

【目的】細胞分裂は、1つの親細胞が2つの等価な娘細胞へ分かれる現象であり、細胞核分裂と細胞質分裂に分かれる。細胞分裂の一連の流れとして、遺伝情報の発現や伝達などにおいて中心的な役割を果たす染色体（DNA・タンパク質複合体から成る構造体）が複製された後、均等に分配される細胞核分裂と、細胞膜が収縮環（ミオシンとアクチンから構成される構造体）によってくびり切れ、細胞質が等価に分配される細胞質分裂が連続して起こる。ところが、染色体や細胞質が不均一に分配され、非対称な細胞分裂が生じると、細胞は異常分化し、癌の発生など重篤な病態を引き起こす要因となる。細胞分裂は様々なタンパク質によって駆動されるが、本研究では、我々がこれまでに独自に確立してきた細胞分裂関連酵素の可逆的な光制御法を応用し、細胞質分裂で機能する ROCK（Rho-associated protein kinase）の活性を、「光」で可逆的に制御できる阻害剤を開発することを目的とした。

【方法】既存の ROCK 阻害剤を参考に、光で可逆的に *cis/trans* 異性化反応を誘起できるフォトクロミック部位を導入した光制御型 ROCK 阻害剤を、ドッキングシミュレーションを利用し、設計・合成した。得られた光制御型 ROCK 阻害剤の光異性化反応の解析を行い、各光定常状態における精製 ROCK の阻害活性の *in vitro* 試験を行なった。また、ウェスタンブロッティング法により細胞内の ROCK を阻害できるか否かをミオシン軽鎖のリン酸化状態で確認した。さらに、光制御型 ROCK 阻害剤を用い、細胞内アクチンストレスファイバーの維持および崩壊を光制御できるかを蛍光イメージングにて検討した。

【結果】ドッキングシミュレーションの結果、*trans* 体が効果的な ROCK 阻害剤として機能し、*cis* 体は ROCK 阻害効果が低いことが示唆された。実際に、合成した光制御型 ROCK 阻害剤に 405 nm の光を照射すると、*cis* 体 rich な光定常状態（94% *cis* 体）となり、525 nm の光を照射すると、*trans* 体 rich な光定常状態（83% *trans* 体）となった。また、精製 ROCK を用いて阻害活性を測定した結果、光照射前の状態（100% *trans* 体）で $IC_{50}=19\ \mu\text{M}$ 、525 nm の光照射時には $IC_{50}=34\ \mu\text{M}$ で阻害したのに対し、405 nm の光照射によって $IC_{50}=238\ \mu\text{M}$ と大きく阻害効果が減弱し、ドッキングシミュレーションの結果を支持するものであった。次に、光制御型 ROCK 阻害剤を細胞に投与し、各波長の光照射の有無によって、ROCK 依存的なミオシン軽鎖のリン酸化状態を検証した結果、光照射前あるいは 525 nm の光照射時にはミオシン軽鎖のリン酸化を阻害し、405 nm の光照射時にはその阻害効果は消失した。以上から、開発した光制御型 ROCK 阻害剤は、*in vitro* だけでなく、細胞系でも機能することを明らかとした。最後に、光制御型 ROCK 阻害剤を用いて、ROCK が関与する細胞内のアクチンストレスファイバーの崩壊・維持を蛍光イメージングによって検討し、光照射前および 525 nm の光照射時には、アクチンストレスファイバーは崩壊し、405 nm の光照射時には ROCK 阻害剤を添加していない条件と同様に、アクチンストレスファイバーが維持されることを見出した。以上から、本研究によって、細胞内構造体であるアクチンストレスファイバーの崩壊・維持を光操作できる分子ツールの開発に成功した。

光制御型 ROCK 阻害剤によるアクチンストレスファイバーの光操作

