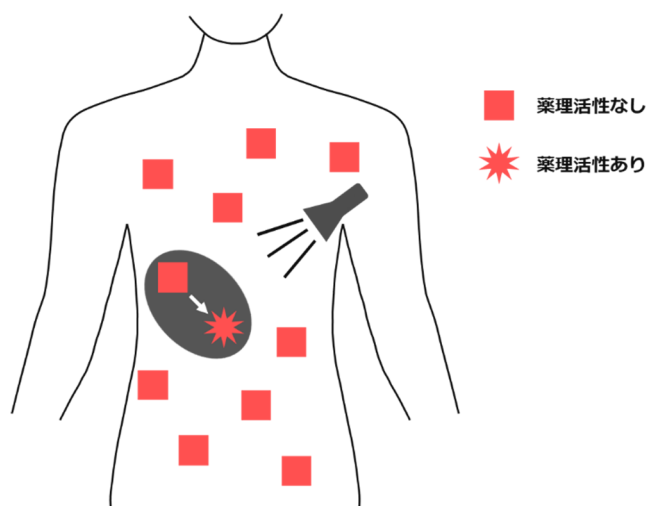


図1. 光照射による薬剤の活性化

患部に光を当てることで患部の薬剤のみが活性化され、副作用を最小限にとどめることができる。

方法および結果

1. 光応答性MTX類縁体の設計・合成

結晶構造データから、DHFRと結合した際にMTXが折れ曲がった構造をとることに着目し、MTXの中央部にフォトクロミック化合物であるアゾベンゼン構造を導入したMTX-azoを設計した。MTX-azoはtrans体では平面構造を取り、cis体では折れ曲がった構造を取ることが予想されるため、trans体はDHFRに結合しにくい一方で、折れ曲が

った構造の *cis* 体は DHFR に結合すると予想し、光照射によって **MTX-azo** と DHFR の結合を制御できると考えた (図 2)。**MTX-azo** は市販の原料から 5 段階で合成し、NMR および質量分析によって構造を同定した。

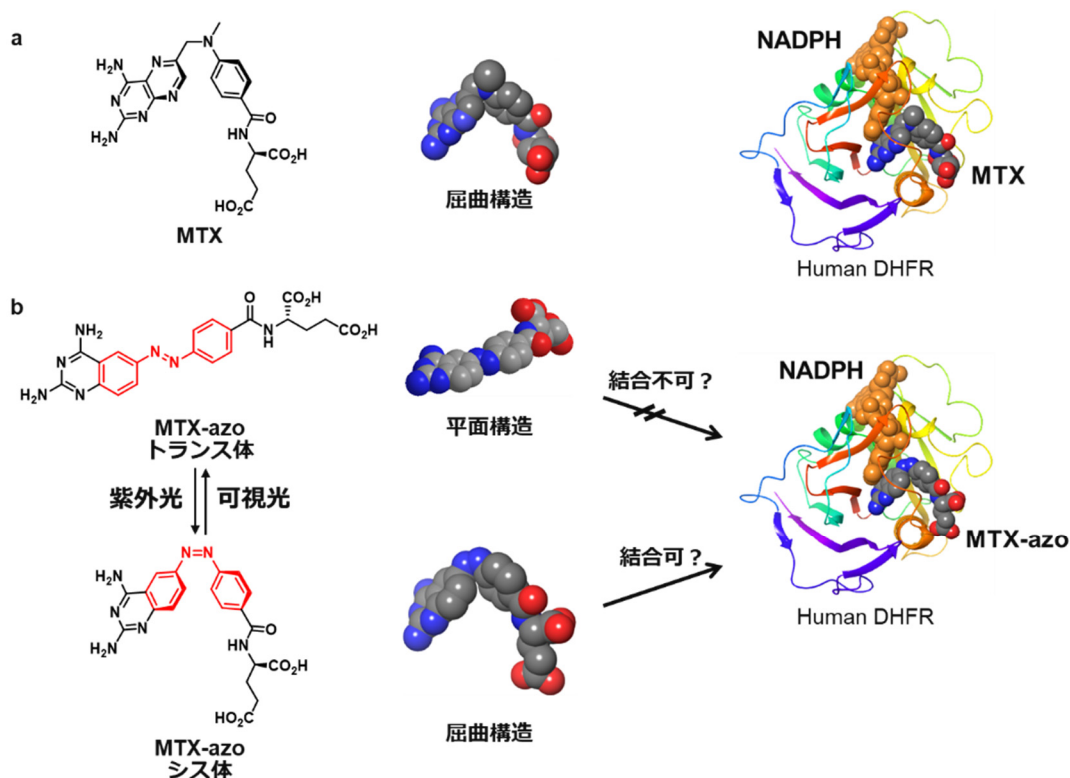


図 2. 光応答性 MTX の設計

a) MTX の構造と MTX とヒト DHFR の複合体の結晶構造 (PDB : 1U72)。複合体中で MTX は折れ曲がった構造をとっている。NADPH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型。b) 光応答性 **MTX-azo** の分子設計。 *trans* 体では平面構造のため DHFR と結合しない一方、 *cis* 体では折れ曲がった構造であるため DHFR と結合すると予想した。

2. MTX-azo の光異性化

MTX-azo の光異性化は紫外可視吸収スペクトルにより評価した。**MTX-azo** の吸収スペクトルは、紫外光照射 (365 ± 5 nm、 9.0 mW cm^{-2} 、5 分間) によって、 350 nm 付近の吸光度が大きく減少した (図 3)。その後、可視 (黄色) 光照射 (560 ± 5 nm、 9.0 mW cm^{-2} 、15 分間) により再び 350 nm 付近の吸光度が増大し、光照射前の吸収スペクトルとほぼ同じになった (図 3)。また、紫外光 (365 ± 5 nm、 9.0 mW cm^{-2} 、5 分間) および黄色光 (560 ± 5 nm、 9.0 mW cm^{-2} 、15 分間) を交互に照射し、 350 nm の吸光度の経時変化を測定したところ、1 分程度の紫外光照射で定常状態になったのに対し、黄色光照射時には定常状態になるまでに 10 分程度の照射が必要であった (図 4)。

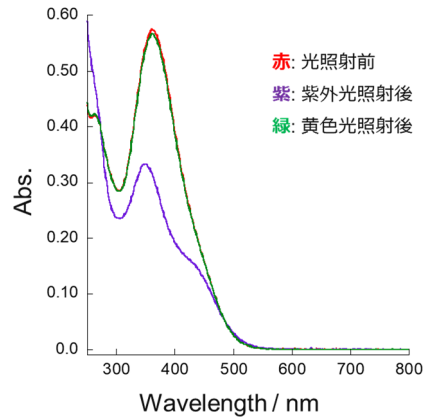


図 3. 光照射による MTX-azo の吸収スペクトルの変化

光照射前 (赤) の吸収スペクトルと比較して、紫外光照射後の吸収スペクトル (紫) では 350 nm 付近の吸収が大きく減少した。その後、黄色光照射したところ吸収スペクトル (緑) は光照射前の吸収スペクトルとほぼ同じになった。

[MTX-azo] = 30 μ M, 100 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (pH = 7.4), 100 mM NaCl, 1% DMSO (dimethylsulfoxide)

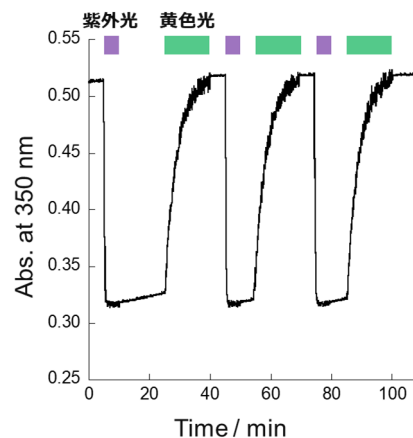


図 4. 連続的な光照射による MTX-azo の 350 nm の吸収度の経時変化

紫外光および黄色光を交互に照射しながら 350 nm の吸光度の経時変化を測定した結果。測定開始 5、45、75 分後に紫外光 (365 \pm 5 nm、9.0 mW cm⁻²、5 分間) を照射し、測定開始 25、55、85 分後に黄色光 (560 \pm 5 nm、9.0 mW cm⁻²、15 分間) を照射した。

[MYX-azo] = 30 μ M, 100 mM HEPES (pH = 7.4), 100 mM NaCl, 1% DMSO

2. MTX-azo の酵素活性阻害能

MTX-azo の酵素活性阻害能を大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来 DHFR (eDHFR) の酵素反応初速度により評価した。eDHFR によるジヒドロ葉酸の還元の際に消費されるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) に由来する 340 nm の吸光度の経時変化を追跡した (図 5a)。反応初速度は、測定開始から 15 秒間の 340 nm の吸光度の減少を、NADPH と NADP⁺ (酸化型) のモル吸光係数の差 ($\Delta \epsilon_{340} = 12.3 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) で割ることにより算出した。紫外光を照射していない MTX-azo を添加した際の酵素反応初速度 v_0 は、0.13 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ であったが、紫外光照射 (365 \pm 5 nm、6.0 mW \cdot cm⁻²、5 分間) した MTX-azo を添加した際の v_0 は 0.003 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ となった。また、阻害剤非添加における v_0 は 0.17 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ であり、MTX 添加における v_0 は 0.002 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ であった (図 5b)。

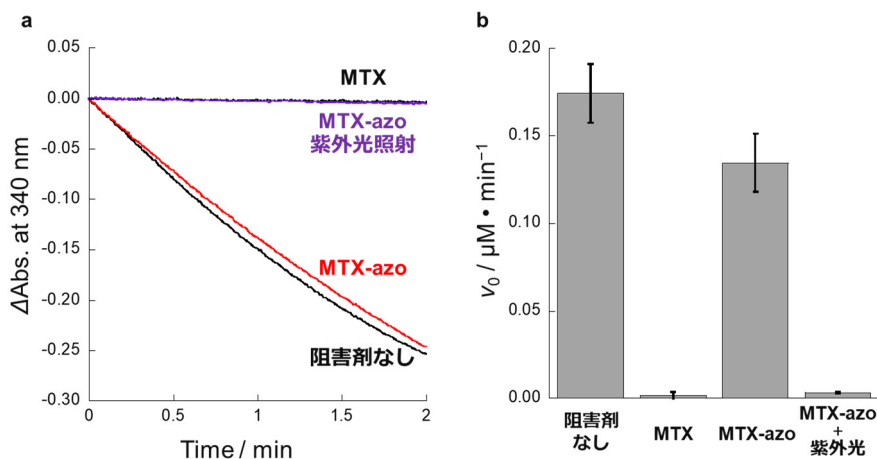


図 5. MTX-azo 存在下における紫外光照射の有無による酵素反応速度の差

a) 阻害剤として MTX または MTX-azo を添加した際、および阻害剤を添加していない際における 340 nm の吸光度の経時変化。b) MTX、MTX-azo 添加時、および阻害剤非添加時の酵素反応初速度を算出した結果（エラーバー：標準偏差、n = 3）。

[MTX] or [MYX-azo] = 100 nM, [eDHFR] = 10 nM, [ジヒドロ葉酸] = 50 μM, [NADPH] = 60 μM, 100 mM HEPES (pH = 7.4), 100 mM NaCl, 1% DMSO

考 察

吸収スペクトルから、MTX-azo は紫外光照射により *trans* 体から *cis* 体に、黄色光の照射により *cis* 体から *trans* 体に可逆的に異性化することが確認できた。また、黄色光照射後に光照射前の吸収スペクトルとほぼ同じになったことから、黄色光の照射により熱平衡状態に戻ることが示唆された。さらに、紫外光照射後の光非照射時には吸光度の増大が見られない一方で、黄色光照射時には吸光度が増大したことから、*cis* 体から *trans* 体への異性化は黄色光の照射により誘起されることがわかる。すなわち、MTX-azo は異なる波長の光照射により、その構造を可逆的に制御可能である。

また、酵素反応初速度測定により、紫外光非照射の MTX-azo は酵素活性阻害能が僅かである一方、紫外光照射によって酵素活性を完全に阻害することができた。以上から、臨床で使用される薬剤 MTX に光分子スイッチを導入することで、DHFR の酵素反応の光制御を達成した。今後、生細胞内の酵素反応を時空間的に可逆的に光制御可能かどうか調べ、新たな機能性薬剤としての可能性を探る予定である。

文 献

- 1) Velema WE, Szymanski W, Feringa BL. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. J. Am. Chem. Soc. 2014 Jan 23; 136(6):2178-2191. PMID: 24456115 DOI: 10.1021/ja413063e