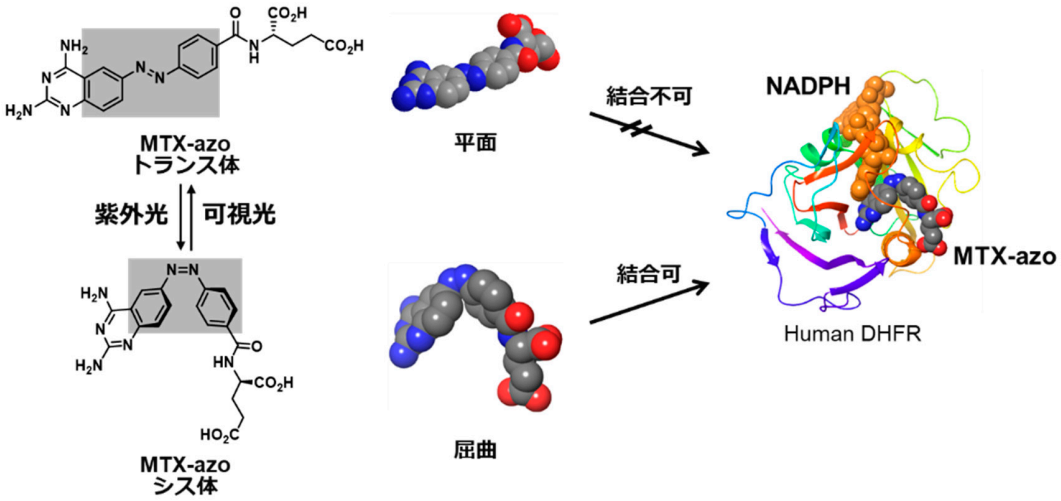
17　機能性分子設計に基づくタンパク質活性の可逆的光制御	水上　進

【目的】生体機能を光により時空間的に制御する技術は、動的な生体分子機能解析に有用なツールとなる。また、化合物の薬理活性を光により制御できれば、光を照射した部分にのみ薬理効果を発現させることも可能である。フォトクロミック分子を用いることで、ある波長の光により薬剤を活性化する一方で、別の波長の光により薬剤を不活性化することなども可能であり、このような手法が実現されれば、副作用を最小限にするような機能性薬剤の開発につながることが期待できる。そこで、本研究では抗がん剤およびリウマチ治療薬として知られているメトトレキセート（MTX）のフォトクロミック類縁体を開発し、メトトレキセートの細胞内標的酵素である葉酸代謝関連酵素［ジヒドロ葉酸還元酵素：dihydrofolate reductase（DHFR）］の活性を可逆的に光制御する手法の開発に取り組んだ。

【方法】MTX の構造の中央部分に可逆的に異性化するフォトクロミック化合物構造を導入した新規光応答性 MTX 類縁体（**MTX-azo**）を設計した。**MTX-azo** は紫外光照射によりジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）への結合能及び阻害活性を持つ一方、可視（黄色）光の照射により DHFR から解離すると予想した。**MTX-azo** は 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。また、**MTX-azo** の光異性化特性、および各異性体の DHFR 活性の阻害能について評価を行った。

【結果】紫外光の照射によって **MTX-azo** は熱平衡状態のトランス体からシス体に、黄色光の照射によりシス体からトランス体に異性化することが確認された。また、紫外光を照射していない **MTX-azo** を酵素反応溶液に添加した場合、酵素反応の進行が確認できたが、紫外光を照射した **MTX-azo** を添加した際には酵素反応の進行が抑制された。以上から、DHFR 活性を異なる波長の光照射によって可逆的に制御する新規化合物の開発に成功した。

光応答性 MTX 類縁体（**MTX-azo**）の構造と光異性化によって DHFR への結合能が変化する概念図



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，メトトレキセート

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、もし患部のみに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セート（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。

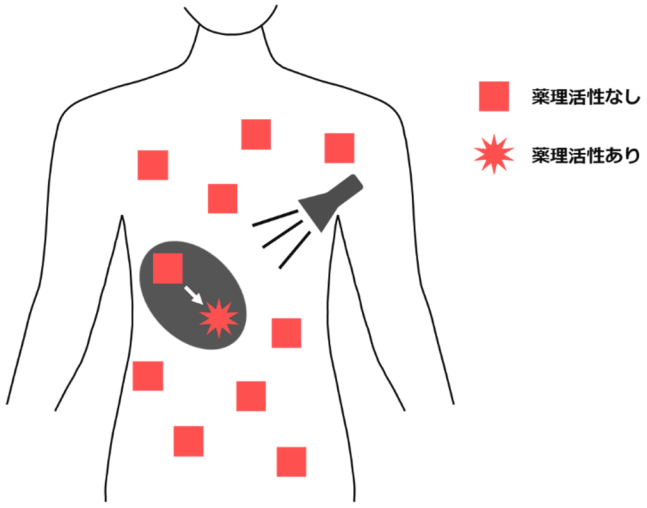


図 1. 光照射による薬剤の活性化
患部に光を当てることで患部の薬剤のみが活性化され、副作用を最小限にとどめることができる。

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。

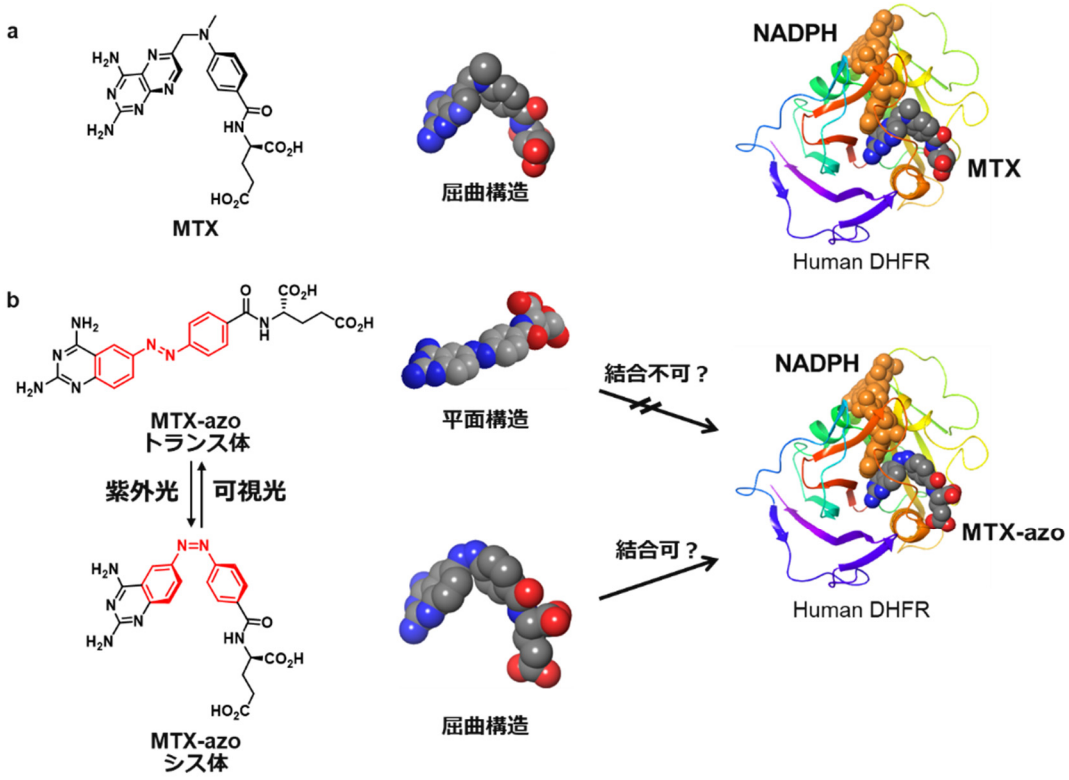


図 2. 光応答性 MTX の設計

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）。

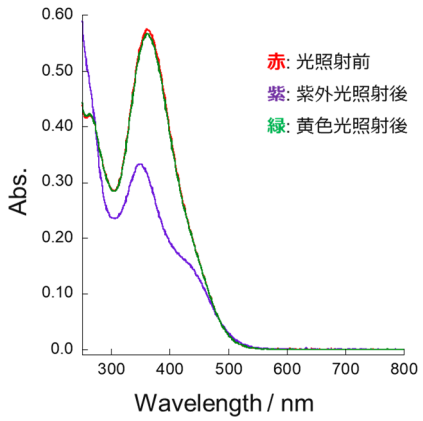


図 3. 光照射による MTX-azo の吸収スペクトルの変化

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 μM，100 mM HEPES（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）(pH = 7.4)，100 mM NaCl，1% DMSO（dimethylslufoxide）

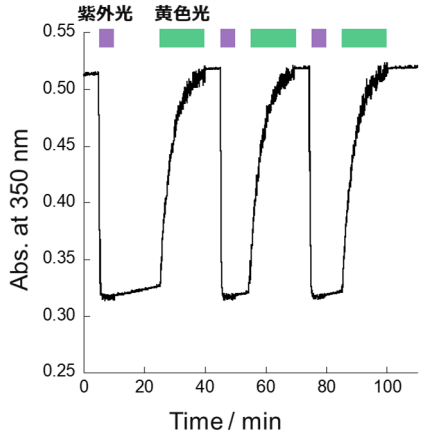


図 4. 連続的な光照射による MTX-azo の 350 nm の吸収度の経時変化

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±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±5 nm、9.0 mW cm^{-2}、15 分間）を照射した。

［**MYX-azo**］= 30 μM，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（$\Delta\varepsilon_{340}$ = 12.3 mM· 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 μM· min^{-1} であったが、紫外光照射（365 ± 5 nm、6.0 mW· cm^{-2}、5 分間）した **MTX-azo** を添加した際の v_0 は 0.003 μM· min^{-1} となった。また、阻害剤非添加における v_0 は 0.17 μM· min^{-1} であり、MTX 添加における v_0 は 0.002 μM· min^{-1} であった（図 5b）。

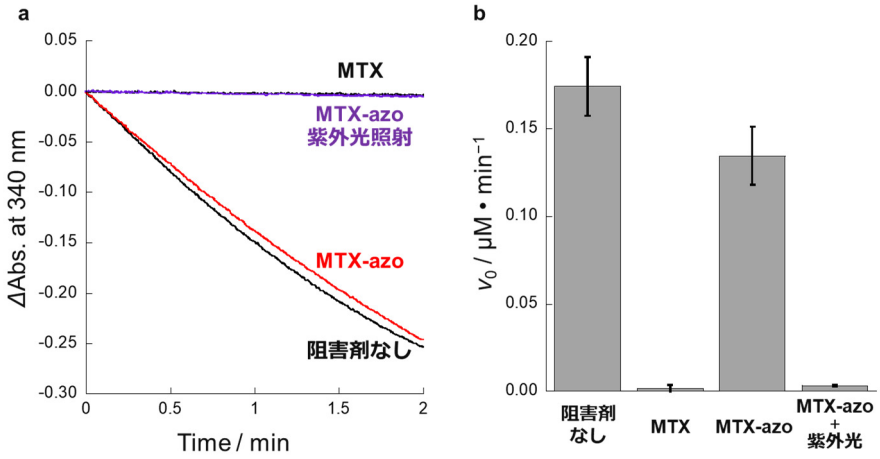


図 5. MTX-azo 存在下における紫外光照射の有無による酵素反応速度の差

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おいて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