

業績紹介：青色光センサータンパク質 PixD の反応

寺嶋正秀

(京都大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目："Light-Induced Conformational Change and Transient Dissociation Reaction of the BLUF Photoreceptor Synechocystis PixD (Slr1694)"

著者：K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima

雑誌巻号：J. Mol. Biol., 409, 773-785 (2011).

PixD は常温性シアノバクテリアの走光性の制御に関わる青色光センサータンパク質である。光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 Flavin) ドメインを持ち、その構造や光反応機構が近年多くの興味を集めている。主にゲルクロマトグラフィーを用いた研究により、レスポンスレギュレータタンパク質 PixE の存在しない時には PixD は 2 量体として存在し、PixE を加えることで PixE 5 分子と PixD の十量体を含んだタンパク質複合体(PixD₁₀-PixE₅)を作ること、ここに青色光を照射することにより PixD 二量体と PixE 単量体に解離すること、それにより生理活性が制御されているらしいことなどが報告され、その特異で興味深い反応が明らかにされた。今回、我々は PixD の光反応を、時間分解検出できる過渡回折格子(TG)法を用いて調べたところ、この多くの人が信じているこのスキームが間違っていることを見出した。

Fig. 1 に PixD のみの溶液を青色光で励起した後に観測される TG 信号を示す。マイクロ秒時間領域の減衰信号は放出された熱によるものであり、それに続く遅い時間の信号が反応分子と生成分子を表している。特に、ミリ秒領域に見える立ち上がりと減衰の信号は、我々のグループがしばしば報告する反応分子と生成分子の拡散信号に見える。しかし詳細な解析の結果、これは分子体積変化と単一の分子拡散信号であることがわかった。すなわち、光反応によって、構造変化は起こっても、この分子の拡散係数に変化はない(すなわち、親水性部分の露出といった大きな構造変化や解離反応などは起こっていない)ことを示している。また、ここで決定された拡散係数の値は、10 量体を示しており、PixE が存在しない状態でも 10 量体になっていることが分かった。これはゲル濾過によっても確認された。

さらに興味深いことに、励起のための光強度を増加させていくと、図 2 に示すように、信号の形が劇的に変化することが見出された。信号型の解析から、立ち上がりが生成物、減衰が反応物であることが分かった。また、決定されたそれぞれの拡散係数の値は、反応物が PixD の 10 量体、生成物が PixD 二量体として妥当な値であった。このことは、10 量体のうち複数個が励起されるとはじめて解離反応が起こることを意味する。すなわち、解離するのは PixE の存在のためではなく、PixD 自体の性質であることを示している。また、M93A 変異体では、WT で観測された体積変化や拡散係数変化が観測されなかったことから、解離に重要な変化は Met93 残基およびこれを含むループ領域の構造変化、あるいはその領域での揺らぎ増大で起こっていることが示された。

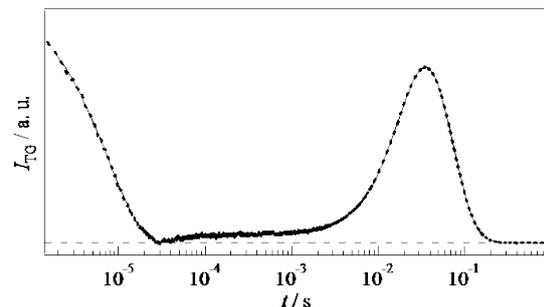


図 1 PixD の過渡回折格子信号。最初の減衰が熱格子信号。

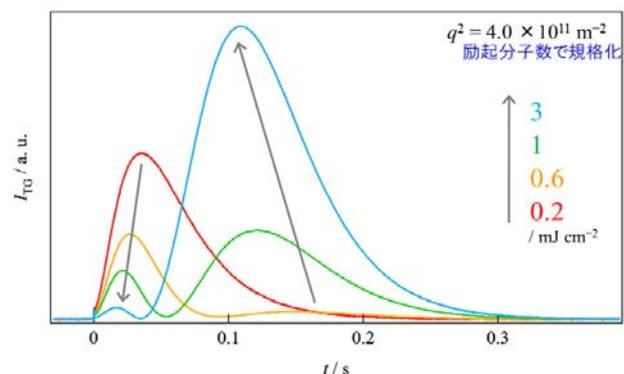


図 2 信号の励起光強度依存性。矢印は強度増加を示す。

業績紹介：タンパク質 - DNA 相互作用の時間分解検出

寺嶋正秀

(京都大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目: "Light-induced conformational change and product release in DNA repair by (6-4) photolyase"

著者: M. Kondoh, K. Hitomi, J. Yamamoto, T. Todo, S. Iwai, E. D. Getzoff, M. Terazima

雑誌巻号 *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2183-2191 (2011).

生体機能を理解するためには、分子間相互作用ダイナミクスを明らかにする必要があるが、そうした測定のできる手法はほとんど存在しない。ここでは光回復酵素(PHR)と DNA の分子間相互作用変化を時間分解でとらえることに成功したことを報告する。PHR は紫外線により損傷を受けた DNA(基質)(図 1)を修復する酵素である。発色団として FAD を持ち、光誘起により還元型の FADH₂ から基質へと電子を移動することで損傷を修復する。このための酵素と基質の結合サイトは発色団付近であることが知られているため、発色団付近での電子の授受といった局所的な相互作用が重要となる。また、こうして酵素から基質へ電子移動をするためには、これらが互いに近づいて結合する必要がある一方、修復後に別の基質を新たに修復するためには、修復された基質は PHR から離れなければならない。そのため酵素と基質間での解離・会合といった形の全体的な相互作用も修復機能に深く関わるはずである。しかし、光修復反応過程においてこれらの中で起こる相互作用ダイナミクスに関しては全く捉えられてきていない。ここでは過渡吸収(TA)法および過渡回折格子(TG)法を用い PHR の DNA 修復反応において酵素と基質間で起こる相互作用ダイナミクスを時間分解で捉えることを試みた。

PHR の光励起後に観測された TG 信号を図 2(黒線)に示した。基質である DNA の存在しない時には非常に弱い信号しか観測されず、減衰型の拡散信号は PHR 自身の光反応において拡散係数の変化がないことを示している。ここに基質を加えると、信号は劇的な変化を示した。際立った変化は、遅い時間に立ち上がり減衰からなる山型信号が観測されたことである。この変化は損傷を含まない DNA を加えたときには観測されなかったため、修復反応を反映したものである。この山型信号は分子拡散信号であることが分かった。DNA を加えると山型拡散信号が見られた事実

は、光修復反応において拡散係数変化が起きることを示している。この拡散係数変化反応の由来を決めるために、拡散係数値を決定した。その結果、反応物は PHR-DNA 複合体で、生成物は DNA であることが分かった。DNA 自身は光反応を起こさないため、この拡散信号が現れた事実は、暗状態で複合体として存在していた基質が修復され、PHR から解離することで溶液中に放出されたことを反映していると考察できる。このスキーム(図 3)に基づき、拡散信号の時間依存性を解析した結果、この解離反応の時定数が約 50 μ s であると決められた。この研究は、本手法が、揺らぎなどによって分子間相互作用が変化する過程を時間分解で捉えることのできる、有力な手法であることを示している。

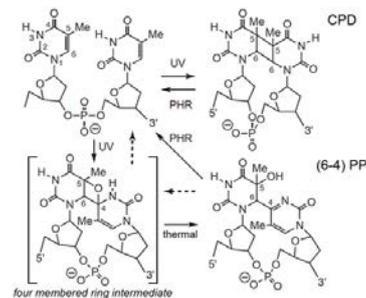


図 1 光ダメージを受けた DNA とその回復過程。

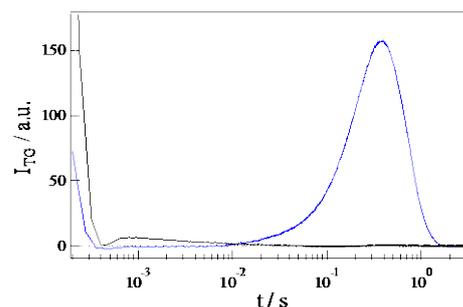


図 2 PHR の TG 信号(黒: DNA のない時の TG 信号、青線: DNA を入れたときの信号。)

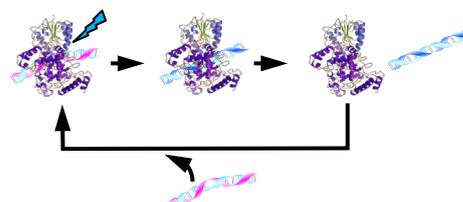


図 3 PHR と DNA の解離・結合過程。

業績紹介：カルシウムイオン (Ca²⁺) の胃がん腹膜転移の抑制効果

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: "Therapeutic effects of Ca²⁺ on peritoneal dissemination of gastric carcinoma *in vivo*"

著者: Kazuki Tatsumi, Hideaki Ichihara, Yuji Komizu, Koichi Goto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *J. Health Sci.*, **57**, 210-214 (2011).

胃がんは、肺がん、乳がん、結腸直腸がんに続き世界で4番目に多いがんである。特に、胃がんの腹膜播種(転移)は、難治性疾患であり、しばしば、多数の腸閉そくや腹水の増加を引き起こす原因となる。胃がん術後の腹膜播種の予防には、抗がん剤溶液による腹腔内洗浄法の有用性が報告されているものの、十分な治療法が確立されていない[1]。

カルシウム(Ca²⁺)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。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。筆者らは、No.30のニュースレターでも報告した様に、Ca²⁺の *in vitro* での胃がん細胞の抑制に関し、「Ca²⁺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」との新しいメカニズムを提案した[2]。

本研究では、Ca²⁺のヒト胃がん細胞の腹膜播種モデルに対する、*in vivo* でのがん抑制について検討した。なお、*in vitro* でがん増殖抑制を示さなかった Mg²⁺を陰性対照とした[2]。腹膜播種モデルの作成は、免疫不全マウス腹膜にヒト胃がん (MKN-45) 細胞を播種した。

まず、腹膜播種の抑制効果に関し、Ca²⁺は、未処理の Control と比べ、ヒト胃がん細胞の腹膜播種を抑制することを明確にした(図1A)。一方、Mg²⁺は、腹膜播種をほとんど抑制しなかった。そこで、腫瘍の組織切片を作成しアポトーシス誘導について検討した。その結果、Ca²⁺は、アポトーシスを誘導することが分かった(図1B)。一方、Mg²⁺は、アポトーシス細胞は認められなかった。

次に、Ca²⁺の腹膜播種モデルに対するマウスの延命

効果を検討した。Ca²⁺処理したマウスでは、延命率128%であり ($p < 0.05$)、延命効果が明らかになった(図1C)。しかしながら、Mg²⁺処理したマウスでは、延命率108%であり、延命効果は認められなかった。さらに、Ca²⁺の安全性について、血液検査および生化学検査の結果、毒性は認められなかった。

以上の結果から、Ca²⁺による胃がん腹膜転移の抑制効果が明らかになった。Ca²⁺が、がんの予防だけでなく治療に応用できる可能性を、動物レベルで初めて明らかにした。

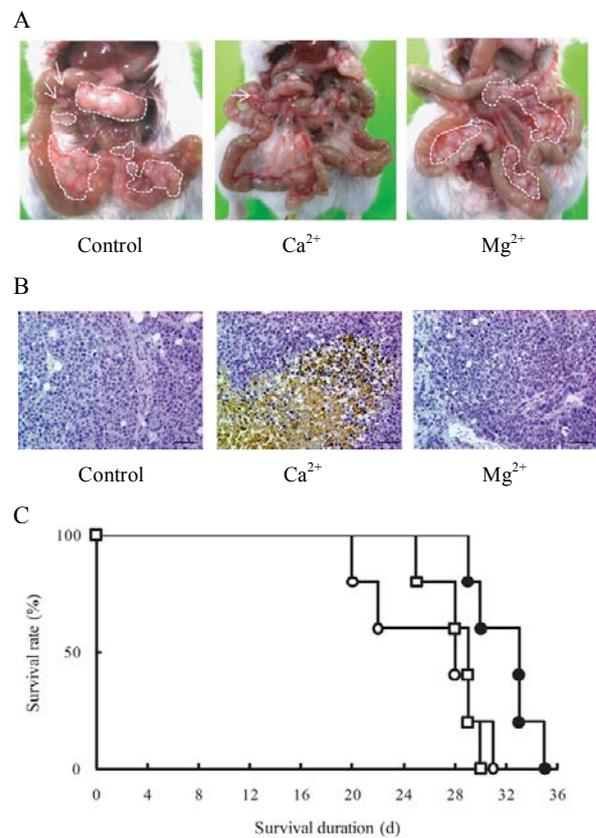


図1 Ca²⁺のヒト胃がん腹膜播種の抑制効果
 A) マウス腹部の胃がん腹膜播種の写真(矢印、白点線: 転移した腫瘍細胞)
 B) アポトーシス誘導の顕微鏡観察(茶褐色: アポトーシス細胞)
 C) 胃がん腹膜播種マウスの延命率

参考文献

- [1] Y. Yonemura et al., *Cancer Sci.*, **98**, 11-18 (2007).
 [2] K. Goto et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 439-442 (2011).

業績紹介：ハイブリッドリポソームの神経芽腫肝転移に対する抑制効果

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："Inhibitory effect of drug-free hybrid liposomes on metastasis of human neuroblastoma"

著者：Jyoji Yoshizawa, Yuka Negishi, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka, Takao Ohki

雑誌巻号：Pediatr. Surg. Int. 27, 379-84 (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]。

神経芽腫は、小児で最も頻度が高い固形腫瘍である。14歳以下の小児に対する5年生存率は、近年では30年前の35%から55%に改善した。しかしながら、外科手術、化学療法、放射線療法、および骨髄移植による集中治療でも、進行型の神経芽腫症に対する治療結果は満足できるものではなく、治療成績の向上には新たな治療法の確立が必須である。

本研究では、難治性のヒト進行神経芽腫に対する90mol%DMPC/10mol% C₁₂(EO)_n (n=21, 23, 25) ハイブリッドリポソーム (HLn) 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 ヒト神経芽細胞腫 (TNB9) 細胞に対する in vitro における HLn (n=21, 23, 25) の増殖抑制性効果を検討した。HLn (n=21, 23, 25) は、濃度依存的に TNB9 細胞の増殖を抑制した。

② HLn (n=21, 23, 25) のヒト神経芽腫に対する in vivo での治療効果に関しては、TNB9 細胞を経脾移植した肝転移モデルマウスを用い、HLn (n=21, 23, 25) で治療したマウスの肝臓を解剖学的に評価した。未治療のコントロールにおいては、TNB9 細胞の肝転移部

における腫瘍増加が、剖検および臓器重量において確認された。一方、HL-n (n=21, 23, 25) 治療群では、転移部での腫瘍増大の抑制がみられた。特に、HL21 および HL25 では、著しい腫瘍の縮小が確認された。

③ TNB9 細胞の肝転移モデルマウスに対する HLn (n=21, 23, 25) の治療効果を組織学的に検討した (図1)。未治療のコントロールに比べて HLn (n=21, 23, 25) 治療群では、転移病巣の縮小がみられた。特に、HL21 および HL25 では、著しい腫瘍の縮小が見られた。

④ TNB9 細胞の肝転移モデルマウスに対する HLn (n=21, 23, 25) の延命効果を検討した。未治療のコントロール群の平均生存日数は、68.6日であるのに対し、HLn (n=21, 23, 25) 治療群では、それぞれ、88.0、73.0、87.9日であった。特に、HL21 および HL25 治療群では、統計的有意差 ($p < 0.05$) が認められ、顕著な延命効果が確認できた。

以上のように、TNB9 細胞の肝転移モデルマウスに対して、HL21 および HL25 による顕著な治療効果が in vitro および in vivo において確認された。将来、難治性のヒト進行神経芽腫に対する新しい化学療法として、臨床応用が期待できる。

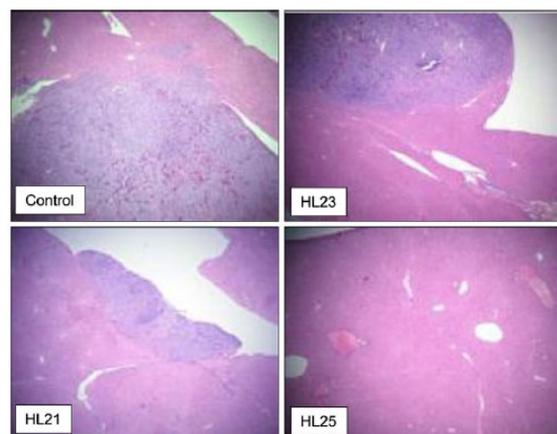


図1 HLn (n=21, 23, 25) のヒト神経芽腫肝転移モデルマウスに対する治療効果

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：ハイブリッドリポソームを用いたアルツハイマー病治療に関する基礎研究

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：“ハイブリッドリポソームを用いたアルツハイマー病治療に関する基礎研究”

著者：座古恵子, 坂口摩姫, 古水雄志, 市原英明, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一

雑誌巻号：薬学雑誌, **131**, 775-782 (2011)

アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)は、痴呆を主な症状とし、脳の萎縮・ β アミロイド ($A\beta$)の沈着による老人斑・神経細胞死が見られる世界的に最も多い進行性の神経変性疾患である。AD 治療薬として、アリセプト (ドネペジル塩酸塩) などが用いられているが、AD の初期段階でのみ作用し、適応範囲が狭く、吐き気や動悸、縦紋筋融解症などの副作用も報告されているため、より安全で治療効果の高い薬剤の開発が急務である。

上岡らが創製したハイブリッドリポソーム (HL) は、緩衝溶液中でベシクル分子とミセル分子を超音波照射するだけで調製できる生体適合性の高いナノ粒子である[1]。細胞レベルの研究において、薬物を含むせずに種々のがん細胞に対する顕著な増殖抑制効果が確認されている[2]。さらに、HL はがん細胞膜特異的に蓄積し、アポトーシス (プログラム細胞死) を誘導することが明らかになっている[3]。動物レベルの研究においては、種々の担がんモデルマウスを用いた治療実験から延命効果が得られている[4]。さらに、生命倫理委員会の承認後、悪性リンパ腫の患者に対する臨床試験において、高い安全性及び固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られている[5]。

本研究では、AD モデル細胞として用いられているヒト神経芽腫(SH-SY5Y)細胞を使用し、親水部の電荷がプラス、マイナス、中性と異なる脂質を素材とするHLを用いて、 $A\beta$ 蓄積抑制効果並びにメカニズムについて検討した。以下に得られた興味深い知見を示す。

① 中性の HL-DMPC、およびマイナス電荷の HL-DMPS は、100 nm 付近で長期間安定したのに対し、プラス電荷の HL-DMTAP は調製直後から不安定であり、短期間で沈殿を生じた。HL-DMPC 及び HL-DMPS は、生体内に投与した際に最適なサイズで、臨床応用

に適していることが明らかになった。

② HL 処理による AD モデル細胞への $A\beta_{1-40}$ の蓄積抑制効果については、 $A\beta$ を染色するチオフラビン T を用いて、蛍光写真観察により行った。結果を図 1 に示す。中性の HL-DMPC で処理した細胞では、経時的に蛍光が増し、 $A\beta_{1-40}$ の蓄積が確認された。マイナス電荷の HL-DMPS で処理した細胞では、観察を行った 90 分間を通して、 $A\beta_{1-40}$ の蓄積が著しく抑えられた。また、プラス電荷の HL-DMTAP 処理した細胞では、時間経過と共に $A\beta_{1-40}$ が蓄積する様子が観察され、 $A\beta_{1-40}$ の蓄積を抑えることは出来なかった。

③ HL 処理が細胞毒性の高い $A\beta_{1-42}$ に与える影響について検討した。細胞に $A\beta_{1-42}$ を添加することで、細胞増殖が抑制されることが示された。中性の HL-DMPC、およびプラス電荷の HL-DMTAP 処理によっては $A\beta_{1-42}$ による細胞増殖抑制作用を回復する効果は見られなかった。一方、マイナス電荷の HL-DMPS 処理によって、細胞の増殖は、コントロール ($A\beta_{1-42}$ 無添加の細胞) と同等にまで回復した。

以上の事から、マイナス電荷の HL-DMPS は、血液中の $A\beta$ を除去することで、AD 発症を防ぐと言う新たな医療素材として期待できる。

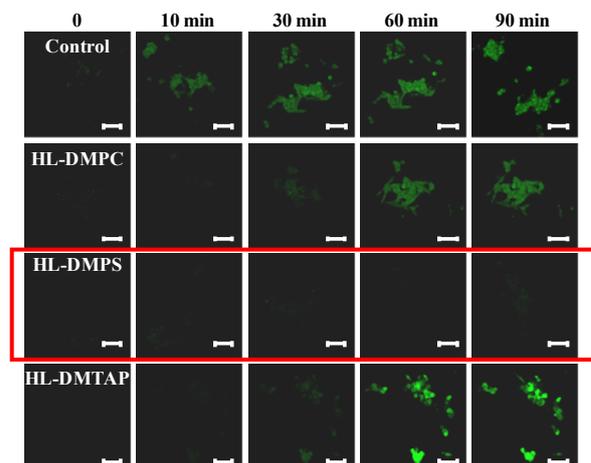


図 1 HL 処理による AD モデル細胞への $A\beta_{1-40}$ の蓄積抑制効果

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] Y. Komizu et al., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2**, 275-279 (2011). [4] H. Ichihara et al., *Int. J. Pharm.*, **394**, 174-178 (2010). [5] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28**, 1187-1196 (2008).

業績紹介：ハイブリッドリポソームの制がん効果とがん細胞膜の揺らぎ

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："Membrane-targeted nanotherapy with hybrid liposomes for tumor cells leading to apoptosis"

著者：Yuji Komizu, Sayuri Nakata, Koichi Goto, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：ACS Med. Chem. Lett., 2, 275–279 (2011).

がん細胞膜のダイナミクスは、細胞生物学的特性のひとつである。がん化に伴い、細胞膜の成分や組成比が変化し、がん細胞は、正常細胞と比べ細胞膜の流動性がより大きくなる。例えば、リンパ腫や白血病のがん細胞膜は、正常細胞膜と比べ、コレステロールが少なく、脂質の不飽和度が大きいことが分かっている。その他のがん種でも同様の現象が認められている。

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 の“揺らぎ (流動性)”が重要であることを報告している [2]。

本研究では、がん細胞膜の“揺らぎ (流動性)”に注目し、リン脂質 (DMPC) とミセル系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_n$) からなる HL の制がんメカニズムを *in vitro* で検討した。がん細胞には、肝がん (HuH-7, HepG2)、胃がん (MKN-45)、大腸がん (WiDr, HCT116)、肺がん (A549)、子宮頸部がん (HeLa) 細胞を用いた。がん細胞膜の揺らぎに関し、HL を種々の培養がん細胞に添加した結果、「がん増殖抑制効果とがん細胞膜の流動性との間に良好な相関性」を明らかにした (図 1)。すなわち、膜流動性の大きながん細胞ほど、HL の制がん効果がより顕著であることが明確になった。細胞死に関しては、HL が種々の培養がん細胞に対して、アポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、蛍光脂質含有 HL の細胞膜融合に関し、全反射顕微鏡を用いて検討した結果、HL/NBDPC は、膜流動性の大きながん細胞膜に、より顕著に融合蓄積することを明らかにした (図 1B)。また、HL のがん細胞膜への蓄積

量とがん細胞の膜流動性との間に良好な相関性が認められた ($p < 0.05$)。

以上の結果から、HL の制がんメカニズムに“細胞膜の揺らぎ (流動性)”が関与することを明らかにした。将来、がん細胞膜の揺らぎをターゲットとする HL のナノ治療にステップアップできるものとする。

今後は、計算科学手法を用いて、細胞膜の揺らぎと制がん効果のメカニズムについて検討する予定である。

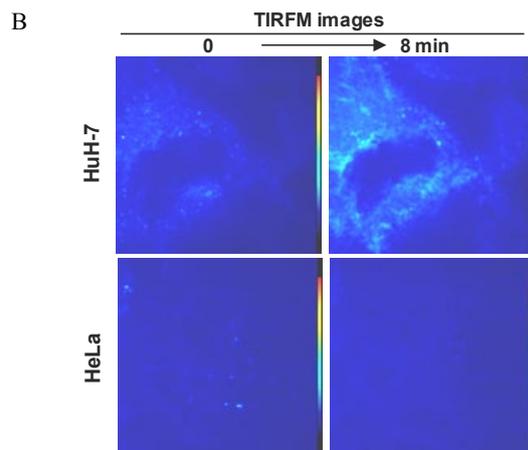
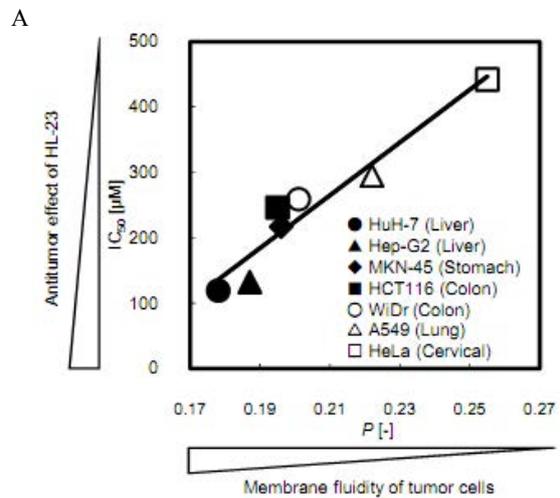


図1 HLの制がん効果とがん細胞膜の揺らぎとの関係
A) HLの制がん効果とがん細胞膜の流動性との相関性、
B)全反射顕微鏡 (TIRFM) によるHLのがん細胞膜表面への融合・蓄積のバイオイメージング

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
[2] Y. Komizu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131-6134 (2006).

北原グループの北沢創一郎氏が蛋白質科学会ポスター賞を受賞

北原 亮 (立命館大学・A01 公募研究代表者)

平成 23 年 6 月 7 日から 9 日まで、大阪のホテル阪急エキスポパークにて第 11 回蛋白質科学会年會が開催された。万博公園横であり、息抜きに会場の外に出ると「太陽の塔：岡本太郎作」が目の前に見られとても印象的だった。

本年會は本領域からも多くの参加者がありました。若手奨励賞とポスター賞の選考もありとても活発な発表と議論の場となっていました。代表者の研究室からも博士後期 1 年生の北沢創一郎君がポスター賞に応募し、「ユビキチンの高エネルギー構造安定化変異体」という演題で 2 分間のフラッシュトークと 2 時間のポスター発表を行いました。ポスター賞には合計 90 以上の応募があった中、受賞者 10 名に選ばれました(写真:北沢君と賞状)。本研究は計画班の加藤晃一先生と矢木真穂博士、公募班(H21-22 年度)菅瀬謙治博士との共同研究による成果です。

我々は蛋白質の“揺らぎ”とは、高いギブス自由エネルギー状態への状態転移だと捉えており、圧力や温度振動によって高エネルギー状態の分布率や転移速度を制御することができます。本研究では、これまでに圧力・温度可変の NMR 測定により発見されたユビキチンの高ギブスエネルギー状態 N_2 を、アミノ酸変異により安定化することに成功したものです。今後、高エネルギー状態の構造や機能的意義が明らかになると期待されます。

