

業績紹介：クラウディング環境で反応はどのようにかわるのか

寺嶋正秀

(京都大大学院・A01 計画研究代表者)

論文題目：“Macromolecular Crowding Effects on Reactions of TePixD (TII0078)”

著者： T. Toyooka, K. Tanaka, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima

雑誌巻号： *Photochem. Photobiol.*, **87**, 584-589 (2011).

生体内での生体分子の反応を知るために、多くの物理化学的研究が行われているが、その基本的知識は多種の分子間の相互作用を除いて単純化された系 (*in vitro*, buffer 中)で行われることがほとんどである。こうした単純化された系で見られた反応が細胞中で実際に適用できるかどうかを知ることは、機能との関連を知るうえで重要である。細胞中と buffer 中での大きな違いは、細胞中では様々な高分子種が高濃度で混在していることであろう。このような混み合った環境を Crowding 環境と呼ぶ。Crowding 環境は様々な影響を分子に与えるが、最も重要なのは排除体積の効果であろう。今回、TePixD と呼ばれる青色光センサータンパク質の光反応が Crowding 条件下でどのような挙動を示すかを調べた。

試料には好熱性シアノバクテリア BP-1 由来の TePixD を用いた。TePixD は好熱性シアノバクテリアのもつ青色光センサータンパク質である。青色光の受容のために、発色団としてフラビンを結合する BLUF (sensors of Blue Light Using FAD) ドメインを持つ。TePixD は図 1 に示したような 10 量体構造が結晶中で得られており、溶液中でもその分子量は 10 量体を示すものであった。TePixD を青色光で励起した後に観測される TG 信号には、早い時間領域の熱拡散や、過渡吸収では検出されない 40 μ s の時定数をもつ体積膨張を表す信号、ミリ秒領域に光誘起の D 変化に起因する山型の信号が見られた。解析の結果、光反応スキームは図 2 のように決定されている。

図 3 は Ficoll 存在下での TePixD の TG 信号である。Ficoll の濃度が増加すると、TG 信号が遅い時間スケールにシフトしその信号強度が増加した。信号のシフトは Ficoll を入れたことにより粘度が増加したためと考えられ、強度増加は Crowding 環境で、反応する 10 量体の割合が増えたためであると結論付けられた。これは、高分子の存在による排除体積のためと合理的に説

明できる。すなわち、TePixD においては、バッファー中よりも細胞内でその機能が增大するであろうことがわかった。こうしたクラウディング環境で揺らぎがどうなっているかを調べることは、次の重要なステップとなるであろう。

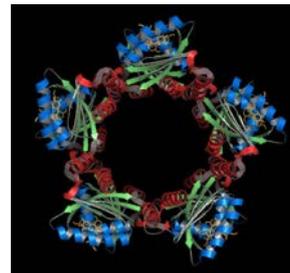


図 1 TePixD の結晶構造(10 量体)。ここに見えているのは 5 量体のリング構造であり、この下に同じ 5 量体リング構造が重なって 10 量体を形成している。

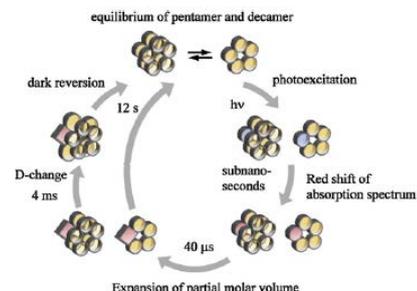


図 2 TG 法で明らかにされた TePixD の反応スキーム

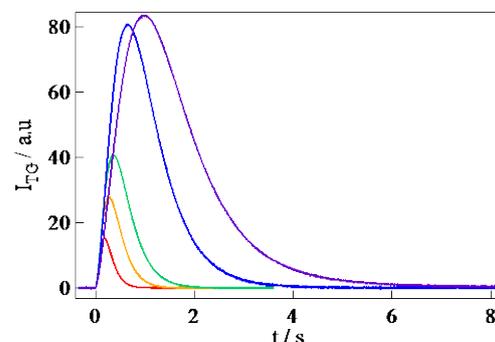


図 3 拡散係数変化を表す TG 信号への Crowding 効果。赤が buffer 中の信号で、Ficoll 濃度を増加(橙から紫へ)とともに強度が増える。

業績紹介：ガングリオシドクラスターを舞台とするアミロイドβの重合開始機構

加藤 晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Spectroscopic Characterization of Intermolecular Interaction of Amyloid β Promoted on GM1 Micelles"

著者：Maho Yagi-Utsumi, Koichi Matsuo, Katsuhiko Yanagisawa, Kunihiko Gekko, Koichi Kato

雑誌巻号：International Journal of Alzheimer's Disease, 2011, 925073 (2011)

神経細胞膜に豊富に存在する糖脂質である GM1 ガングリオシドは、アミロイドβペプチド(Aβ)の重合を促進する環境因子の1つとして注目されている。すなわち、Aβと GM1 の複合体が核となって Aβ の凝集が促進され、アルツハイマー病発症に関与している可能性が報告されている。したがって、Aβの重合開始を担う GM1-Aβ複合体の高次構造を解明することは、アルツハイマー病をターゲットとする創薬研究の基礎を築くとともに、Aβと GM1 との複合体形成を契機とする重合機構に関する分子科学的な理解を促すことが期待される。これまでに私たちは、NMR 解析を通じて、GM1 と共通の糖鎖構造を有するセラミド部分のアシル鎖を欠いた lyso-GM1 ミセルにも Aβ は結合し、GM1 ミセルに結合した際と同様のコンフォメーション (αヘリックス構造) およびトポロジーを形成することを明らかとしている[1]。また、Aβとの結合相互作用には、ガングリオシドクラスターの内部に位置する還元末端の糖残基およびセラミドの頭部部分に関与していることも明らかとしてきた[2]。本研究では、NMR 法を含む分光学的手法を用いて、Aβ分子がαヘリックス構造からβシート構造へと構造転移する過程に関する構造的知見を得るため、GM1 クラスター上における Aβ同士の分子間相互作用に着目した解析を行った。

Aβと GM1 ミセルの量比を系統的に変化させて NMR 計測および真空紫外 CD 計測を行った結果、両者の量比に依存したスペクトルの変化がみとめられた。興味深いことに、Aβが GM1 ミセル上に密に存在する条件下においては、C 末端領域の Val³⁹および Val⁴⁰に由来する NMR ピークが複数観測され、それらはアミ

ロイド線維などのβシート構造に特異的に結合して発色するチオフラビン T (ThT) との結合性を示した (図1)。このことから、Aβの C 末端が GM1 クラスター上における Aβ分子間の相互作用に寄与していることが示唆された。

以上の結果より、ガングリオシドクラスターはその親水性/疎水性境界面において、本来特定の二次構造を持たない Aβ分子のαヘリックス構造への構造転移を誘起するとともに、その空間配置を規定していることが明らかとなった。Aβが高密度に存在する条件下では Aβの C 末端領域における特異的な分子間相互作用が促され、重合体形成に至るものと考察される。すなわち、ガングリオシドクラスターという限定された空間が Aβの分子内相互作用 (αヘリックス形成) から分子間相互作用 (βシート形成) への変換を促進する触媒的環境を提供している可能性がある。したがって、ガングリオシドクラスター上に形成されるαヘリックスを安定化することができれば、Aβの重合を開始段階で止めることが可能であるものと期待される。

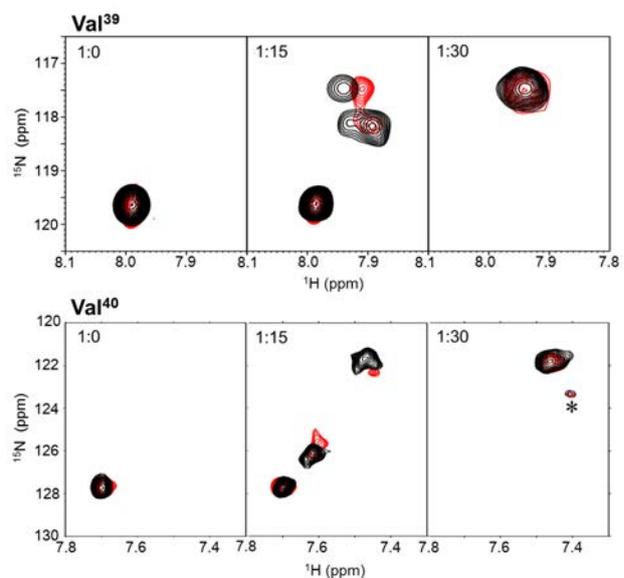


図1 GM1 添加に伴う Aβの Val³⁹および Val⁴⁰の NMR スペクトルの変化。赤色は ThT 添加後のスペクトル。

参考文献

- [1] M. Utsumi et al., *Glycoconj. J.*, **26**, 999-1006 (2009)
- [2] M. Yagi-Utsumi et al., *FEBS Lett.*, **584**, 831-836 (2010)

業績紹介：ハイブリッドリポソームの急性リンパ性白血病に対する治療効果

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

松本陽子

(崇城大応用生命科学・A03 公募研究代表者)

論文題目: "Chemotherapy with hybrid liposomes for acute lymphatic leukemia leading to apoptosis *in vivo*"

著者: Hideaki Ichihara, Junichi Ueno, Masayo Umebayashi, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *Int. J. Pharm.*, **406**, 173-178 (2011)

筆者らが創製したハイブリッドリポソーム(HL)は[1]、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]。

急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia : ALL)は、再発率が高く、5年生存率は低い。特に、成人 ALL は、再発しやすく、完全寛解率が 80%にもかかわらず、長期生存率は 30-50%程度と極めて低い。そこで、安全性の高い化学療法が望まれている。

本研究では、ヒト ALL (MOLT-4) 細胞を移植したヒト ALL モデルマウスに対する 95mol%DMPC/ 5mol% C₁₂(EO)₂₅HL (HL-25) の治療効果を検討した。以下に得られた興味深い知見を示す。

① HL-25 は、直径約 50nm の均一なベシクルであり、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、室温保存が容易なため、臨床応用に有用であることが明確となった。

② MOLT-4 細胞を皮下移植した ALL モデルマウスに対する HL-25 の治療効果を検討したところ、未治療のコントロールに比べて縮小率が 40% ($p < 0.01$)であり、著しく腫瘍が縮小した。一方、DMPC リポソームでは縮小率は、25% ($p < 0.05$)であった。HL-25 と DMPC リポソーム間の効果には、統計的有意差($p < 0.05$)が確認され、HL-25 の高い治療効果が明らかになった。

③ 縮小した皮下腫瘍切片を免疫染色し、アポトー

シス誘導メカニズムを検討した。HL-25 は、カスパーゼを活性化せずに、ミトコンドリアを経由して apoptosis inducing factor (AIF)を放出し、最終的にアポトーシスを誘導することが組織切片の免疫染色法により確認された。一方、DMPC 単一成分リポソームではアポトーシスは確認されなかった。

④ MOLT-4 細胞を腹腔内移植したヒト ALL モデルマウスに対する HL-25 の治療効果を検討した。HL-25 で治療したマウスの腹水は、未治療のコントロールに比べて著しく減少した(図 1A)。さらに、一般的な抗がん剤スクリーニングにおいて、統計的に延命率 120%以上が、治療効果の目安である。HL-25 治療群は、延命率 400%以上($p < 0.01$)であり、他に類を見ない顕著な延命効果が確認され、完全寛解の可能性が高い(図 1B)。

以上のように、ALL に関して、HL-25 による顕著な治療効果が動物レベルで確認されたことから、ALL に対する新しい化学療法として、臨床応用が期待できる。

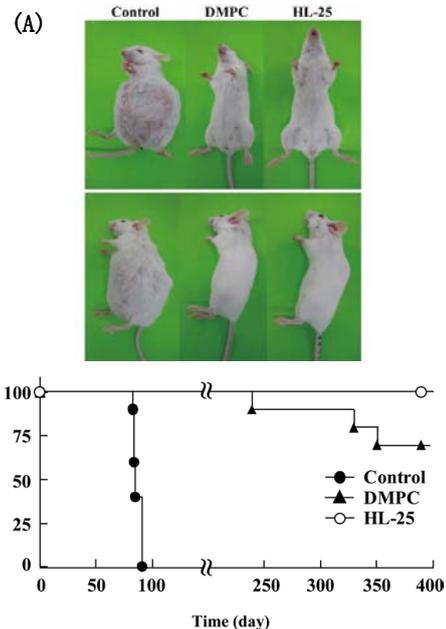


図 1 HL-25 の ALL モデルマウスに対する治療効果
A: マウス写真、B: 生存曲線

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] H. Ichihara et al., *Int. J. Pharm.*, **394**, 174-178 (2010). [4] H. Nagami et al., *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28**, 1187-1196 (2008).

業績紹介：カルシウムイオン (Ca^{2+}) とがん細胞膜表面のアニオン性脂質との特異的相互作用によるアポトーシス誘導メカニズム

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Specific interaction between Ca^{2+} and anionic lipids in cancer cells along with apoptosis"

著者: Koichi Goto, Kazuki Tatsumi, Toshihiro Nagata, Yuji Komizu, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 439-442 (2011).

カルシウム(Ca^{2+})は、二価の金属カチオンであり、さまざまな生体機能にとって必要不可欠である。一方、カルシウムを多く含む食品・飲料の日常的な摂取は、大腸がん発症のリスクを低下させることが疫学調査により報告されており、制がん機構に注目が集まっている。

まず、2つの興味深い知見について述べる。①がん細胞膜は、正常細胞膜と比べ、細胞膜上のアニオン性脂質(ホスファチジルセリン:PS)が、より多く露出していることが知られる。また、②人工膜リポソームを用いた研究において、 Ca^{2+} は、PS-ホスファチジルコリン(PC)リポソームに対し、相分離(脂質ドメイン)を誘導するが、 Mg^{2+} では誘導しないことは、周知の通りである。

本研究では、 Ca^{2+} の種々のヒトがん細胞に対する、がん増殖抑制および制がん機構について、*in vitro* で検討した。制がん効果に関し、 Ca^{2+} は、種々のヒトがん細胞に対し、濃度依存的に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。一方、 Mg^{2+} は、種々のがん細胞の増殖をほとんど抑制しなかった。そこで、がん細胞膜表面のPS量と Ca^{2+} のがん抑制効果との相関性について検討した。その結果、PS量とがん抑制効果との間に良好な相関性を示し($p < 0.05$)、PS量の多いがん細胞ほど、顕著ながん抑制効果を示すことが明らかになった。脂質ドメイン形成能について、 Ca^{2+} 処理した胃がん(MKN-45)細胞は、細胞膜上での脂質ドメインのクラスターを誘導した(図1A, B)。一方、 Mg^{2+} 処理した細胞では脂質ドメインのクラスター形成は認められなかった(図1A, B)。さらに、膜の揺らぎ(膜流動性)に関して、 Ca^{2+} 処理した胃がん(MKN-45)細胞は、膜流動性の低下を示した。一方、 Mg^{2+} 処理した

細胞では膜流動性の変化は認められなかった。

以上の結果から、 Ca^{2+} のがん抑制に関し、「 Ca^{2+} とがん細胞膜上のアニオン性PSとの静電的な相互作用により、脂質ドメインのクラスターが形成し、脂質の揺らぎ(流動性)が低下するため、アポトーシスシグナルが伝達される」新しいメカニズムが考えられる(図1C)。

Ca^{2+} が、がんの予防だけでなく治療に応用できる可能性を、細胞レベルで初めて明らかにした。今後は、動物レベルでのがん抑制について検討する予定である。

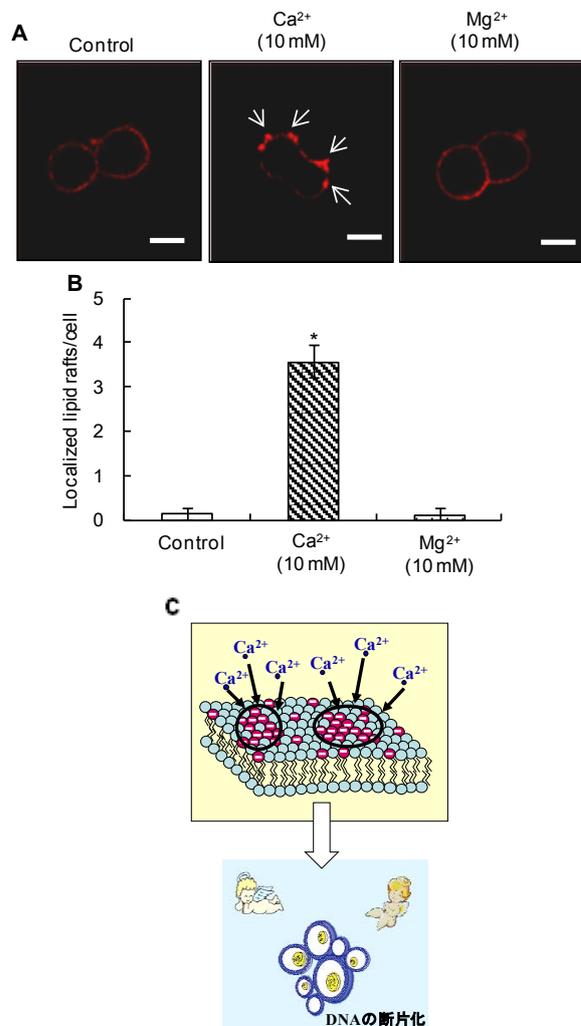


図1 Ca^{2+} のがん抑制メカニズム

A) Ca^{2+} のヒト胃がん細胞に対するドメイン形成の蛍光顕微鏡観察、B) ドメイン形成の定量化、C) Ca^{2+} の新しいがん抑制メカニズムの概念図

業績紹介：ハイブリッドリポソームを用いた筋ジストロフィー治療のDDS 研究

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Effective drug delivery system for Duchenne muscular dystrophy using hybrid liposomes including gentamicin along with reduced toxicity"

著者: Mamiko Yukihara, Kaori Ito, Osamu Tanoue, Koichi Goto, Taku Matsushita, Yoko Matsumoto, Masako Masuda, Shigemi Kimura, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 712-716 (2011)

筋ジストロフィーは、筋線維の変性・壊死を主病変とする遺伝性疾患群であり、臨床的には「進行性の筋力低下をみる遺伝性の疾患」と定義される。進行性筋ジストロフィーで最も多いDuchenne型筋ジストロフィーでは、遺伝子の変異・欠損によりジストロフィンタンパクが合成されず、呼吸不全や心不全により死に至る難治性疾患である。筋ジストロフィーの治療には、抗生物質のゲンタマイシン (GM) が有効であるが、高濃度の投与が必要であり、腎毒性や聴覚障害などの副作用が問題となっている。

著者らが開発したハイブリッドリポソーム (HL) [1] は、リン脂質とミセル系界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波処理することにより調製でき、HL自身がアポトーシス誘導型の制がん効果を示すこと、その制がんメカニズムにHLとがん細胞の膜の“揺らぎ (流動性)” が重要であることを報告している[2,3]。一方、薬物キャリアーとしても有用であり、抗がん剤等をHLに含有させることにより、薬理効果の向上が明らかになっている[4]。そこで、本研究では、GMを含有させたHL (GM-HL) を用いる筋ジストロフィー治療のDDS (Drug Delivery System) について検討した。

筋ジストロフィーモデルマウス (mdxマウス) にGM-HLを投与した*in vivo*実験の結果、(1) GMのみの投与と比べ、約2倍のジストロフィンの発現が観測された (図1)。(2) 腎毒性マーカー (血中クレアチニン量) や聴毒性試験 (聴性脳幹反応) の測定値は正常値に近く、GMの副作用を大きく低減した。さらに、(3) キャリアーに用いたHLは、壊死した筋細胞に集積することが明らかとなった。病変した細胞とHLの膜の“揺

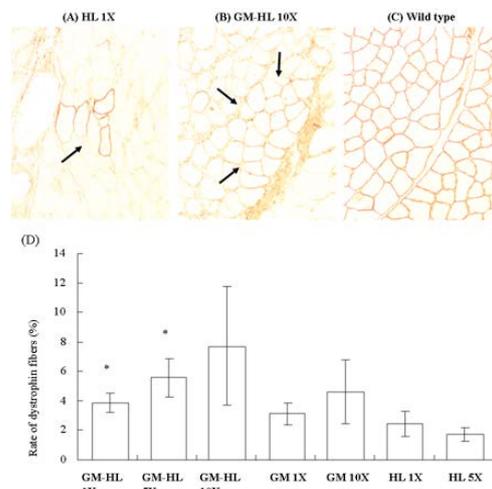


図1. GM-HL投与mdxマウスの筋組織におけるジストロフィンの免疫染色写真 (A~C) と陽性繊維率 (D)。「揺らぎ」が関連し、患部にGMを効率的に送達した可能性が考えられる。

なお、本研究の成果は、日本薬学会の雑誌編集委員会に高く評価され、*Biological & Pharmaceutical Bulletin* の5月号の表紙カバー論文に選定されました (図2)。



図2. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* の5月号表紙。

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Komizu et al., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2**, 275-279 (2011). [3] Y. Komizu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131-6134 (2006). [4] I. Kitamura et al., *Cancer Res.*, **56**, 3986-3992 (1996).

業績紹介：がん細胞の薬剤耐性現象を三次元培養によって生体外で再現

松下 琢

(崇城大応用生命科学・班友)

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Enhancement of drug efflux activity via MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells"

著者: Ayumi Oshikata, Taku Matsushita, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 590-593 (2011)

がんには、制がん剤を使って治療を続けるうちに、細胞の薬物排出活性の亢進による薬剤耐性を獲得し、薬が効きづらくなって再発するケースがあり、この薬剤耐性の克服は、がん治療の大きな課題となっている。しかし、この薬剤耐性を生体外で再現できる細胞培養系がないために、その薬剤耐性克服薬の開発が遅れているのが現状である。そこで、本研究では、三次元 (spheroid) 培養法[1]を、肝がん細胞に適応し、薬剤耐性などのがん細胞の諸性質を生体外で発現させることを検討した。はじめに、肝がん細胞 (HepG2) の spheroid 培養を試み、その最適な spheroid 形成条件を明らかにした(図 A)。次に、がん細胞の薬物排出活性について、この spheroid 培養を用いて検討を行った。肝がん細胞が有する薬物排出タンパク質 MDR1 によって排出されることが知られ、制がん剤として利用されているドキソルビシン (DOX) を用いた排出活性測定実験の結果、従来の monolayer 培養に比べ、spheroid 培養では、MDR1 タンパク質の発現が亢進し、高い薬物排出活性が示された。また、この spheroid 培養の MDR1 タンパク質の発現量は、肝がん組織の発現量と同等であることが、ウェスタンブロッティング分析で示された(図 B)。これらのことから、がん細胞の spheroid 培養によって、生体内のがん細胞の高い薬物排出活性が、生体外で発現できる可能性が示された。また、DOX の細胞増殖抑制試験 (IC₅₀) においても、monolayer 培養と spheroid 培養では差があり、spheroid 培養の高い薬物排出活性を反映して、spheroid 培養で高い IC₅₀ 値が得られた(図 C)。DOX と同様に MDR1 タンパク質で排出されることが知られているエピルビシン (EPI) でも、monolayer よりも spheroid 培養で高い IC₅₀ 値が得られ

た。さらに、MDR1 によって排出されない 5-フルオロウラシル (5-FU) の IC₅₀ 値が、monolayer と spheroid 培養では差がなかったことから、DOX と EPI の IC₅₀ 値の差が、排出活性の差によるものであることが示された。以上の結果から、spheroid 培養によって、肝がん細胞の高い薬物排出活性が発現し、生体外で、がん細胞の薬剤耐性を再現できることが示唆された。

現在、制がん剤のスクリーニングでは、全て monolayer 培養が使われているが、今後は、このがん細胞の spheroid 培養法を用いて、制がん剤ならびに薬剤耐性克服薬の開発が、さらに進展することが期待される。

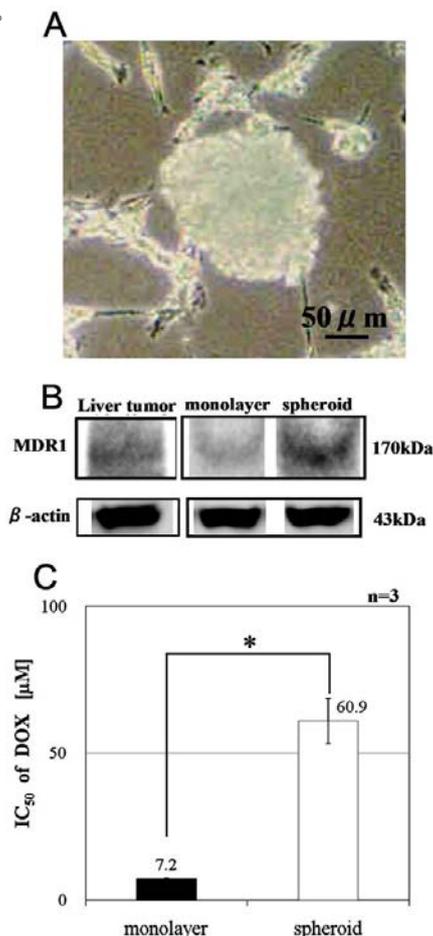


図 A: 肝がん細胞の spheroid 培養、B: spheroid 培養による MDR1 の高発現、C: spheroid 培養による DOX に対する薬剤耐性の発現

参考文献

[1] T. Matsushita et al., *Cytotechnology* **42**, 57-66 (2003).

書籍紹介 : Water –The Forgotten Biological Molecule

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

書籍題目 : Water –The Forgotten Biological Molecule

編者 : Denis Le Bihan, Hidenao Fukuyama

出版社 : Pan Stanford Publishing, Singapore

総ページ数 : 399 ページ

ISBN : 978-981-4267-52-6 (Hardcover);

978-981-4303-16-3 (eBook)

出版年 : 2011 年

我々は水なしには生きていけない。過去には、安全に飲める水を求めて戦争が起き、渇水は飢饉や乾燥を通して死をもたらした。今でも飲料水の確保は国家の重大な責務である。我々の体の重量の 60-70%が水であることから、これらは全く不自然なことではない。水は重要な生体分子なのである。しかし、水と生命、生体物質とのかかわりは、今でも完全には理解されていない。常温常圧で液体であるという水、 H_2O 、の特異な性質が、生命の存在を可能にしている。3 原子からなる他の分子、例えば CO_2 は、常温常圧では気体である。これがなぜかという完全な説明、水の物理学でさえ、不完全である。もちろん、水分子の原子配位から、つまり H-O-H の角度が 105° であるということから、かなりのことは説明できる。水の社会の物理学、つまり水のダイナミックなネットワーク形成の物理学は液体の水を理解するために解明されなければならない問題として残されている。多くの研究者が、この基礎的な問題に、様々な方法で取り組んでいる。

水と他の生体物質との相互作用も、生命の理解には欠かせない。分子レベルで正しいと思われていることが、細胞内で成り立っているのかいまだ定かではない。生きた細胞を用いて、細胞内の水和の状態などの条件を厳密に制御した実験はおそらく不可能だろう。このような場合は、多様な実験技術を有機的に組み合わせることが一般には行われている。

このような現状で、編者は、生体の水の研究で定評のある研究者からの寄稿を集めて本書を出版した。編者の一人の福山秀直氏は、京都大学医学部脳機能総合研究センターの教授であり、NMRを用いて脳の画像

診断をされている方である。もう一人の Denis Le Bihan 氏と長い間共同研究をされてきている。高次脳機能障害のある患者は、水の存在状態が違うので、NMRですぐにわかるとのことである。

本書の構成は以下のとおりである。

Part I, The Structure of the Water Molecule.

Part II, Water as a Solvent.

Part III, Water at Interfaces.

Part IV, Water and Cell Membranes.

Part V, Water and Cellular Structure/Physiology.

Part VI, Water, Health, and Life.

本書には、本新学術領域から筆者のほか、A03 班計画研究班員の平田文男教授が Part II に寄稿している。本書は、基礎的なことから医学応用に至るまで、水の生物物理学に関して優れたモノグラフとなっている。本ニュースレターNo. 5 に紹介されている”Water and Biomolecule –Physical Chemistry of Life Phenomena”と合わせて読むとより効果的であろう。

