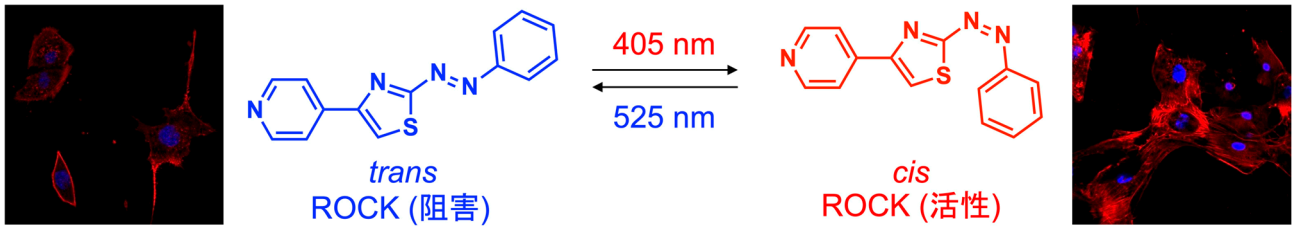
120　細胞内構造体を光操作する分子ツールの開発	松尾　和哉

【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 μM、525 nm の光照射時には IC_{50}＝34 μM で阻害したのに対し、405 nm の光照射によって IC_{50}＝238 μM 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



120. 細胞内構造体を光操作する分子ツールの開発

松尾　和哉

京都工芸繊維大学 分子化学系 生体高分子情報研究室

Key words：アクチン，Rho kinase，光薬理学，アゾベンゼン，阻害剤

緒　言

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、癌の発生などの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、核分裂（特に染色体の配列）では CENP-E（Centromere-associated protein E）が機能し、細胞質分裂では ROCK（Rho-associated protein kinase）が機能する。これまでに我々は、モータータンパク質 CENP-E が染色体を運搬する機構に着目し、光で可逆的に活性を制御できる光制御型 CENP-E 阻害剤 1 を報告した（図 1a）[1]。光制御型 CENP-E 阻害剤 1 は、アリルアゾピラゾール誘導体を分子骨格に含み、365 nm の光照射で 93% *cis* 体の光定常状態となり、510 nm の光照射で 88% *trans* 体の光定常状態となる。この *cis-trans* 光異性化反応を利用することで、CENP-E 阻害活性を光制御できる。光制御型 CENP-E 阻害剤 1 を用いることで、生きた分裂期細胞において、CENP-E が駆動する染色体の動きを光で操作することに成功した（図 1b）

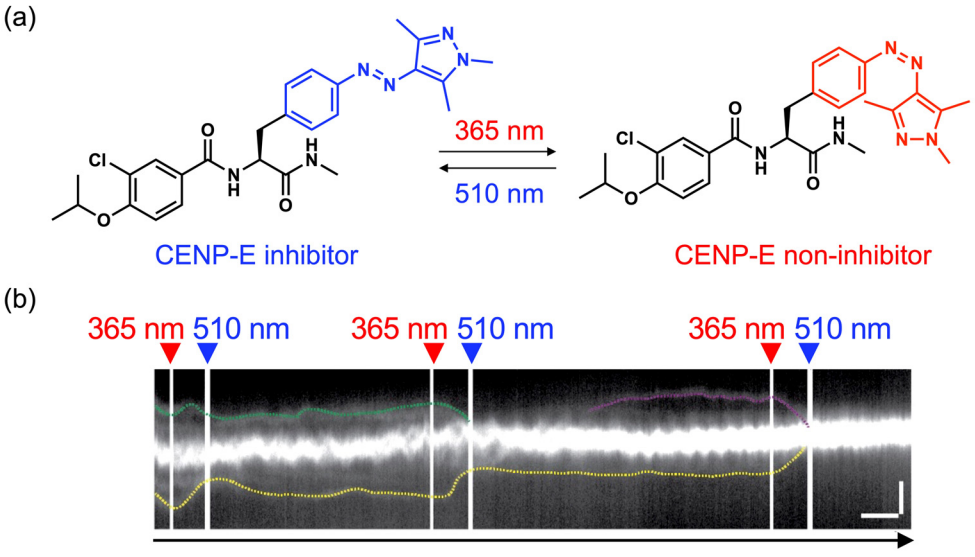


図 1. 光制御型 CENP-E 阻害剤 1 による分裂期染色体の光操作

a）光制御型 CENP-E 阻害剤 1 の分子構造と光応答性。

b）1 を用いた分裂期染色体の光操作（scale bar 縦 5 μm、横 5 min）。

本研究では、我々がこれまでに独自に確立してきたモータータンパク質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）[2] の活性を「光」で可逆的に制御することを計画した。ROCK は、GTP 結合タンパク質 Rho により活性化されるセリン・スレオニンタンパク質リン酸化酵素であり、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素のリン酸化を介してミオシン軽鎖を活性化し、細胞質分裂における収縮環のくびり切り運動を行う。そこで、操作性・時空間制御能に優れ、非侵襲的な外部刺激である「光」を利用し、可逆的な *cis-trans* 光異性化反応を示すアゾベンゼン誘導体を巧妙に阻害剤骨格中に導入することで、可逆的に光操作できる光制御型 ROCK 阻害剤を開発することを本研究の目的とした。

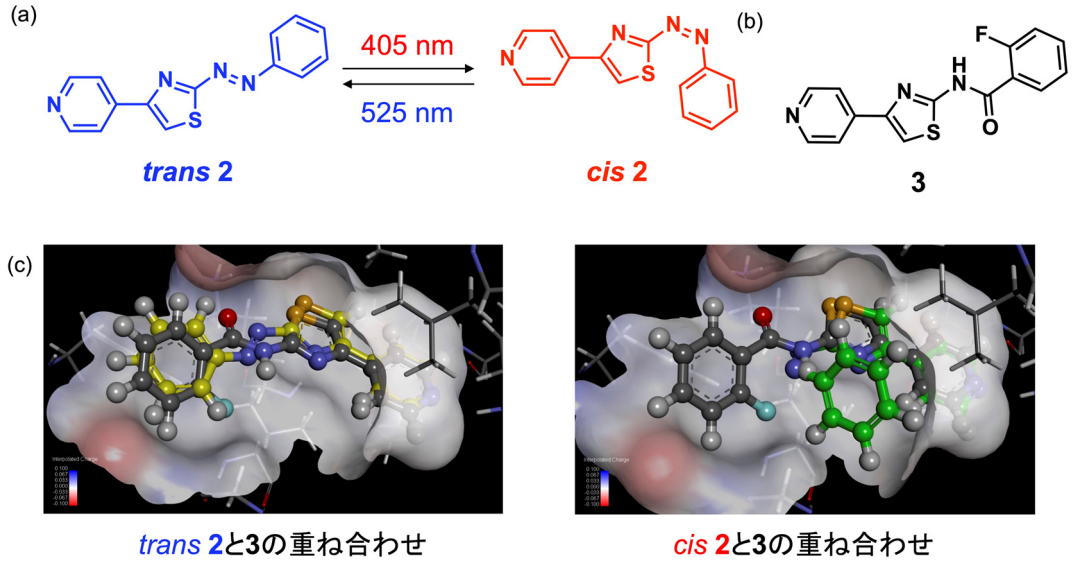


図 2. 光制御型 ROCK 阻害剤 2

a） 光制御型 ROCK 阻害剤の分子構造と光応答性。

b） 参考にした ROCK 阻害剤の分子構造。

c） DiscoveryStudio software で計算されたドッキングシミュレーション結果。

trans 2 は黄色、*cis* 2 は緑色、化合物 3 は灰色の炭素カラーで示されており、ドッキングスコアは *trans* 2 で 80.8、*cis* 2 で 56.7 であった（スコアが高い方が安定）。

開発した ROCK 阻害剤 2（図 2a）は、405 nm および 525 nm の光を照射することで、*cis-trans* 光異性化反応を誘導でき、それに応じて ROCK 阻害活性を制御できた。また、2 を用いて細胞内の ROCK 活性を光制御することにより、細胞内構造体であるアクチンストレスファイバーを光操作することに成功した［3］。

方　法

1. 光制御型 ROCK 阻害剤の設計と合成

既存の ROCK 阻害剤における X 線結晶構造解析の結果（PDB ID : 4YVC）[4] を参考にして、ドッキングシミュレーションを行い、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 2 を、設計・合成した。

2. 光制御型 ROCK 阻害剤の光応答性および ROCK 阻害活性評価

得られた光制御型 ROCK 阻害剤 2 の光異性化反応を解析し、各光定常状態での *cis* 体および *trans* 体の割合を算出した。また、2 を用い、各光定常状態における ROCK kinase 活性を測定することで、ROCK 活性を光制御できること

を *in vitro* で確認した。さらに、ウェスタンブロッティング法により細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化状態を確認することで細胞内の ROCK を阻害できることを確認した。

3. 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制御

ROCK は、アクチン系の細胞骨格の制御を担っており、アクチンストレスファイバーの形成に必須となる。そこで、細胞を血清飢餓状態にし、アクチンストレスファイバーを誘導したのち、光制御型 ROCK 阻害剤 2 を投与することで、ROCK 阻害によるストレスファイバーの維持・崩壊を蛍光イメージングによって観測した。

結果および考察

1. ドッキングシミュレーションによる光制御型 ROCK 阻害剤の設計

ROCK 阻害剤 3（図 2b）と ROCK との共結晶構造を参考に、光制御型 ROCK 阻害剤として化合物 2 を設計した。化合物 2 は、3 のアミド部位をアゾ基（-N=N-）で置き換えた構造であり、この *trans* 体と *cis* 体で、ROCK とのドッキングシミュレーションをそれぞれ行うと、*trans* 体において 3 の構造とよく一致しており、*cis* 体ではベンゼン部位が大きく結合ポケットから露出していた（図 2c）。また、得られたドッキングスコアも *trans* 体の方が *cis* 体よりも良好であったことから、化合物 2 を光制御型 ROCK 阻害剤の候補とし、化学合成し、^{1}H-NMR および^{13}C-NMR と HR-MS により同定した。

2. 光制御型 ROCK 阻害剤の光応答性評価

化合物 2（20 μM）の光応答性を UV-Vis 吸光光度計により解析した結果（図 3a）、光照射前の 100% *trans* 体条件では、385 nm 付近に π-π*遷移に対応する吸収を示し、475 nm 付近には n-π*遷移に対応した吸収を示した。ここに 405 nm の紫色光を照射し、光定常状態に達すると、94% *cis* 体に対応する吸収スペクトルを示した。さらに、525 nm の緑色光を照射すると、再び *trans* 体リッチな吸収スペクトルを示し、この光定常状態では 83% *trans* 体であった。この 405 nm と 525 nm の光照射による吸光スペクトルの変化は何度も繰り返すことができた。また、2 の *cis* 体の熱安定性（寿命）を解析すると、37℃において 32 分であった。以上から、化合物 2 は 405 nm と 525 nm の光を用いることで、*cis-trans* 光異性化反応を制御できることが確認できた。

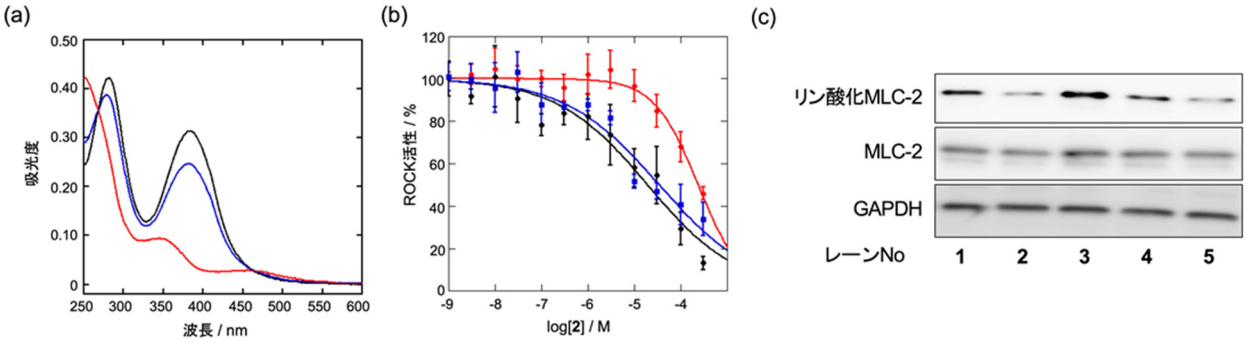


図 3. 光制御型 ROCK 阻害剤の光応答性と ROCK 阻害活性

a) 光制御型 ROCK 阻害剤 2 の吸収スペクトル変化（黒：光照射前、赤：405 nm の光照射した際の光定常状態、青：525 nm の光照射した際の光定常状態）。

b) 精製 ROCK を用いたキナーゼアッセイ結果（黒：光照射前、赤：405 nm の光照射した際の光定常状態、青：525 nm の光照射した際の光定常状態）。

c) MLC-2 のリン酸化を解析したウェスタンブロッティング結果（レーン 1：DMSO、レーン 2：2 光照射前、レーン 3：2 405 nm 光照射時、レーン 4：2 525 nm 光照射時、レーン 5 化合物 3）。

3. 光制御型 ROCK 阻害剤の ROCK 阻害活性評価

得られた 2 の精製 ROCK に対する阻害活性を、ADP-Glo システム（Promega）を用いたキナーゼアッセイにより検討した（図 3b）。その結果、*trans* 体リッチな条件である光照射前には IC_{50}＝19±5.5 μM、525 nm の光照射時には IC_{50}＝34±9.3 μM であったのに対し、405 nm の光照射により *cis* 体リッチな条件にすると、IC_{50}＝238±26 μM と、阻害効果は大きく減弱した。以上から、*in vitro* 試験において、化合物 2 は光制御型 ROCK 阻害剤として機能することを明らかにした。

次に、光制御型 ROCK 阻害剤 2 が細胞内でも同様に機能するかを検討するため、Balb 3T3 細胞を用いて、2（100 μM）の存在下、ROCK が触媒する MLC-2（ミオシン軽鎖）のリン酸化をウェスタンブロッティング法により解析した。図 3c に示したように、光照射前あるいは 525 nm の光照射時において、リン酸化 MLC-2 のバンドは大きく減弱したのに対し、405 nm の光照射時に、リン酸化 MLC-2 のバンド強度はコントロールである DMSO 添加条件と変化なかった。以上から、細胞系でも機能する光制御型 ROCK 阻害剤であることが確認できた。

4. 光制御型 ROCK 阻害剤による細胞内構造体の光制御

最後に、ROCK が制御する細胞内構造体の 1 つであるアクチンストレスファイバーを光操作した。Balb 3T3 細胞を血清飢餓状態にし、アクチンストレスファイバーの構築を誘導した後、光制御型 ROCK 阻害剤 2 を投与し、ROCK の機能が阻害されることで、アクチンストレスファイバーが崩壊するかを蛍光イメージングにより検討した（図 4）。光照射前および 525 nm の光照射時にはファイバー状の構造体が観測されなかったことから、ROCK 阻害剤 3 の時と同様に ROCK が阻害され、アクチンストレスファイバーが崩壊したことが示唆された。また、405 nm の光照射時には DMSO 添加条件と同様にファイバー状の構造体が維持されていたことから、ROCK は活性な状態であることが考えられた。以上から、光制御型 ROCK 阻害剤 2 を用いることで、細胞内の構造体であるアクチンストレスファイバーの維持・崩壊を光操作すること成功した。

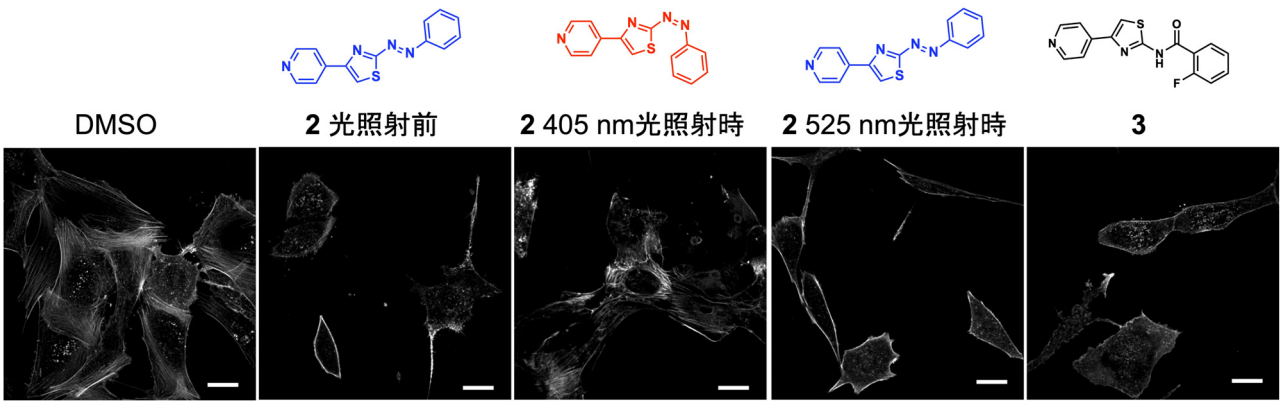


図 4. 光制御型 ROCK 阻害剤によるアクチンストレスファイバーの制御
血清飢餓状態の Balb3T3 細胞内のアクチンファイバーを rhodamine phalloidin で染色し、イメージングした（スケールバー：25 μm）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学薬学研究科薬化学教室の川口充康講師、中川秀彦教授である。

文　献

1) Mafy NN, Matsuo K, Hiruma S, Uehara R, Tamaoki N. Photoswitchable CENP-E Inhibitor Enabling the Dynamic Control of Chromosome Movement and Mitotic Progression. J Am Chem Soc. 2020 Jan 29;142(4):1763-1767. doi: 10.1021/jacs.9b12782. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31927956.

2) Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. Cytoskeleton (Hoboken). 2010 Sep;67(9):545-54. doi: 10.1002/cm.20472. PMID: 20803696; PMCID: PMC3038199.

3) Matsuo K, Thayyil S, Kawaguchi M, Nakagawa H, Tamaoki N. A visible light-controllable Rho kinase inhibitor based on a photochromic phenylazothiazole. Chem Commun (Camb). 2021 Nov 23;57(93):12500-12503. doi: 10.1039/d1cc04905d. PMID: 34751279.

4) Green J, Cao J, Bandarage UK, Gao H, Court J, Marhefka C, Jacobs M, Taslimi P, Newsome D, Nakayama T, Shah S, Rodems S. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Pyridine-Based Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. J Med Chem. 2015 Jun 25;58(12):5028-37. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00424. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26039570.