「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：光センサータンパク質は温度センサーの機能も持つ(?)

寺嶋正秀
（京都大院理・A01 計画研究代表者）

論文題目：" Temperature sensitive reaction of a photosensor protein YcgF: Possibility of a role of temperature sensor "
著者：Y.Nakasone, T. Ono, A. Ishii, S.Masuda, M.Terazima
雑誌巻号：*Biochemistry, 49, 2288-2296(2010).*

多くの生物は、環境に合わせて生活するために、外界の情報を感知するセンサータンパク質を持つ。例えば、光環境を知るために、多くの生物はロドプシンなどの光センサータンパク質を持っている。しかしそうしたセンサータンパク質が、同時に他のセンサーとして働くことはないのであろうか。ここでは、YcgF と呼ばれる大腸菌の持つ光センサータンパク質の光反応とその温度効果を調べ、温度センサーとして働いている可能性を見いだしたので報告する。

この YcgF は、BLUF ドメインと呼ばれる光受容を担うドメインを有しており、その光反応が多くの興味を集めている。我々は、光反応に伴う体積変化や拡散係数変化を高い時間分解能で測定可能な過渡回折格子（TG）法を適用することで、従来の測定手法では検出が困難な BLUF ドメインの反応を時間分解で検出してきた。今回は、これら重要部位の初期状態や光誘起反応に対する温度効果を調べた。

波長 465nm のパルス光で励起した後の TG 信号を図１に示す。この信号は、YcgF 分子が溶液中を拡散していく過程を反映した信号である。種々のグレーティング波数での測定により、その拡散係数変化速度を求めることができた。更に、濃度変化の実験によって、この速度が濃度上昇とともに増えることが分かり、YcgF の光励起によって、光誘起ダイマー化が主に起こっていることがわかった。また、このダイマー化が光センサーとしての機能に重要であることを示せた。次に、この機能に関係した拡散係数変化の温度依存性を調べた。すると、温度減少に伴って、ダイマー化をあらわす拡散信号強度が顕著に減少した(図 1)。詳細な解析の結果、YcgF は暗状態でダイマー・モノマー間の平衡にあり、モノマーを励起した時のみ会合反応がおこるが、ダイマーを励起したのではこうした反応がおこらないこと、信号強度が低温で減少したことは温度低下に伴い暗状態でダイマーとして存在する分子数が増えているのを反映していることなどが明らかとなった。すなわち、モノマー・ダイマー間の平衡定数が温度により変化し、低温になると光センサーとしての機能が落ちることを示している。すなわち、このタンパク質は温度によっても働きを変え、温度センサーとしての機能を持つことを示唆したことになる。こうした光・温度センサーとしての機能は、植物の持つフォトトロピンという光センサーでも見出されている。

この温度効果というのは、まさに揺らぎが関与した反応であり、機能への揺らぎの寄与を表している可能性がある。

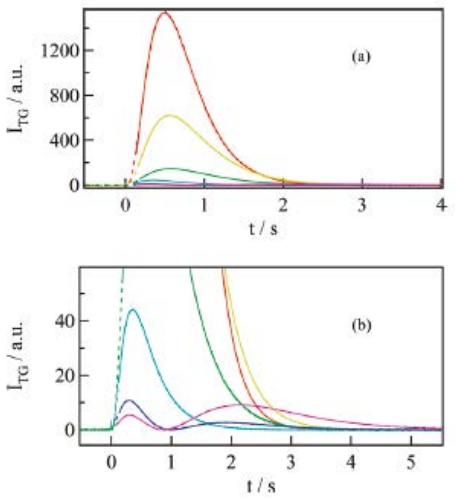



図１　TG 信号の温度依存性。赤:308 K, 黄 303 K, 緑 298 K, シアン 288 K, 青 283 K。(b)は(a)の信号の弱い部分を拡大した図。

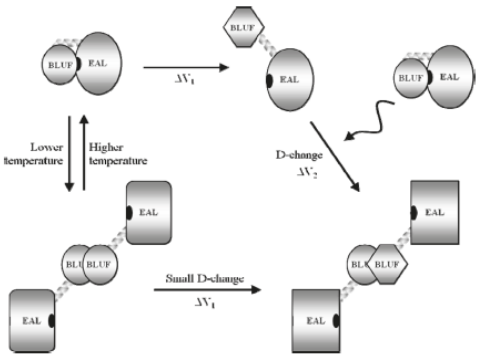



図２　光センサータンパク質 YcgF の反応スキーム。暗状態ではモノマーとダイマーの平衡にあり(左の 2 つ)、モノマーの光励起によって構造が変わりダイマー化反応がおこる(上のスキーム)が、ダイマーの光励起によっては、そうした変化は見られない。

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：ハイブリッドリポソームの大腸がん肝転移に対する治療効果

上岡龍一
(崇城大学応用生命科学・A03 計画研究代表者)
松下　琢
(崇城大学応用生命科学・A03 公募研究代表者)

論文題目：" Histological bioanalysis for therapeutic effects of hybrid liposomes on the hepatic metastasis of colon carcinoma *in vivo* "
著者：Hideaki Ichihara, Kota Funamoto, Taku Matsushita, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka*
雑誌巻号：*International Journal of Pharmaceutics,* **394**, 174–178 (2010)

筆者らが創製したハイブリッドリポソーム(HL)は[1]、従来の制がん剤なしに HL のみで種々のヒトがん細胞に対し増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することが明らかになっている[2]。*in vivo* において、担がんマウスを用いた治療実験から延命効果が得られ[3]、正常動物を用いた安全性試験で副作用が無いことが確認されている[4]。生命倫理委員会承認後の悪性リンパ腫患者に対する臨床試験において、高い安全性および延命効果が得られている[5]。

本研究では、*in vivo* における大腸がんの肝転移マウスモデルに対する HL の治療効果を肝臓組織切片の組織学的分析により検討した。以下に結果を示す。

①HL は、直径約 100nm の均一なベシクルの形態であることが観察された。動的光散乱法からは、1 ヶ月以上安定であることが明らかとなった。すなわち、HL は細網内皮系への取り込みが回避可能な膜直径であり、長期間安定で、臨床応用における保存に有用であることが明確となった。

②蛍光ラベルした大腸がん細胞をマウスの脾臓内へ移植したところ、マウスの肝臓組織で蛍光標識がん細胞が認められた。大腸がん細胞の肝臓への転移が、組織学的分析により確認された。

③大腸がんの肝転移モデルマウスに対して HL を尾静脈投与し、治療後に肝臓を取り出し、肝臓重量、ヘマトキシリンーエオシン染色、マッソントリクローム染色および大腸がんの腫瘍マーカーである CEA での免疫染色法により治療効果を検討した。未治療群の肝臓においては、大腸がんの肝転移によるさまざまな異常所見が見られたが、HL 治療群では、がん細胞を移植していないノーマルマウスの肝臓とほぼ変わらず、顕著な治療効果が確認された（図 1－2)。

④肝転移モデルマウスに対して HL を尾静脈投与し安全性を検討したところ、毒性は認められず、HL の高い安全性が確認された。

以上のように、大腸がんの肝転移に関して、薬物を含まない HL のみによる副作用のない顕著な治療効果が動物レベルでの組織学的分析により確認されたことは、非常に興味深い。

HL の大腸がんの肝臓転移に対する「副作用のないアポトーシス誘導による治療効果」が初めて認められ、大腸がんの新しい治療薬として期待できる。

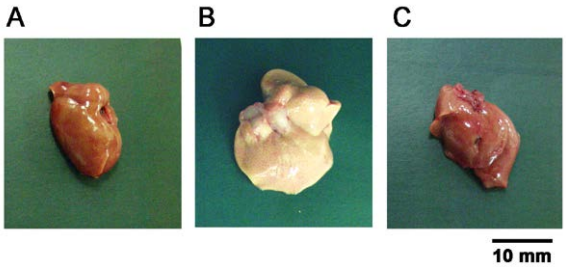



図 1　HL で治療した大腸がん肝転移モデルマウスの肝臓写真
A:正常、B：未治療、C:HL 治療
HL 治療群は正常群と同様に回復した。

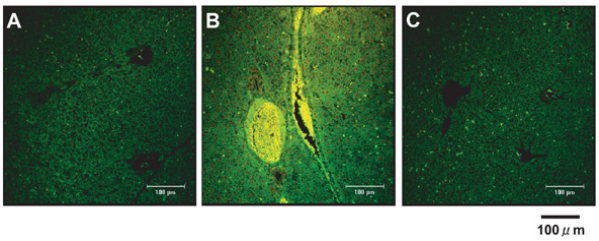



図 2　HL で治療した大腸がん肝転移モデルマウスの肝臓組織の CEA（腫瘍マーカー：黄色）免疫染色写真
A:正常、B：未治療、C:HL 治療
HL 治療群は正常群と同様に CEA は確認されなかった。

参考文献

[1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.,* **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto et al., *Int. J. Cancer,* **115,** 377-382 (2005). [3] R. Ueoka et al., *Biol. Pharm. Bull.,* **23**, 1262-1263 (2000). [4] H. Nagami et. al., *Int. J. Pharm.,* **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.,* **28** 1187-1196 (2008).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：ハイブリッドリポソームの原発性体腔性リンパ腫(Primary effusion lymphoma)に対する *in vitro* および *in vivo* での増殖抑制効果

上岡龍一
（崇城大生物生命・A03 計画研究代表者）
岡田誠治
（熊本大学エイズ研・A03 公募研究代表者）

論文題目：“Hybrid liposomes inhibit the growth of primary effusion lymphoma *in vitro* and *in vivo*”
著者：Tomomi Towata, Yuji Komizu, Shinya Suzu, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka*, and Seiji Okada*
雑誌巻号：*Leukemia Research* **34**, 906–911 (2010)

エイズ関連悪性リンパ腫のひとつである原発性体腔性リンパ腫 (Primary Effusion Lymphoma ; PEL) は、腫瘤形成を欠き、体腔内滲出液を初発として発症する稀なリンパ腫であり、約 80%がエイズ患者に発症する。PEL は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 感染に起因する。PEL の治療は、多剤併用療法 (HAART) と化学療法で行われるが、抗がん剤に対して耐性であり、50%生存期間 6.2 ヶ月という予後不良の悪性リンパ腫である。そのため、PEL に対する安全で効果的な新しい治療薬の開発が急務となっている。

これまでの研究により、ハイブリッドリポソーム (HL) は、種々の培養がん細胞に対して、細胞レベルおよび動物レベルでがん細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した。患者様へのインフォームド・コンセントを経て、生命倫理委員会承認後の臨床応用では、副作用が無く、リンパ腫の縮小効果を得ている。さらに、HL は、正常細胞とがん細胞の膜の揺らぎを見分けて、がん細胞のみに融合蓄積し、アポトーシスを誘導する制がんメカニズムを報告した。

本研究では、リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 $C_{12}(EO)_n$ からなるハイブリッドリポソーム (HL-n; n = 21, 23, 25) を用い、HL-n の PEL に対する *in vitro* および *in vivo* での増殖抑制およびアポトーシス誘導について検討した。

HL-n の増殖抑制に関し、HL-21 は、PEL 細胞株 (BCBL-1, BC-1, BC-3) に対して、最も効果的に PEL 細胞の増殖を抑えることを *in vitro* で明らかにした。

次に、PEL の細胞死を形態学的・生化学的に検証したところ、HL-21 は、PEL 細胞に対して、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

さらに、*in vivo* での PEL 細胞増殖抑制について、高度免疫不全マウスを用いて、体腔液貯留を主症状とする PEL モデルを作成した (図 1)。未処理のマウスは、腹部の膨張、腹水の増大・体重の増加が認められた。一方、HL-21 処理したマウスは、未処理と比べ、腹部の膨張は無く、腹水量の有意な減少が認められた。これらの結果から、HL の PEL に対する増殖抑制を *in vivo* で初めて明らかにした。

以上の結果より、HL がエイズ関連悪性リンパ腫 (PEL) に対して、副作用の無い新しい治療薬の可能が期待できる。

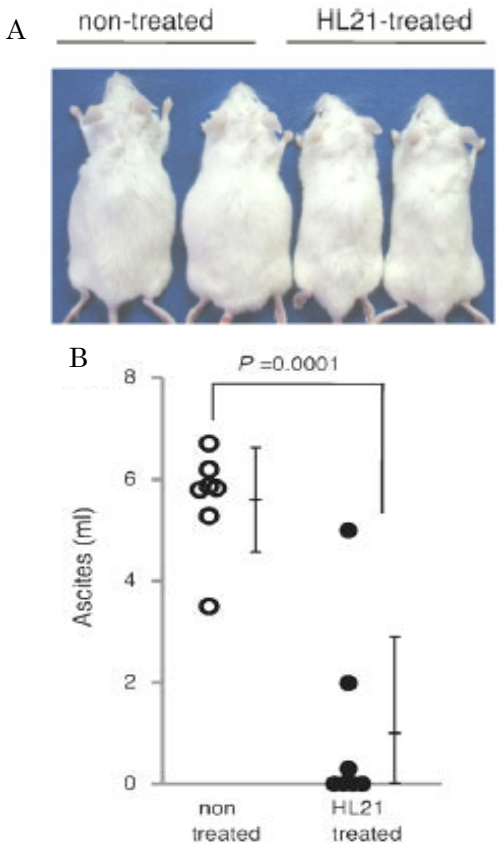



図1 HL-21は *in vivo*でPEL細胞の増殖を抑制する。
A. 高度免疫不全マウスにBCBL-1細胞を移植3週間後の写真。写真左が未処理のマウス、右がHL-21処理群。腹部の膨張が認められた。B.マウス腹水量。左が未処理、右がHL-21処理。

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：ハイブリッドリポソームの胆管がんに対する増殖抑制効果

上岡龍一
（崇城大生物生命・A03 計画研究代表者）
岡田誠治
（熊本大学エイズ研・A03 公募研究代表者）

論文題目：“Hybrid liposomes inhibit the growth of Cholangiocarcinoma by induction of cell cycle arrest in $G_1$ phase”
著者：Tomomi Towata, Yuji Komizu, Ryusho Kariya, Shinya Suzu, Yoko Matsumoto, Naoya Kobayashi, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham, Ryuichi Ueoka*, and Seiji Okada*
雑誌巻号：*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 3680–3682 (2010)

胆管がん (Cholangiocarcinoma ; CCA) は、治療が困難ながんの一つである。CCA の治療は、外科手術が中心に行われる。治癒切除がなされた場合の 5 年生存率は 30～50%程度である。一方、切除不能な進行胆管がんにおいては 5 年生存はほぼ皆無である。CCA の化学療法は、切除不能な進行胆管がんに対し行われる。しかし、現時点で確立された標準治療法は存在しない。

特に、タイ国東北部の Khon Kaen 地方では、タイ肝吸虫 (*Opisthorchis Viverrini*) の感染が原因とされる CCA が死因の上位を占めており、現地では、CCA に対する新たな診断マーカーや治療薬の開発が急務となっている。

これまでの研究により、ハイブリッドリポソーム (HL) は、種々の培養がん細胞に対して、細胞レベルおよび動物レベルでがん細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した。患者様へのインフォームド・コンセントを経て、生命倫理委員会承認後の臨床応用では、副作用が無く、リンパ腫の縮小効果を得ている。

本研究では、リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 $C_{12}(EO)_n$ からなるハイブリッドリポソーム (HL-n; n = 21, 23, 25) を用い、HL-n の CCA に対する *in vitro* および *in vivo* での増殖抑制について検討した。

HL-n の増殖抑制に関し、HL-n は、CCA 細胞株 (M213, M214, M055, M139, KKU100) に対して、細胞増殖を抑制することを *in vitro* で明らかにした。特に、HL-21 は最も効果的に CCA 細胞の増殖を抑制した。一方、HL-21 は、正常胆管細胞を不死化した MMNK-1 細胞 (不死化胆管細胞) に対して、細胞増殖にほとんど影響及ぼさなかった。すなわち、HL-21 の CCA 特異的な増殖抑制効果を明らかにした。

細胞周期の解析から、HL-21 は、CCA 細胞に対して、細胞周期の $G_0/G_1$ 期の停止を誘導した（図 1）。しかしながら、顕著なアポトーシス誘導は認められなかった。このことから、CCA 細胞にはアポトーシス耐性機構が存在すると考えられる。

CCA 細胞に対する HL の融合蓄積を検討するため、蛍光脂質含有 HL-21 を調製し、CCA 細胞に加え、FACS により細胞あたりの蛍光強度を検出した。その結果、HL-21 処理した CCA 細胞のみに蛍光蓄積量の増大が観測され、不死化胆管細胞 (MMNK-1) にはほとんど蓄積しなかった(図 2)。これらの結果より、HL-21 は、CCA 細胞に対して、特異的に融合蓄積することを明らかにした。

さらに、CCA 細胞の移植モデルマウスにおいて、HL-21 処理は、未処理のマウスと比べ、CCA 細胞の増殖を抑制することが分かった。

今後、HL を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) の応用や他の薬剤との併用により、CCA に対する新たな治療戦略が提供できると考える。

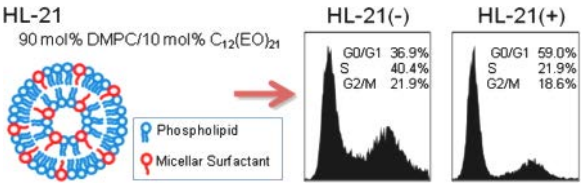



図1 HL-21は胆管がん細胞に対して、細胞周期のG0/G1期停止を誘導する。未処理（HL-21(-)）、処理（HL-21(+)）

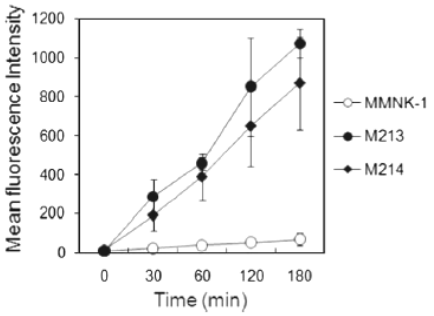



図2 蛍光脂質含有HL-21は、胆管がん細胞に対して、特異的に融合蓄積する。不死化胆管細胞（MMKN-1）、胆管がん細胞（M213, M214）

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：DNA B-Z 転移に対する塩効果:3D-RISM による解析

丸山豊（分子研・博士研究員）
吉田紀生（分子研・A03 公募研究代表者）
平田文男（分子研・A03 計画研究代表者）

論文題目："Revisiting the Salt-Induced Conformational Change of DNA with 3D-RISM Theory"
著者：Yutaka Maruyama, Norio Yoshida, and Fumio Hirata
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **114**, 6464-6471 (2010)

DNAは通常生体内で右巻き二重螺旋のB構造を取るが、 癌細胞中などでは左巻きのZ構造を取ることが知られている。また、溶媒の塩濃度が高くなるとBからZ構造に転移することが実験的に確認されている。

このDNAの構造相転移について2つのモデルが提唱されている。一つはSaengerらの"経済的な水和"モデルである。このモデルは二重螺旋構造安定化の主要因を水和とみなす。塩濃度が上がるにつれて、水和に寄与する水分子の実効的な濃度が減少するため、リン酸基間の架橋によって水分子を効率的に利用することができるZ構造の方が有利になるという説である。もう一つはリン酸同士のクーロン反発がイオン水溶液によって遮蔽されるというモデルである。[1]　この2つのモデルのどちらが正しいかを調べるためには水分子とイオンを正しく取り扱う必要がある。

我々は分子性液体を取り扱うことのできる3D-RISM理論と構造最適化プログラムと組み合わせてDNAのB-Z転移のメカニズムを調べた。

図1はNaCl2M水溶液中でのB-及びZ-DNAの最安定構造と周りの溶媒和構造を示す。B-DNAではNaイオン（黄）はリン酸基の周りに局在化している。Z-DNAではNaイオンの分布リン酸と塩基対を含む広い領域に非局在化している。リン酸基周りの動径分布関数で確認するとZ-DNAの方がNaイオンをより強く結合している事がわかった。また2M NaCl水溶液中の水の分布は0M時よりも減少していて、リン酸基間に架橋が見られず、Saengerらのモデルと一致しなかった。

図2に全自由エネルギーの差 $\Delta F=F_{Z\text{-}DNA}-F_{B\text{-}DNA}$ をNaCl濃度に対してプロットしてある。NaClの濃度が高くなるとB構造よりもZ構造が安定になり実験結果と定性的に一致している。純水中ではZ構造はB構造に比べて構造エネルギー（リン酸基間のクーロン反撥）が高く不安定であるが、NaClの濃度が高くなると溶媒和自由エネルギーおけるイオンの寄与が大きくなり安定化する。これはイオンによる遮蔽効果がZ-DNAの方が大きいことを意味する。この遮蔽効果には、エネルギー的効果とエントロピー的効果が考えられるが、そのいずれが支配的であるかを明らかにするため、現在、解析を進めている。

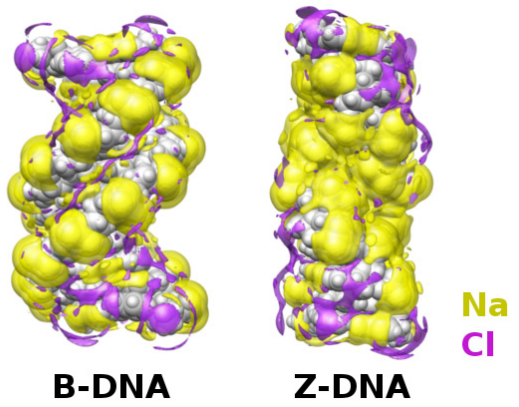



図 1：NaCl2M 水溶液中での B-及び Z-DNA の周りの Na（黄）及び Cl（紫）の分布（g(r)>3）

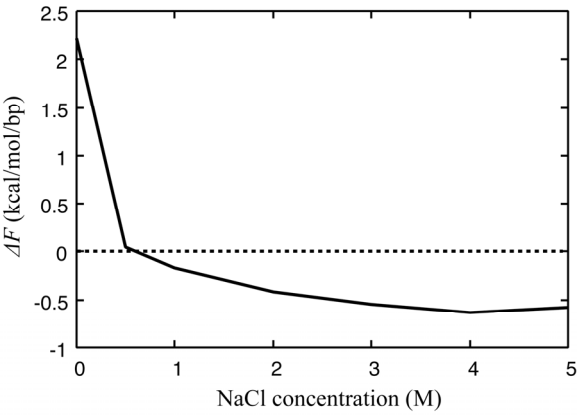



図 2：全自由エネルギー差の NaCl 濃度依存性

参考文献

[1] F. Hirata, and R. M. Levy. *J. Phys. Chem.* **93**, 479 (1989).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：3D-RISM 理論によるアクアポリンの分子選択性に関する研究

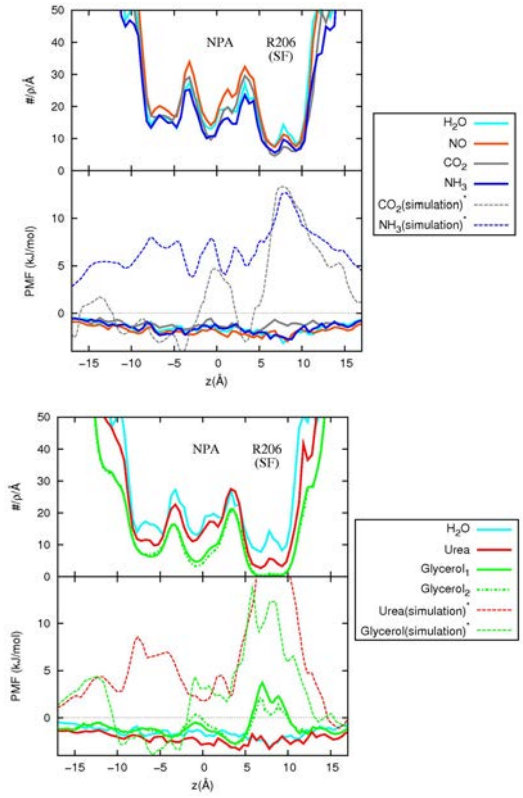
Saree Phongphanphanee
（自然科学研究機構）
吉田紀生
（自然科学研究機構・A03 公募研究代表者）
平田文男
（自然科学研究機構・A03 計画研究代表者）

論文題目："Molecular Selectivity in Aquaporin Channels Studied by the 3D-RISM Theory"
著者：Saree Phongphanphanee, Norio Yoshida, and Fumio Hirata
雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B.* **114**, 7967-7973 (2010)

酵素反応やイオンチャネルなどの蛋白質の機能はリガンド（基質）の認識と深く関わっており、また、蛋白質によるリガンドの認識（錯体形成）は錯体形成前後の自由エネルギー差によって決定される。さらに、この錯体形成前後の自由エネルギー差には水和（あるいは脱水和）自由エネルギーが大きく寄与している。それ故、生体分子の機能を理解する上でも、また、それを制御する（薬剤設計など）上でも、水和構造と水和自由エネルギーに関する理解は本質的意義をもつ。

この水和自由エネルギーを評価する上で、従来、分子シミュレーションをベースにした様々な手法（アンブレラサンプリング、熱力学摂動法など）が用いられ、それなりに「実験と良く一致する」結果を出してきた。しかし、それらの対象の多くは比較的単純な系であり、しかも、自由エネルギーに関する実験結果がすでに知られているものであった。ところが、最近、リアルな蛋白質に対する分子認識のような複雑な現象を予測する目的で分子シミュレーションが適用され始めている。そのような例のひとつがグリセリンを透過するアクアポリン（GlpF）である。GlpF チャネル内部のグリセリンの平均力ポテンシャル（PMF）を計算した論文が、最近、PNAS に発表された[1]。しかしながら、その結果は実験（経験）とは逆に、GlpF がグリセリンを全く透過しないことを予測している。(図) 我々は 3D-RISM 理論により、GlpF チャネル内部のグリセリンの平均力ポテンシャルを評価した。3D-RISM 理論はこれまでに生体分子の分子認識の問題に応用され、多くの成功を収めている理論である。[2] 3D-RISM 理論の結果ではシミュレーションの結果とは対照的に GlpF チャネル内におけるグリセリンの PMF には小さなバリアしか存在しないことがわかった。(図)これは GlpF が実際にグリセリンを透過することを示している。そこで、本研究では分子シミュレーションが、何故、このような複雑な系に関する自由エネルギーを正しく評価できないかについての考察も行ない、不十分なサンプリングが高い PMF の原因ではないかと考察した。一方で、3D-RISM 理論の結果はリガンド分子の配向も含む全配置空間をサンプルしたものに相当するため、適切な PMF を算出できたと考えられる。

今回の結果は、今後、分子シミュレーションが実験結果の「解釈」ではなく、「予測」を行なう上で、何が必要かを端的に示唆するものである。




参考文献

[1] J.S. Hub and de B. L. Groot, *PNAS*, **105**, 1198 (2008)
[2] N. Yoshida, T. Imai, S. Phongphanphanee, A. Kovalenko, F. Hirata., *J. Phys. Chem. B* **113**, 873-886 (2009).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：シンプルな光学系の超高速顕微鏡を開発

飯野亮太
（阪大産研・A03 公募研究代表者）

論文題目："Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution"
著者：Hiroshi Ueno, So Nishikawa, Ryota Iino, Kazuhito V. Tabata, Shouichi Sakakihara, Toshio Yanagida, Hiroyuki Noji
雑誌巻号：*Biophysical Journal,* **98**, 2014-2023 (2010)

蛍光色素やナノ・マイクロメートルサイズの微粒子を光学的プローブとして用いる１分子計測の技術が近年著しく進歩しており、生体分子のダイナミクスの高時間・高空間分解能での計測に適用されている。特に、ミオシンやキネシン等のリニアモータータンパク質、$F_1$-ATPase（$F_1$）や細菌鞭毛モーター等の回転モータータンパク質の化学ー力学共役機構の研究にこの技術は必須となっている。 しかしながら、ナノメーターレベルの精度を保ちつつ高い時間分解能（マイクロ～ミリ秒）で計測を行うのはそれほど容易ではなく、複雑な光学系や計測システムが必要とされてきた。シンプルなシステムで高い時間・空間分解能を実現できれば様々な研究分野に応用が期待され非常に有用である。本研究では、１分子蛍光イメージングに用いられる対物型エバネッセント照明光学系をもとに新しいレーザー暗視野光学系を開発し、$F_1$ モーターの高時間・高空間分解能計測に適用した。

構築した計測システムの模式図を図１左に示す。光学系は、従来の全反射型蛍光顕微鏡（エバネッセント顕微鏡）に用いられるものとほぼ同じである。新システムでは、ダイクロイックミラーの代わりに中心部が光を透過するミラー（perforated mirror、PM）を配置しているだけである。試料を照明するレーザー光はミラーで反射され検出器（Hi-speed camera）には入らないが、試料由来の散乱光はミラーの中心部を通って検出器に投射され暗視野像が得られる。照明光を励起光としても利用すれば、暗視野像と蛍光像を同時に取得することも可能である。さらに通常の暗視野顕微鏡と異なりコンデンサーレンズを必要としないので試料上部にスペースを確保でき、マイクロマニピュレーターや細胞培養装置等との併用もできる。

直径 40 nm の金コロイドをプローブとした際の位置決定精度の時間分解能依存性を図１右に示す。時間分解能 9.1 μs（使用した検出器の限界値）で 1.5 nm 程度の位置決定精度が達成でき、従来の暗視野顕微鏡を用いた以前の報告例（320 μs で 5~6 nm の精度）を大幅に改善できた[1]。さらにこの計測システムを $F_1$ モーターの回転計測に適用した結果、回転中の $F_1$ の角速度は一定にならないことが分かった。このことから、$F_1$ のトルクには角度依存性があることが示唆された。

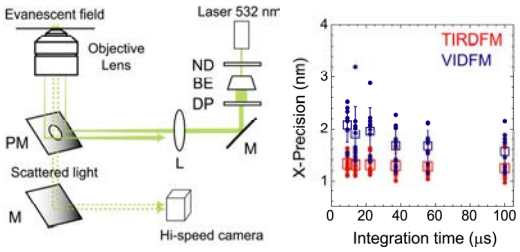



**図１.（左）計測システムの模式図。（右）位置決定精度の時間分解能依存性。赤が今回開発した計測システムの値。青は照明光を全反射させない場合の値。**

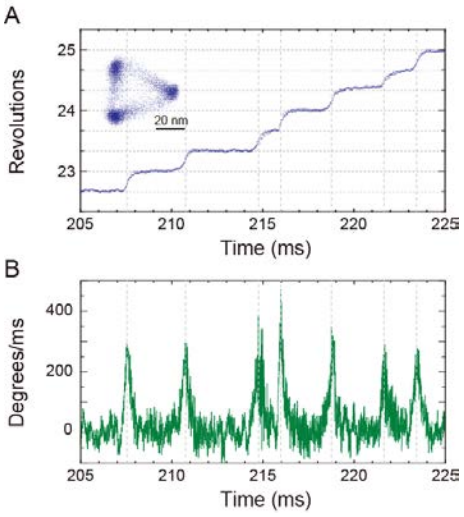



**図２. 時間分解能 9.1 μs での $F_1$ の回転計測。（A）時間−回転数のプロット。ATP 加水分解待ちの停止だけでなく、回転中の挙動が明確になった。（B）時間−角速度のプロット。回転中の角速度が一定でない。**

参考文献

[1] A.R. Dunn and J. A. Spudich. *Nat. Struct. Mol. Biol.***14**, 246-248 (2007).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 業績紹介：遺伝子送達能を有するポリアミン脂質–DNA 複合体の構造変化を原子間力顕微鏡で観測

出羽毅久
（名工大院未来材料・A03 公募研究代表者）

論文題目："Liposomal Polyamine–Dialkyl Phosphate Conjugates as Effective Gene Carriers: Chemical Structure, Morphology, and Gene Transfer Activity"
著者：Takehisa Dewa, Tomohiro Asai, Yuka Tsunoda, Kiyoshi Kato, Daisuke Baba, Misa Uchida, Ayumi Sumino, Kayoko Niwata, Takuya Umemoto, Kouji Iida, Naoto Oku, Mamoru Nango
雑誌巻号：*Bioconjugate Chem.* **21**, 844-852 (2010)

遺伝子導入や siRNA による遺伝子抑制作用は癌治療などに対して有効な治療手段として注目されている。合成化合物（多くはカチオン性物質）と核酸から形成されるナノ粒子は多数報告されている[1,2]。ナノ粒子は細胞取り込み後、様々なイオン種と遭遇し、さらに pH が変化する環境下に置かれる。その際、ナノ粒子がどのように構造変化し、核あるいは細胞質まで目的の核酸を効率よく送達できるかが問題解決の突破口になると考えられる。我々はこれまでに生体成分であるポリアミン（スペルミジン、スペルミン）とジアルキルリン酸エステル（脂質）を結合させた化合物の合成に成功し、遺伝子送達活性があることを示してきた[3]。本研究では、これらの化合物とプラスミド DNA との複合体(Lipoplex)の形態観察および酸性条件下（エンドソーム環境下）における Lipoplex の形態変化を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて観察し、機能（遺伝子送達）との相関についての知見を得た。

ポリアミン脂質/リン脂質/コレステロールから調製したリポソーム(cationic liposome)とプラスミド DNA との混合による形態変化を図 1 A-C に示す。プラスミド DNA（A）に対して少量混合すると、数珠状の集合物が形成された。過剰量のリポソームを添加することにより粒径 150-370 nm 粒子(Lipoplex)が得られ(C)、この粒子は層状構造を有し、高さ 4, 6, 10 nm のステップ構造が認められたことから、脂質二分子膜(4 nm)の層間に DNA（直径 2 nm）が挿入されたラメラ構造であることが示唆された(図 C 中,矢印部)。遺伝子送達能は(C)の構造を有する粒子が数珠状構造粒子(B)よりも約 10 倍高いことから、ラメラ構造が遺伝子送達能に関与していることが考えられる。この Lipoplex はエンドサイトーシスで細胞内取り込みがおこることから、エンドソーム（弱酸性）環境下での構造変化を調べたところ、ラメラ状の Lipoplex が崩壊し、脂質成分をともなった DNA の放出が観察された(D)。この挙動はラメラ構造を有する Lipoplex に特有の現象であった。これにより、エンドソームから DNA のリリースが可能になり、高い遺伝子送達能を示すと考えられる。

このような構造変化や遺伝子送達能はポリアミン部位の分子構造に敏感に影響することもわかった。今後、細胞内環境下における揺らぎをともなう Lipoplex の構造変化と機能（核酸送達能）との相関についてさらに検討を行う。

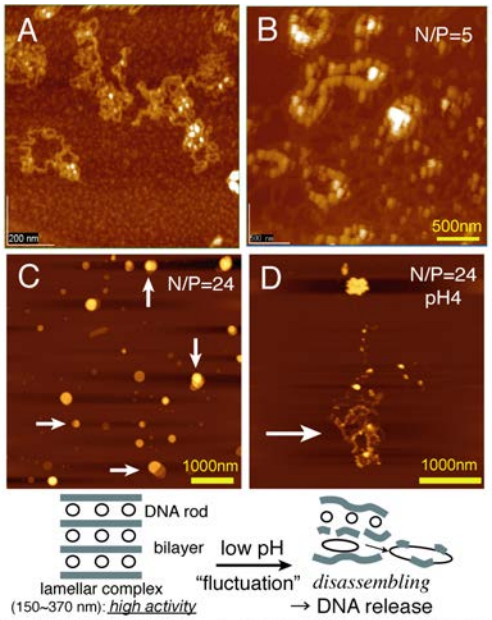


図1. ポリアミン脂質によるLipoplex形成と酸性条件下によるDNA放出のAFM観察像. A, プラスミドDNA; B, 凝集lipoplex (N/P=5); C, ラメラ状Lipoplex (N/P=24, 図中矢印); D, 酸性条件下(pH4)でのLipoplexからのDNAの放出(図中矢印部).

参考文献

[1] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, *Chem. Rev.* **109**, 259 (2009).
[2] J. O. Rädler, et al., *Science* **275**, 810 (1997).
[3] T. Dewa, et al., *Bioconjugate Chem.* **15**, 824 (2004).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# シンポジウム報告　Leopoldina Symposium on “The complexity connecting biomolecular structure and solvation dynamics”

片岡幹雄
（奈良先端大・A02 計画研究代表者）

5 月 25 日から 27 日まで、ドイツ・ルール地方のボーフムの Ruhr-Universität Bochum で開催された Leopoldina Symposium に招かれていた。Leopoldina というのは、1655 年に設立された医学と自然科学の世界最古の組織の一つで、2008 年から、Germany's National Academy of Sciences となっている。Leopoldina Symposium は、このドイツアカデミーが支援するシンポジウムで、毎月のように様々な分野のシンポジウムが開かれているようである。ある参加者が、ドイツ人にとっては、このシンポジウムに招かれることは名誉なのだと話してくれた。本シンポジウムのオーガナイザーは、Martina Havenith と 11 月の公開シンポジウムに招待予定の Martin Gruebele であり、同じく招待予定の Irit Sagi、過去に招待した Susan Marqusee 他、Peter Wolynes や Zaida Luthey-Schulten 等そうそうたるメンバーが招待講演者として名を連ねていた。日本からは、関西医大の木原裕教授と私が招待されていた。

会議の開かれた Bochum は、炭鉱で栄えた町であり、ルール工業地帯の生産を支えていたが、閉山してからは Ruhr-Universität Bochum を中心とした学術の町として進もうとしている。日本ではサッカーの小野伸二選手が所属していたことで知られているであろう。ケルンから急行列車で 1 時間ほどの小さな町である。

会議は、水の物理化学の研究者、タンパク質折り畳みやダイナミクスの研究者が集まり、濃密で興味深いものであった。プログラムを以下に示す。

**Tuesday: 25.05.2010**

**Dominik Marx:** THz spectroscopy of water and aqueous solutions from first principles

**Helmut Grubmueller:** Molecular polarizability and THz spectra

**Torsten Fiebig:** Ultrafast structural dynamics in biomolecules. From basic research to advanced medical applications

**Zaida Luthey-Schulten:** Role of solvation on tRNA dynamics and migration in translation

**Peter Wolynes:** Water mediated Interactions in Protein Folding & Structure Prediction

**Hiroshi Kihara:** Alpha-helix-rich intermediate on the protein folding pathway studied by cryo-stopped-flow method

**Susan Marqusee:** Pulling Along a Protein's Energy Landscape

**Andrea Markelz:** Size dependence of water-polypeptide interactions: The peptide dynamical transition

**Wednesday: 26.05.2010**

**Martina Havenith:** The THz dance of the water with the protein

**Irit Sagi:** Protein conformational transitions and solvation dynamics are synchronized during enzyme turnover

**Mikio Kataoka:** Effect of hydration on protein dynamics

**Martin Gruebele:** Protein folding in vivo: the living solvation environment

**Claus Seidel:** Biomolecular structure and dynamics studied by multiparameter fluorescence spectroscopy

**Thursday: 27.05.2010**

**David Leitner:** Water-mediated structure and energy transport across a protein-protein interface

**Thomas Kiefhaber:** Protein dynamics on the picoseconds to microsconds time scale measured by fast triplet transfer

Susan とは、昨年 3 月の公開シンポジウムに招待して以来、この 1 年半で 3 回目の同席であり、お互いによく会うねと笑いあった。彼女の話の骨子は、昨年のシンポジウムの時と変わりはないのだが、少しずつ進歩がある。Gruebele は、温度ジャンプによる細胞中で

の PGK の折り畳み反応の話をした。in vitro とは、異なっているとのことで、非常に興味深かった。11 月に再会するのが楽しみである。Wolynes は、折り畳みと分子認識の相同性を minimal frustration の立場から話したが迫力があった。Luthey-Shulten は、これまでよく聞いていた折り畳みの話とはまったく異なる翻訳機構の理論的解析の話をした。個人的に一番興味を持ったのは、Kiefhaber の三重項－三重項相互作用によるダイナミクス測定の話で、この方法は FRET よりもはるかに部位特異性に優れていると感じた。

この他、初日に 2 名、2 日目に 5 名、3 日目に 3 名の short talk、夜にはポスターセッションがあり、2 日目の夕刻には、世界遺産に登録されている Bochum の隣町 Essen の炭鉱、選鉱所跡の Zeche Zollverein への excursion と同所でのバンケットがあった。この会議の面白い点は、招待講演者はアブストラクトの提出がなく、short talk およびポスターにはアブストラクトが義務付けられていることであった。アブストラクトを書かなくてよいというのは、非常に気が楽である。さらに、講演をしっかり聞くというメリットもある。帰国前日、フランクフルト空港の近くのホテルで、この時期のみ食べられるというホワイトアスパラガスを賞味したが、とてもおいしかった。

参加者の集合写真。下段、左から二人目が M. Gruebele、一人おいて Irit Sagi、Martina Havenith、下から 2 段目中央、Susan Marqusee、Zaida Luthey-Shulten、Susan の左上が筆者。

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 小川拓也氏が 5th International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry において Chem Soc Rev Poster Prize を受賞

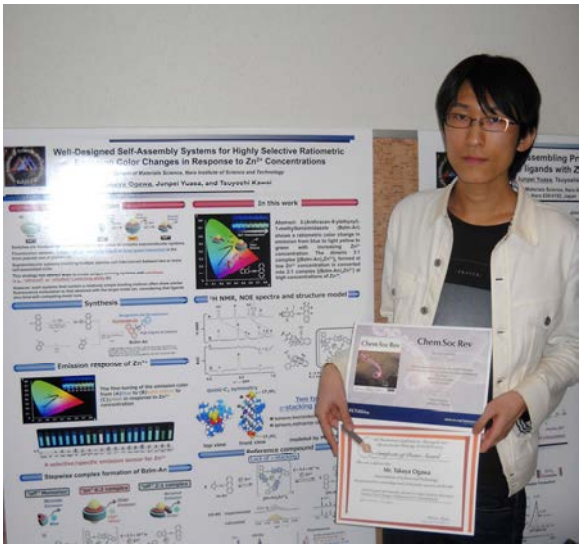
湯浅順平
（奈良先端大物質創成・A02 公募研究代表者）

2010 年 6 月 6 日から 10 日にかけて 5 日間, 奈良県新公会堂で開催された 5th International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry において，当研究室の小川拓哉君（博士後期課程 1 年）が Chem Soc Rev Poster Prize を受賞しました。5th International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry は超分子化学分野の一流研究者が集まる国際学会であり、小川君が受賞した Chem Soc Rev Poster Prize は、その中で発表されたポスター講演 328 件の中から 1 件が選考されました。同賞は英国王立化学会(RSC)が刊行する世界的なレビュー誌の一つ *Chemical Society Reviews* 誌から授与され、受賞時の写真は *Chemical Society Reviews* のウェブ上で公開されています。

小川君は「Well-Designed Self-Assembly Systems for Highly Selective Ratiometric Emission Color Changes in Response to $Zn^{2+}$ Concentrations」というタイトルで発表を行いました。詳しい研究内容は前記のニュースレターで紹介していますが、本発表では，超分子の段階的な構造形成を利用した金属イオンセンサーについて、その成果を報告しました。金属イオンセンサーの多くは、1:1 のホスト-ゲスト相互作用を基にしたシンプルな発光の “off/on” の切り替えによって目的物をセンシングすることが一般的です。[1-2] 本研究では，亜鉛イオン濃度に応答して、段階的にプローブ分子と金属イオンとが超分子形成することによって、“off/on/off” スイッチングを基盤とする新しい色調変調型センシングシステムを開発しました。[3]

小川君が開発した蛍光プローブ、BzIm-An は計 6 分子のリガンドで 2 個の $Zn^{2+}$イオンを認識するユニークなセンシングシステムであり、この超分子形成反応によって長波長領域にアントラセンダイマーに由来した特徴的な発光を与えます。この超分子錯体はミリモーラーレベルの $Zn^{2+}$イオン存在下では、構造内にアントラセンのダイマーユニットを含まない単純な錯体へと構造変化を起こします。この $Zn^{2+}$錯体及び $Zn^{2+}$イオンと相互作用していない BzIm-An は長波長領域には発光を示さず、アントラセンモノマーに由来する青色発光または緑色発光を示します。そのためこのプローブ分子は $Zn^{2+}$イオンとの段階的な錯形成をすることで $Zn^{2+}$イオンの濃度変化をプローブの発光の色調変化として情報化することができます。

現在、小川君は新しいプローブ分子の開発を行っており、超分子形成を利用してさらにユニークなセンシングシステムの開発に取り組んでいます。今後このような超分子形成を巧みに利用することで、ターゲット物質の濃度や、構造情報を抽出することのできるような新しい蛍光プローブの開発を行って行きたいと考えております。本領域の皆様のご助言をいただければ幸いです。




参考文献

[1] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **97**, 1515 (1997).

[2] R. Y. Tsien in *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition* (Ed.: A. W. Czarnik), ACS Symposium Series 538, American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.

[3] *Angew. Chem., Int. Ed.* **49**, in press (2010).

「揺らぎと生体機能」ニュースレター
No. 19
25 June, 2010

# 岡村グループの吉井範行氏が 2010 年度日本膜学会膜学研究奨励賞を受賞

岡村恵美子
（姫路獨協大薬・A03 公募研究代表者）

岡村グループの吉井範行氏（姫路獨協大学・薬学部准教授）が、2010年度 日本膜学会膜学研究奨励賞を受賞しました。この賞は、膜学研究において卓抜した業績を挙げた40歳未満の若手研究者に贈呈されるものです。今回受賞対象となった吉井氏の研究は、「脂質膜やミセルへのモデル薬物のデリバリーに関するNMR解析とコンピュータシミュレーション」で、授賞式と受賞記念講演は、平成22年5月14日、東京・お台場の産総研臨海副都心センターで開催された日本膜学会第32年会の会期中に行われました。

吉井氏は、NMR実験とコンピュータシミュレーションを組み合わせて、脂質二分子膜やミセルへの薬物輸送を分子レベルで解析する新しい方法論を開発し、膜に対する薬物の結合量や結合の強さ、膜のなかの拡散運動や膜への結合・解離の速度論的解析に応用しました。

吉井氏は、まず、高分解能溶液NMRとパルス磁場勾配スピンエコー法(PFG法)を組み合わせて、薬物の結合量や運動状態をin situで定量する方法を確立しました。モデル薬物として5-フルオロウラシル(5FU)を、生体膜モデルとしてリン脂質ベシクルを用いて、ベシクルに対する5FUの結合量やベシクル中の拡散係数を決定しました。5FUの結合が熱揺らぎに支配され、温度上昇にともなう熱揺らぎの増幅によって影響を受ける様子を初めて明らかにしました。

次に、実測したNMRシグナルに対してベシクルに結合した状態と解離した状態の間の交換を考慮したBloch方程式の解を用いた解析を導入して、薬物の結合と解離に関する速度論的な解析を行いました。その結果、5FUはサブ秒から秒のオーダーで膜に結合し、膜からバルクへと解離していることを明らかにしました。さらに、膜への結合・解離には、膜のなかの拡散よりも高いエネルギーが必要であることを見出しました。

膜に対する薬物の結合強度を評価するためには、結合に伴う自由エネルギーの変化を算出する必要があります。そこで、吉井氏は、モデル薬物として水分子を用いて、水分子が膜モデルとしてのミセルへ移行する際の自由エネルギー変化を、分子動力学計算により求めました。

これらの方法は、生体膜の揺らぎが薬物輸送とどのように関わるかを解明する手段としても有効であると考えられます。現在、ペプチドや疎水性物質の膜輸送をin situで定量するために方法論を拡張しており、今後の展開が期待されます。

お台場を背景に半田哲郎・日本膜学会会長と吉井准教授