

機能性分子設計に基づく生体機能の光制御技術の開発

東北大学多元物質科学研究所細胞機能分子化学研究分野

水上 進

【研究目的】

生体分子の動的ネットワークを破壊せずに「ありのままの生体分子の機能」を調べられるバイオイメージング技術は、近年の生物学研究に幅広く用いられている。一方、生体分子の観察と操作を同時に行うことにより、生体分子の動的ネットワークシステムを時空間的に再構成して解析する研究技術が近年大きな注目を集めている。光感受性保護基を薬物構造に導入した「ケージド化合物」は、蛍光顕微鏡下で光照射によって非可逆的に活性化させることが可能である。特に、ケージド ATP やケージドグルタミン酸を用いることで、局所の神経活動の光活性化が可能になるなど神経科学分野で著しい貢献を果たしてきた。2000 年代に入ると、光応答性イオンチャネルを用いて神経活動を活性化可能な「オプトジェネティクス」が開発され、生体機能の光制御技術は新たな局面に入っている。その一方で、既存的手法にはまだ幾つかの未解決課題も残されている。ケージド化合物の最大の問題点はその非可逆性にあり、活性化した分子の完全な除去は特に細胞内の場合は非常に困難である。また、オプトジェネティクスでは蛋白質を用いるために、遺伝子工学を用いて生細胞や動物個体の局所に自在に発現可能という長所を持つが、作用の持続時間の任意制御や瞬時の不活性化などは課題として残されている。そこで、本研究において、汎用的な蛋白質機能の光制御技術開発につなげるために、その基盤技術となるタグ蛋白質への結合・解離を可逆的に光制御可能なシステムの開発に取り組んだ。

【方法と結果】

タグ蛋白質としては大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (*E. coli* dihydrofolate reductase: eDHFR) を、それに結合するリガンドとしてメトトレキサート (methotrexate: MTX) を選択した。このシステムは最近ではほとんど用いられることは無いが、実際に生物学研究のツールとして用いられたことがある蛋白質リガンドのペアである。eDHFR と MTX の複合体の結晶構造データから、eDHFR 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 **azoMTX** を設計した (図 1)。**azoMTX** は E 体では平面構造を取り、Z 体では折れ曲がった構造を取ることが予想されるため、E 体は eDHFR に結合しにくい一方で、折れ曲がった構造の Z 体は eDHFR に結合すると予想し、光照射によって **azoMTX** と eDHFR の結合を制御できると考えた。**azoMTX** 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。

azoMTX の光異性化は紫外可視吸収スペクトルにより評価した。**azoMTX** の吸収スペクトルは、紫外光照射

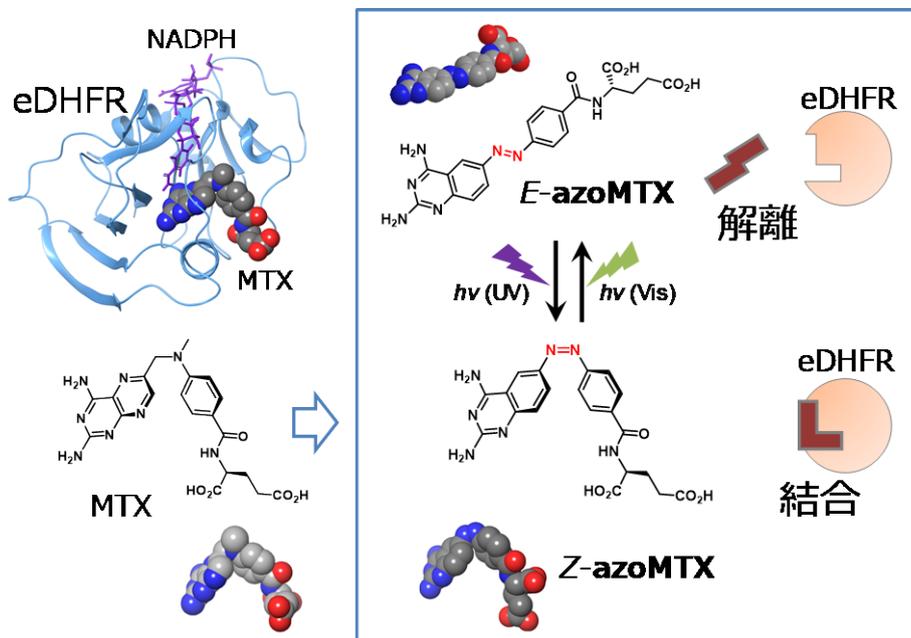


図 1. 光可逆的ラベル化リガンド **azoMTX** の分子設計

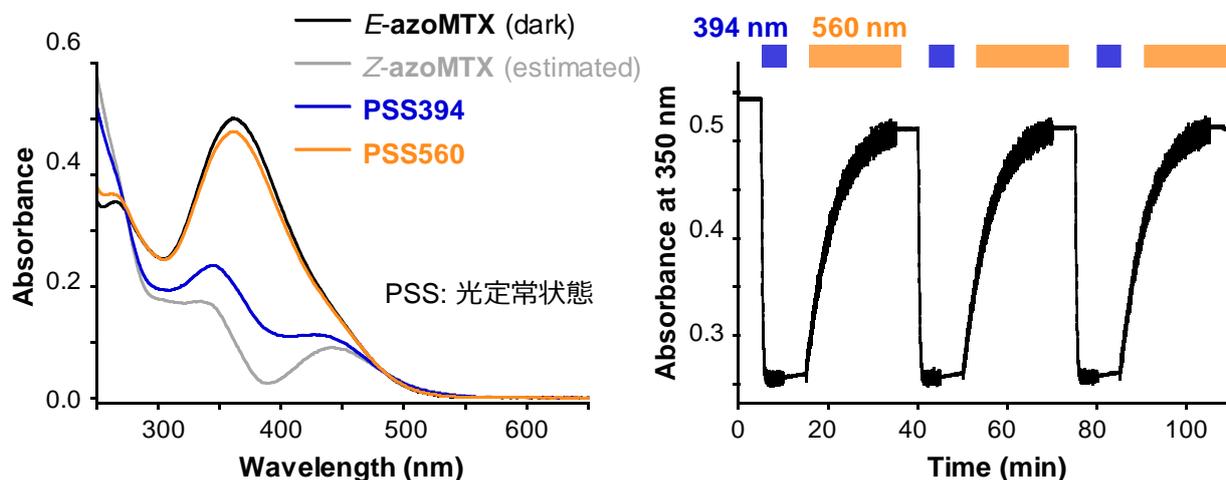


図 2. azoMTX の光照射下における光化学物性

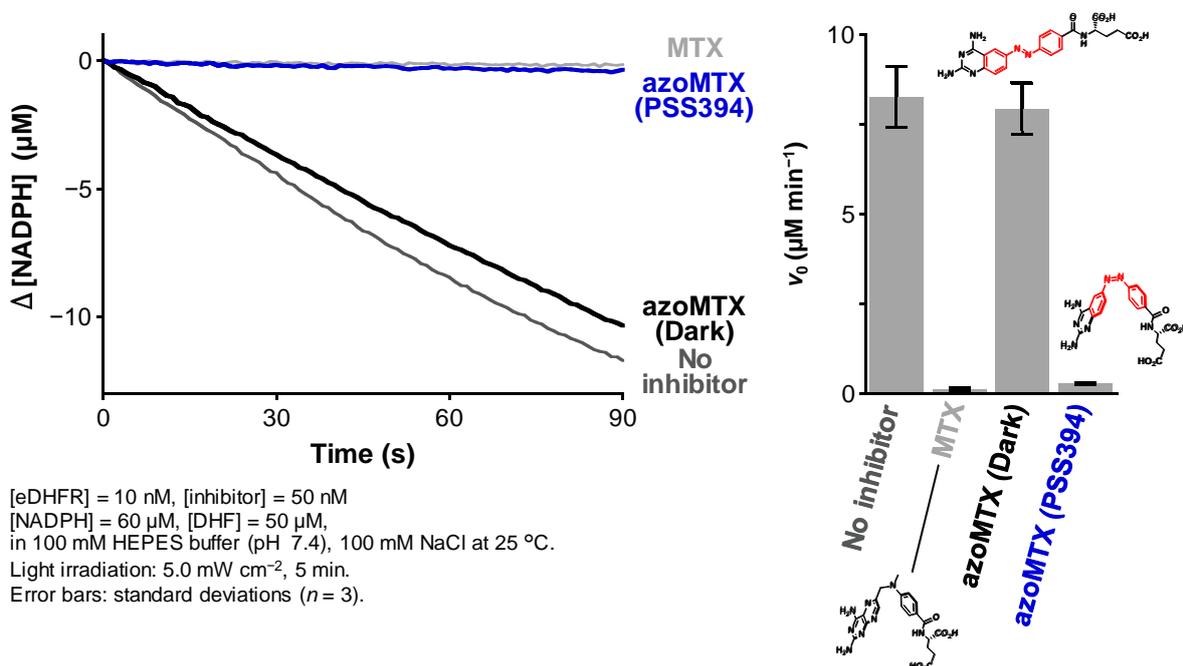


図 3. azoMTX による eDHFR 酵素活性の阻害

射 (394 nm) によって、350 nm 付近の吸光度が大きく減少した。その後、可視 (黄色) 光照射 (560 nm) 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 2 左)。また、紫外光 (394 nm) および黄色光 (560 nm) を交互に照射し、350 nm の吸光度の継時変化を測定したところ、可逆的に光異性化が確認された (図 2 右)。azoMTX の光異性化についてさらに詳細に評価するため、光定常状態での E 体、Z 体の比率について逆相 HPLC を用いて算出した。その結果、光非照射時ではほぼ 100% が E 体であったが、様々な波長光照射で異なる割合で異性化が起こり 394 nm の光照射では Z 体が 75%、560 nm の光照射では Z 体が 9% となった。

azoMTX の酵素活性阻害能を 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還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) に由来する 340 nm の吸光度の継時変化を追跡した。反応初速度 v_0 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 ($\Delta\epsilon_{340} = 12.3 \text{ mM cm}^{-1}$) で割ることにより算出した。阻害剤非添加における酵素反応の v_0 と比べて azoMTX を添加した際の v_0 は、紫外光非照射においては顕著な阻害は観察されなかったが、紫外光照射 (394 nm) においては、ほぼ同濃度の MTX を添加としたときと同程度の酵素反応阻害が観察された (図 3)。

最後に、蛍光偏光を利用して azoMTX と eDHFR の親和性について評価した。蛍光色素フルオレセインで蛍光ラベルした MTX (MTX-FI) を合成し、あらかじめ MTX-FI と eDHFR を混合し、複合体を形成させた後、合成リガンドを添加しその蛍光偏光度の変化を算出することで、eDHFR に対するリガンドの親和性を算出できる。MTX、E-azoMTX、Z-azoMTX が MTX-FI を半分追い出す濃度 IC_{50} はそれぞれ 3.2 nM、45 nM、3.4 nM であった。すなわち、 IC_{50} の値で比較した場合に azoMTX は E 体、Z 体で約 10 倍以上の eDHFR に対する親和性の違いがあることが示された (図 4)。

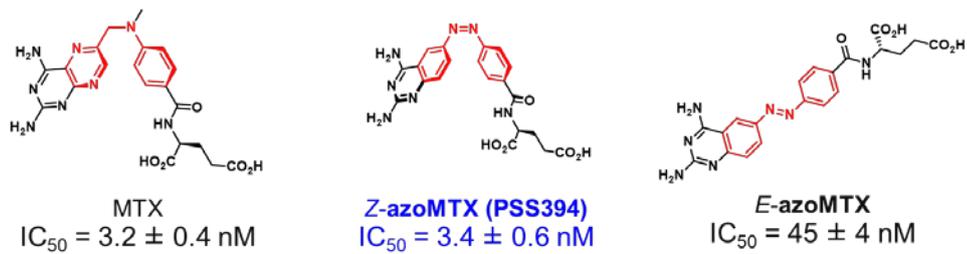
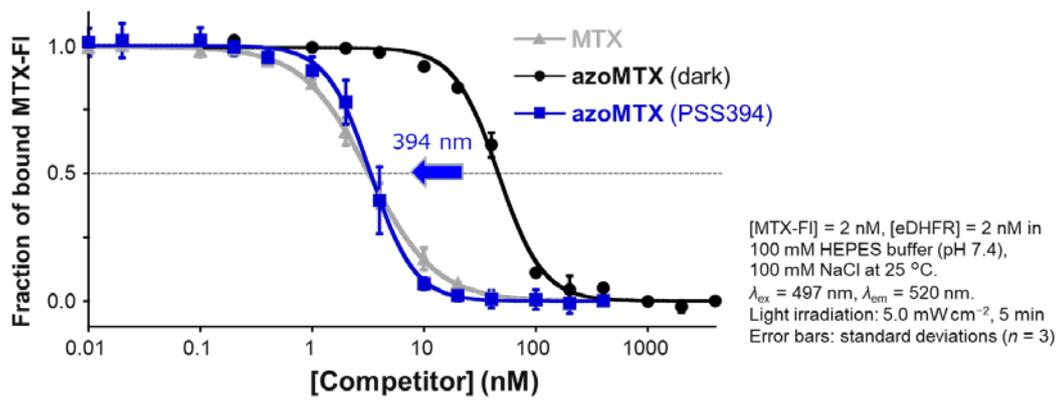


図 4. azoMTX の eDHFR への結合能の光照射による変化 (蛍光偏光競合アッセイによる)

【結論】

以上、本研究では結晶構造に基づいた合理的な分子設計により、標的蛋白質 eDHFR に対する親和性を光照射によって可逆的に大きく変換できる光応答性リガンド **azoMTX** を開発した。今後、本システムを生細胞系へと適用し、生体機能の可逆的な光制御技術の開発へと繋げる予定である。