

業績紹介：天然変性蛋白質の多様な相互作用を NMR 法で定量的に調べる

新井宗仁

(東京大学総合文化・A02 公募研究代表者)

論文題目: "Quantitative analysis of multisite protein ligand interactions by NMR: Binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP"

著者: Munehito Arai, Josephine C. Ferreón, and Peter E. Wright

雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3792-3803 (2012)

蛋白質-リガンド結合の強さと結合部位を求めることは、蛋白質の機能発現機構を理解する上で必要不可欠である。NMR 法はこのような解析に適しているが、結合部位が複数存在するような複雑な現象には、ほとんど適用されてこなかった。本研究では、NMR 法を用いて、天然変性蛋白質 p53 が標的蛋白質 CBP TAZ2 上の 2 ヶ所に結合することを示し、これらの結合部位と解離定数を定量的に求める方法を開発した。さらに、これらの結合速度は、従来知られている蛋白質間相互作用の中で最速であることが示唆された。

がん抑制因子 p53 の N 末端転写活性化ドメインは天然変性領域であり、AD1 と AD2 という 2 つのサブドメインに分けられる。これらのペプチドの一方を、 ^{15}N ラベルした TAZ2 蛋白質に滴定していくと、TAZ2 の NMR ピークがカーブする様子が観測された(図 1 左)。滴定に伴う化学シフトの変化を特異値分解 (SVD) 法で解析することにより、TAZ2 上には、AD1 (および AD2) の結合部位が 2 ヶ所あることがわかった。また、SVD 法をデータのノイズ・フィルターとして用いたあと、2 サイト結合モデルを仮定して、滴定曲線をグローバル・フィッティングした結果 (図 1 右)、これらの結合部位および解離定数を精度良く得ることができた (図 2)。

滴定に伴う NMR ピークの移動は、速い交換 (fast exchange) によるものであったことから、TAZ2-AD1/2 結合の解離速度 k_{OFF} は 500 s^{-1} 以上であることが示唆された。一方、TAZ2-AD2 間の (高親和性部位への) 結合では、解離定数は 32 nM であった。したがって、これらの結合速度 k_{ON} は $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上であると推定さ

れる。これを検証するために、NMR ピークの線形 (lineshape) を詳細に解析した結果、TAZ2-AD2 間の高親和性結合では、 $k_{\text{ON}} = (1.7 \pm 0.2) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{OFF}} = 540 \pm 80 \text{ s}^{-1}$ という値を得た。これは、本実験条件下では、 $1 \mu\text{s}$ 程度の時定数で結合し、 2 ms 程度で解離するという、極めて速いダイナミクスが存在することを示している。

従来、蛋白質間結合速度としては $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ オーダーのものが知られていたが、p53 AD2 と CBP TAZ2 の結合は、これまでで最速の蛋白質間相互作用と言える。これは、AD2 の負電荷 (-8.0) と TAZ2 の正電荷 (+14.3) 間の強い静電引力によって実現されると考えられる。

天然変性蛋白質には電荷が多く、それゆえに変性構造を採る。今回の結果は、一般に、天然変性蛋白質が関与する結合は極めて速いことを示唆する。

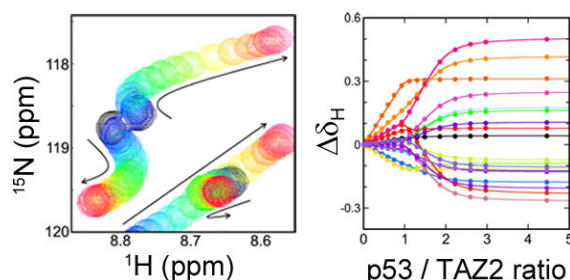


図 1: (左) ^{15}N -TAZ2 への p53 AD1 滴定に伴う NMR スペクトルの変化 (黒→赤)。(右) このようなスペクトルから得られた滴定曲線の例。

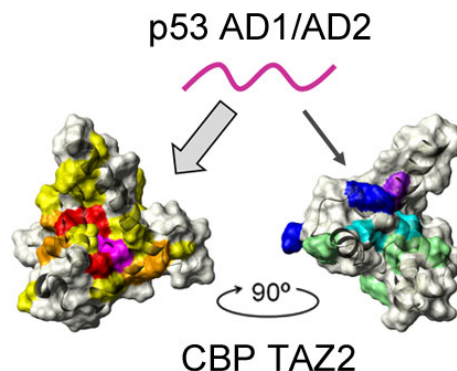


図 2: TAZ2 上の p53 AD1/AD2 結合部位。左側が第一の (高親和性) 結合部位、右側が第二の (低親和性) 結合部位。

業績紹介：ハイブリッドリポソームのヒト骨肉腫細胞に対する抗浸潤効果

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: "Hybrid liposomes inhibit growth and invasion of human osteosarcoma cells leading to apoptosis"

著者: Hideki Kitajima, Yuji Komizu, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 1784-1787 (2012)

骨肉腫 (Osteosarcoma) は、骨や軟部組織から発症する悪性腫瘍で、上皮性腫瘍とは区別され肉腫に分類される。一般的に、肺などの他の臓器に転移を生じることが知られており、進行すれば致命的となる。多くの症例において、抗がん剤による副作用が問題となっている。このため、新しい骨肉腫治療薬の開発が望まれている。

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として“HLの揺らぎ(流動性)”や“がん細胞膜の揺らぎ”が重要であることを報告している[2]。本論文では、HLの骨肉腫細胞に対する抗浸潤抑制について検討し、以下に示す新しい知見が得られた。

*In vitro*での細胞増殖抑制試験から、HL-n (DMPC/ $C_{12}(EO)_n$; n=21, 23, 25) は、ヒト骨肉腫 (U-2 OS, MG-63) 細胞に対して、濃度依存的に細胞増殖を抑制した。HL-n の50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、DMPC 単一リポソームの約 1/2 であり、HL-n は、骨肉腫細胞の増殖を顕著に抑制することが分かった。さらに、骨肉腫細胞の膜流動性を測定したところ、膜流動性の大きな骨肉腫細胞ほど、HL-n のがん抑制効果が高くなる傾向を示した。

次に、細胞死の解析 (PI 染色および TUNEL assay) により、HL-n は、骨肉腫細胞に対して、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

浸潤アッセイにより、HL-23 は、細胞の生存に影響の無い低濃度条件 (50 μ M) で、U-2 OS 細胞の浸潤を顕著に抑制することが分かった (図 A,B)。さらに、浸潤抑制のメカニズムを検討するため、スクラッチアッ

セイを行ったところ、HL-23 処理した細胞は、側方への移動が阻害されることを明らかにした(図 C)。以上のように、ハイブリッドリポソームのヒト骨肉腫細胞に対する抗浸潤効果を初めて明らかにした。現在、HLの骨肉腫細胞移植モデルマウスに対する *in vivo*での抗転移効果を検討中である。

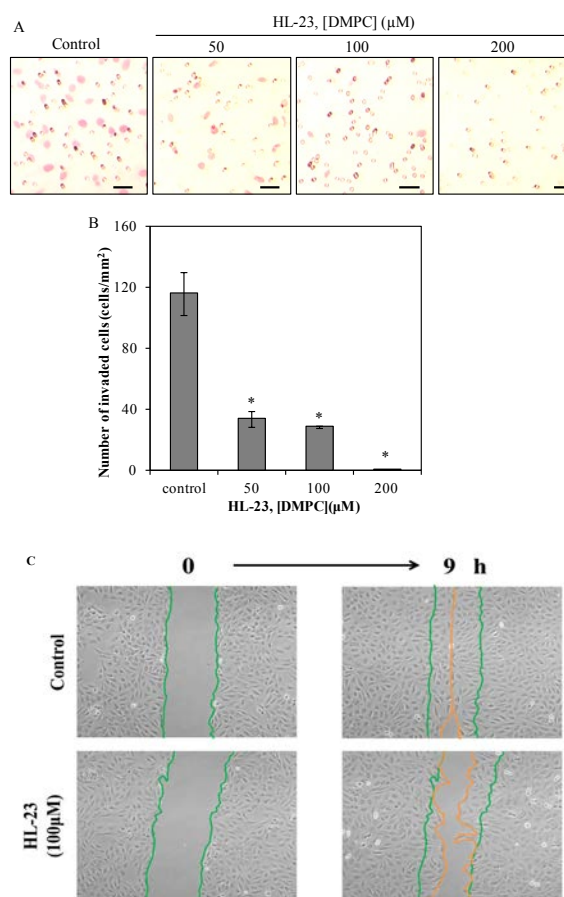


図 ハイブリッドリポソームの骨肉腫細胞に対する浸潤抑制効果 A, 浸潤細胞の染色写真; B, 浸潤細胞数の定量; C, 細胞の移動阻害試験 * $p < 0.05$ vs. control

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- [2] R. Ueoka et al., *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709-1719 (2011).

業績紹介：焼酎蒸留粕に含まれるメラニン生成抑制物質の探索

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："Antimelanogenic and antioxidative effects of residual powders from *Shochu* distillation remnants"

著者：Masahiro Ohgidani, Yuji Komizu, Koichi Goto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Food Chem., 132, 2140-2143 (2012)

本格焼酎は、麴に水と酵母を加えて発酵させたもろみに主原料（蒸した米、麦、芋など）を仕込み、発酵成熟させたもろみを単式蒸留機で蒸留して作られる。焼酎もろみを蒸留した後に残る焼酎蒸留粕（焼酎粕）は、年間十数万トン排出されており、主な処理方法として、海洋投棄、堆肥化、飼料化、焼却といった処理がなされてきた。2007 年以降、焼酎粕の海洋投棄が原則禁止された。そのため、海洋投棄に代わる処理方法、または有効利用法の開発が求められている。

焼酎粕に含まれる成分は、原料である米、麦、芋や酵母菌体、麴菌体などに由来したタンパク質、脂質、糖分、有機酸、繊維質、ミネラル、ビタミン類など有効成分を多く含んでおり、バイオマス有効利用の観点から、焼酎粕の医薬分野での基礎研究がおこなわれている。例えば、本研究室では、焼酎粕の種々の培養がん細胞に対するがん抑制効果[1]、正常ラットに対する免疫賦活効果[2]などを報告している。

本論文では、特有の発酵臭を減らし、吸湿性を抑えるため、独自に開発した各焼酎粕パウダー(PSDR: powders from *Shochu* distillation remnants)の化粧品分野への応用を目指し、メラニン生成抑制およびそのメカニズムについて検討し、以下に示す新しい知見が得られた。

(I) *In vitro* での毒性試験から、各（麦、黒米、芋、米）PSDR は、メラニン産生細胞であるマウス B16F0 細胞に対して、100-1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、細胞増殖に影響を及ぼさないことを示した。

(II) メラニン生成抑制試験より、黒米および麦 PSDR は、500- 1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、メラニン生成を有意に抑制した。一方、芋および米 PSDR は、メラニン生成にほとんど影響を及ぼさないことが分かった。

(III) メラニン生成抑制のメカニズムを検討するため、細胞内メラニン生成の律速酵素として知られるチロシナーゼ活性について調べた。その結果、黒米および麦 PSDR は、100-1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、細胞内チロシナーゼ活性を有意に抑制した。一方、芋および米 PSDR は、チロシナーゼ活性にほとんど影響を及ぼさないことが分かった。これらの結果から、麦および黒米 PSDR は、細胞毒性の無い濃度で、細胞内チロシナーゼ活性を抑制し、メラニン生成を抑えることを初めて明らかにした。

一般に、抗酸化能を持つ種々のポリフェノールは、細胞内のラジカルを消去することで、チロシナーゼ活性を抑制し、メラニンの生成を抑えることが報告されている。そこで、焼酎粕パウダー中のどのような成分がメラニン産生抑制に関わっているのかを調べた。クローレイ型電気化学検出器を備えた HPLC により、5 種類のポリフェノールが検出された。さらに、PSDR の抗酸化能とメラニン生成(図 a)、抗酸化能とポリフェノールの総量(図 b)、ポリフェノール総量とメラニン生成との間に良好な相関性が得られた。特に、抗酸化能が高く、ポリフェノール含有量の多い、麦・黒米 PSDR ほど、メラニン生成抑制効果が高くなることを明らかにした。以上のことより、焼酎粕の化粧品分野への応用へ向けた基礎的な知見が得られた。

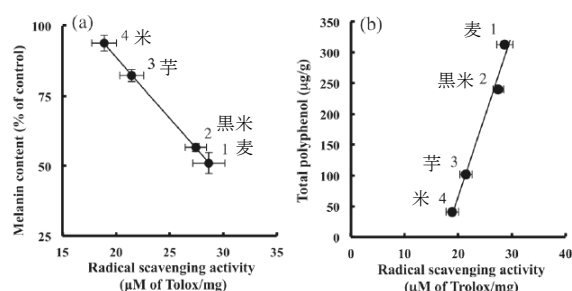


図 (a)各 PSDR の抗酸化能とメラニン生成との相関性、(b)抗酸化能とポリフェノール含有量との相関性
1:麦-PSDR; 2:黒米-PSDR; 3:芋-PSDR; 4: 米-PSDR

参考文献

- [1] Y. Kadota et al., J. Chem. Eng. Japan, 38, 154-157 (2005).
[2] K. Funamoto et al., J. Health. Sci., 54, 287-293 (2008).

シンポジウム報告 6th International Conference on Unsolved Problems on Noise and Fluctuations (UPoN)

林久美子

(東北大学工学研究科・A01 公募研究代表者)

UPoN (Unsolved Problems on Noise) は 1996 年に発足後、約 3 年おきに、ハンガリー(1996)、オーストラリア(1999)、アメリカ(2002)、イタリア(2005)、フランス(2008)とヨーロッパを中心に開催され、第 6 回は 2012 年 2 月 20-24 日の間、インドのコルカタにて行われました。参加者の多くはヨーロッパの統計力学や数理解物理の研究者です。

会議の名前どおりに、UPoN では様々な系の揺らぎやノイズに関する研究が集結します。私に関して言えば、Keynote Lecture として 40 分を割り当ていただき、分子モーターF₁-ATPase に揺らぎの定理を応用した Hayashi, Ueno, Iino & Noji, PRL (2010)を発表しました。会議の雰囲気を伝えるべく、下記にセッションタイトルを列挙します。

- **Noise** in Biological Systems
- **Fluctuations** in Economics and Financial Market
- **Noise** in Materials and Devices
- **Noise** in Complex and Non-linear Systems
- Quantum **Noise** and Coherence
- Application of **Noise** in Measurements, Technologies and Informatics
- Theoretical Trends in **Fluctuations**



写真 1 コルカタ(カルカッタ)にて。自然が美しい。

会議では、理論の研究が多く発表され、個人的には退屈に感じることもありました…。次回 UPoN の Committee に誘っていただき、参加が実現すれば、Biological Systems に関して実験研究の発表を増やしたい、と言ってみよう。揺らぎと生体機能の領域で知合った皆様と UPoN の会議で協力できる日が来ればいいな、と。

追記：会議のプロシーディングスを Fluctuation and Noise Letters (<http://www.worldscinet.com/fnl/>) という雑誌に投稿するのも参加の魅力の一つです。



写真 2 インドの学生や日本人参加者と。日本人の彼はスピングラスの実験で揺動散逸定理の破れを観察。



写真 3 ポスター発表。この学生は私の発表にすごく質問してくれました。分子モーターの理論の人。