

生体制御分子探索と機能解析を基盤とする健康科学

研究代表者：長岡 康夫
研究担当者：下家 浩二・松村 吉信・福永 健治

本研究グループは本年度で研究期間の3年を終えることになる。この3年間の研究基盤作りが2つの大型プロジェクトの採択に結びつく結果となり、ここでの各研究員の研究活動が、それらのプロジェクトに引き継がれ発展してゆくものと期待している。

本研究グループの主な目的は、生体制御分子の探索とその機能解明に基づく健康維持増進技術の開発研究であった。生体制御分子、すなわち新規の内因性タンパク質、生理活性低分子化合物、機能性生体金属、環境内分泌かく乱物質などを探索し、これらの物質が生体に及ぼす機能を明らかにすることである。そして、ここで得られた知見を基に、疾病予防、健康阻害要因の除去、健康維持、健康増進、に結びつく新しい方法論の提示を目指すことである。今後、本研究グループの研究員は文部科学省と関西大学のご支援を賜り運営される、私立大学戦略的研究基盤形成事業の「環境アポトジェンを含む環境汚染化学物質の作用動態解析と化学生態学的防除法の開発研究（代表者：土戸哲明）」および「地域産業シーズ・ニーズに応えた高付加価値天然素材の発掘とその製造技術の実用化研究（代表者：山本秀樹）」の各プロジェクトに所属することになった。今後は各研究員がこれらのプロジェクトの中で、本研究グループの目的である、生体制御分子の探索とその機能解明に基づく健康維持増進技術の開発研究に引き続き関わることになった。

本報では、本研究グループの研究員が分担する研究で得られた結果について概説する。

I. ラットの脂質代謝に及ぼすプロタミン給餌の影響

福永健治*、細見亮太**、吉田宗弘***

【はじめに】

乳清タンパク質や大豆難消化性タンパク質など食事性

のタンパク質の脂質代謝におよぼす影響が注目されている¹⁾。また、われわれは、魚肉の主要成分であるタンパク質に血清コレステロール低下効果があることを明らかにした²⁾。本研究では引き続き魚介類に注目し、魚精巢由来のタンパク質であるプロタミンの脂質代謝に及ぼす影響について明らかにしようとした。

魚類の白子、すなわち精巢に含まれるプロタミンは細胞の核の中で核酸を巻きつける糸巻きの役割を持ったタンパク質で、アルギニンが構成アミノ酸の約60%を占める³⁾。プロタミンは食品添加物（抗菌剤）や糖尿病薬の原料としても利用されている⁴⁾。本研究では魚の精巢由来タンパク質であるプロタミンに着目し、血清および肝臓脂質成分に及ぼす影響を検討することを目的にラットを用いて動物実験を行った。

【実験方法】

実験動物として4週齢Wistar系雄ラットを用いた。タンパク質源をカゼインとするAIN93G餌料による5日間の予備飼育後、試験餌料の給餌を開始した。試験餌料はAIN93G給餌の対照群、タンパク質源であるカゼインをサケ由来プロタミンに10%置換したProtL群、25%置換したProtH群の3群を設定した。試験餌料によって28日間飼育後、常法により採血し、血清および肝臓と白色脂肪組織を採取し、成分測定を行った。加えて、糞中脂質、胆汁酸およびコレステロール（Chol）の定量を行った。

【結果及び考察】

飼育実験期間を通して、各群間に餌料摂取量、摂水量に差はみられなかった。また、体重の増加及び解剖時の体重、解剖時肝臓重量および白色脂肪細胞重量に各群間に有意な差はみられなかった。

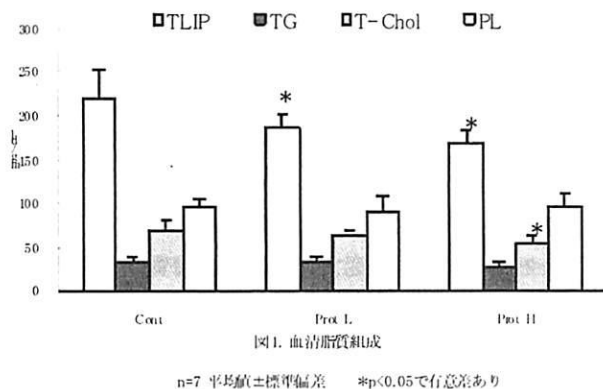
つぎに血清脂質成分に及ぼす試験餌料の影響を図1に示した。血清総脂質（TLIP）および総コレステロール（T-Chol）はProtH群で有意に低下し、トリグリセリド（TG）でも低下がみられたが、PLは有意な差は見られ

* 化学生命工学部准教授 水産学博士

** 先端科学技術推進機構 ポスト・ドクトラル・フェロー

*** 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

なかった。ProtL群では、TLIPの有意な低下、T-Cholの低下傾向がみられた。一方、ProtLおよびProtH群ともに動脈硬化の指標である、低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C) の有意な低下、高密度リポタンパク質コレステロール (HDL-C) の上昇が確認された。肝臓では、ProtL群、ProtH群においてTLIP、T-Chol、TGの有意な低下が確認されたが、PL各群とも有意な差は見られなかった。肝臓ではProtHとProtL群の間にTLIP、T-Chol、TG、PLに有意な差はみられなかった。



血清のTLIP、T-Chol、TG、LDL-Cおよび肝臓のTLIP、T-Chol、TGの低下は、プロタミンの構成アミノ酸の約6割がアルギニンであることから、アルギニンによる脂質代謝の亢進、プロタミンの分解物である塩基性ペプチドによる食事由来の脂肪の分解、吸収抑制作用が推察された。また、プロタミンにProtL群にも効果があることから、比較的少量でも効果があると考えられ、ヒト摂取に転化したとき、通常の食生活を逸脱しないレベルの少量摂取によって、高脂血症および動脈硬化予防・改善効果、また脂肪肝の予防効果が見込まれる。

肝機能指標である血清ALTおよびASTについて検討したところ、有意ではないが、プロタミンの給餌によってともに低下がみられた。これは、Chol代謝改善にともなう肝機能の改善⁵⁾であると考えられる。プロタミン給餌群において、血清TG、T-CholとLDL-Cの低下、肝臓については、TG、T-Cholの低下が前述のように確認されたが、糞中脂質、胆汁酸およびChol排泄の増加、超低密度リポタンパク質画分の顕著なTG、T-Chol低下が確認されたことから、プロタミンを摂取することによって、糞への脂質、胆汁酸およびChol排泄増加し、その結果、肝臓から血液への脂質排出の低下し、血清脂質改善効果が発現したためであると考え⁶⁾。

本研究から、プロタミン摂取によってもたらされる脂質代謝改善作用機序が明らかにされた。現在、サケやニシンなど非常に限られた魚種の精巢しか利用されておらず、マグロやカツオなど高額流通魚種をはじめ多くの魚

種についても精巢は流通前に破棄されているのが現状である。各種魚類の精巢を原料に、これまでほとんど注目されなかったプロタミンの健康機能性について、さらに明らかにしていくことが、水産物の付加価値を向上させ、限りある資源を有効に活用していく一助となるものと考ええる。

参考文献

- 1) Sugano M, Koba K; Ann N Y Acad Sci. 15;676:215-22 (1993).
- 2) Hosomi, R.; Fukunaga, K.; Arai, H.; Nishiyama, T.; Yoshida, M. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9256-9262 (2009).
- 3) Aspedon, A.; Groisman, EA. *Microbiology.* 142, 3389-3397 (1996).
- 4) Jaques, LB. *Protamine Can. Med. Assoc. J.* 108, 1291-1297 (1973).
- 5) Shukla A et al, *Br J Nutr.* 96 (4): 674-682 (2006).
- 6) Kayashita, J.; Shimaoka, I.; Nakajoh, M.; Yamazaki, M.; Kato, NJ. *Nutr.* 127, 1395-1400 (1997).

II. 自然突然変異によって取得した抗菌性陽イオン界面活性剤耐性菌の大腸菌の変異部位同定とそれら遺伝子変異の耐性能への影響解析

松村 吉信*

ヒト社会では様々な製品が開発・生産され、消費されている。その中には細菌やカビ等の微生物汚染が製品の品質を低下させるだけでなく、疾病の原因となる場合が多く報告されている。特に加工食品や医薬品、医療器具への微生物汚染は死亡事故などの重大な事故の発生原因となっている。このようなことから、製品やそれを製造する環境における微生物制御が非常に重要視されている。微生物制御の最もポピュラーな方法は熱処理で、一般に60℃以上の環境で処理されているのが、熱処理できない場合には、抗菌剤等による殺菌処理が施されている。

抗菌剤を用いた微生物の殺菌処理は微生物細胞濃度に対して使用する薬剤濃度が重要となる。つまり、薬剤濃度が低くなると一部の微生物細胞が生残するため、生残した微生物がその後増殖することによって微生物汚染が拡大することとなる。このため、その使用容量や使用法は適切・厳密にする必要がある。また、抗生物質等では低濃度処理によって抗生物質耐性菌の出現がこれまでに数多く報告され、その一部は多剤耐性を示すため、問題となっている。しかし、現時点では、抗生物質を除く抗

* 化学生命工学部准教授 博士(工学)

菌剤での耐性菌の出現はあまり注目されておらず、その報告も多くないことから、抗菌剤の有用性は確保されていると考えられ、ヒトへの安全性の高い抗菌剤では一般家庭でも使用され、その使用頻度や使用量は年々増加している。このような状況は抗生物質耐性菌の出現とその問題化の前段階と似た状況であることから、今後、一般的な抗菌剤で耐性菌の出現が容易に確認される状況になった場合には、抗菌剤の使用法の再検討が必要であると考えられる。そこで、我々の研究室では比較的一般的に用いられている安全性の高い抗菌剤である臭化トリメチルアンモニウム塩を（CTAB）用いて耐性菌を出現の可能性を検討してきた。CTABは塩化ベンザルコニウムと同種類の陽イオン性界面活性剤（第4アンモニウム塩）である。使用菌には大腸菌（OW6株）を用いた。その結果、野生型の大腸菌よりも約3倍耐性能の高い変異型の大腸菌を取得することができた。この大腸菌は変異誘発剤を用いることなく、低濃度のCTABを含む培地中で培養するだけの処理で取得されたものであった。また、我々はCTAB耐性菌の出現が再現可能であることを、別の培地系での低濃度CTAB処理によつての容易な耐性株の取得で確認している。この約3倍の耐性能を持った耐性菌を大腸菌OW6株名付け、その生理学的諸性質を詳細に解析した結果、細胞表層の変化、一部のタンパク質生産能の変化を確認し、細胞表層の変化が獲得した耐性能の一要因であることをこれまでに研究で明らかにしている^{1, 2, 3)}。そこで、本研究では分子生物学的諸性質を明らかにするため、OW6株ゲノムの変異部位の特定を行い、獲得耐性能と変異部位との関係については詳細に解析した。

ゲノム上の変異はcomparative genomic hybridization (CGH) microarray 法と塩基配列決定法を用いて同定した。CGH microarray法では野生型と変異型のゲノム断片の違いの有無をハイブリダイゼーション法で確認するものであり、確認された変異部位は塩基配列決定法にてその変化配列を決定している。その結果、7ヶ所 (*oppB*, *ycdR*, *IVR* (*vacJ-yfdC*), *rpoN*, *rpoB*, *rpoC*, *soxR*) に変異部位が確認された。この内IVR (*vacJ-yfdC*) 変異以外の変異は遺伝子のコーディング領域内の変異であり、さらに、*ycdR*変異を除く変異は、点変異や一塩基挿入変異、IS186挿入と大きく遺伝子機能を変化させるものであった。そこで、これら変異を独立させた組換え体を作製し、確認された変異のどの部分がCTAB耐性能に寄与しているのかを検討した。その結果、*soxR*変異が耐性に大きく関わっていることが明らかとなった（表1）。また、その他の変異も部分的に、あるいは協調してCTAB耐性に寄与していることが明らかとなった（表1）。以上の結果から低濃度抗菌剤処理は、その薬剤に

変異誘発活性がない場合においても、微生物の耐性能を向上させる変異を誘発することが確認された。この結果は安易な抗菌剤の使用が耐性菌発生を誘発させる危険性を含んでいることを意味するものと考えている。

表1. OW6株変異部位を持つ組換え体のMIC^a

菌株	MICs (μM)	
	M9	LB
OW6	10	20
OW6- <i>oppB</i> 66	10	20
OW6- <i>ycdR</i> 66	10	20
OW6- <i>rpoN</i> 66	10	20
OW6- <i>soxR</i> 66	15	30
OW6-IVR66	10	30
OW66	35	100
OW66- <i>oppB</i>	10	20
OW66- <i>ycdR</i>	30	100
OW66- <i>rpoN</i>	10	20
OW66- <i>rpoB</i>	15	40
OW66- <i>soxR</i>	20	80
OW66-IVR	15	60

^a 組換え体の耐性能をMICで評価した。細菌細胞を、CTABを含むM9培地またはLB培地で、37°C、24時間培養した。細胞の増殖が確認できなかった最小濃度をMICとした。変異遺伝子は66と記載されている。

次に、我々は*soxR*変異に着目し、この変異による細胞の生理機能変化を調査した。SoxRタンパク質はスーパーオキシドストレスのセンサー-転写制御制御因子として知られ、細胞内のスーパーオキシド濃度の増加を検知し、SoxS転写量を増加させる。増加したSoxSタンパク質はスーパーオキシドストレスの様々な防御タンパク質の発現をコントロールし、細胞で発生しているスーパーオキシドストレスを軽減する。このため、SoxRタンパク質活性が細胞のスーパーオキシド耐性を高めるものと言える。今回確認された変異はSoxRのC末端領域を短縮する変異であり、当初、SoxRの機能消失を導くものと予想された。しかし、*soxR*変異による*soxS*発現量の変化を定量RT-PCR法で確認した結果、予想に反して、*soxS*発現量の極度の増加が確認された。さらに、*soxS*制御の遺伝子の発現誘導も確認され、今回の*soxR*変異が細胞のスーパーオキシドストレス耐性の向上に繋がるものと予想された。また、CTAB処理によつて細胞内のスーパーオキシドストレスの誘発が起こっているものと予想される。

今後、CTAB処理と細胞内スーパーオキシド量との関係を解析するとともに、その他の変異による細胞の生理機能変化を調査する必要があると考えている。また、一

般にゲノム内で発生する変異は偶然に起こるものと考えられている。しかし、今回確認された変異はすべてCTAB耐性に関わることも明らかになった。言い換えると、これら変異は必然的に生じたものと考えられることもできる。今後、ストレス環境下で起こる変異発生のメカニズム解析が微生物制御において重要となると考えている。

参 考 文 献

- 1) Ishikawa, S., Matsumura, Y., Yoshizako, F., Tsuchido, T., *J. Appl. Microbiol.* **93**, 261-268 (2002) .
- 2) Ishikawa, S., Matsumura, Y., Katoh-Kubo, K., Tsuchido, T., *J. Appl. Microbiol.* **92**, 302-309 (2002) .
- 3) Ishikawa, S., Matsumura, Y., Tsuchido, T., *Biocontrol Sci.* **7**, 115-120 (2002) .

Ⅲ. 脳神経細胞へのストレスとその回避による生命体の健康維持

下家 浩二*

1. はじめに

脳内の神経細胞（中枢神経細胞）は、数千種類に及ぶ複雑な集団であり、その周囲には、神経細胞の約十倍量のグリア細胞（非神経細胞）によって脳内は殆ど隙間のない状態にある。また、脳は、グリア細胞の一種であるアストロサイトによって形成される血液脳関門によって完全に外部から遮断された臓器であり、血液中の特定の物質のみ出入りする事が出来る。逆にいえば、特定の物質しか血液中から脳内へは移行しない。

さらに、周知の事実ではあるが、神経細胞は、運動（随意や不随意）や記憶・学習などの我々の社会生活にとって重要な生命活動を制御している。しかも、他の臓器に比べて高度に制御されている。非常に脆弱であることも古くから知られている特徴である。上述からも分かる通り、脆弱な神経細胞の障害や死滅は、生命体の制御機構を損ない、生命体の維持にも大きな影響を及ぼす。非常に厄介な臓器とも言える。

脳は、高度に複雑さを含有させる要素が存在している。そして、単純な記憶や学習などでさえも、それらの分子機構に関しては、未だ不明な点を数多く残していることも想像出来るであろう。創造性や情緒を表すメカニズムなども不明であり、脳の研究は、脳を有する生命体研究における正に“最後のフロンティア”である。近年、社会的問題にもなっている認知症は、アルツハイマー病な

どの疾患によるものである。アルツハイマー病に限定すれば、記憶に重要な神経細胞群が、アポトーシスと呼ばれる細胞の自殺機構によって死滅した結果、発症に至る。患者の介護を考えると、患者のみならず周囲の人たちまでが、本疾患で苦難を強いられる。完治させる治療が必要だが、未だ、治療方法すら確立されていないのが現状である。

本稿では、高度に制御された脳神経の活動が特定の理由によって破綻し、疾病化するメカニズムを論じると同時に、それを回避する細胞内在性のメカニズムや細胞外因性のメカニズムについて概説し、脳神経細胞に着目し、健康維持に寄与しうる対策を提案したい。

2. 脳神経細胞へのストレス

我々の周囲には、細胞に働き掛ける多くのストレス原因因子（ストレッサー）が存在する。しかも、ストレスと特定しがたい物質以外のストレッサー（X線や衝撃などの物理的的刺激）も含まれている。いずれにしても、脳内の神経細胞に対してストレッサーが働きかけた時、神経細胞の小胞体と呼ばれる細胞内小器官内に、構造異常たんぱく質が蓄積する事が知られるようになった。この病理学的な現象を“小胞体ストレス（ER stress）”と呼ぶ。病理学的に見れば、この分子・細胞レベルでの発見は、非常にインパクトの大きいものであった。

小胞体ストレスが引き起こされると、神経細胞内では、様々な現象が誘導される。unfolded protein response (UPR) と呼ばれるものもその中の一つである。このUPRを介して、細胞内在性の自殺シグナルによる細胞死（アポトーシス）が引き起こされる場合がある。後述するが、小胞体ストレス特異的な分子機構によってアポトーシスが引き起こされることが明らかとなり、既知のアポトーシスと区別し、小胞体ストレス誘導型アポトーシスと分類されるようになった。

一方で、小胞体ストレスを軽減するためにもUPRが働く。そもそも小胞体に構造異常タンパク質が蓄積することが小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起するため、小胞体内での構造異常タンパク質の構造正常化、小胞体内に蓄積している構造異常タンパク質の小胞体外への排出と分解、小胞体自体の分解処理が小胞体ストレス軽減の機構として挙げられる。当然のことながら、神経変性疾患患者の脳神経細胞でもUPRが見られるが、アポトーシスを引き起こす前者のUPRが優位になっている。

3. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスによる神経細胞死の分子機構

これまで知られていた古典的アポトーシスと小胞体ス

* 化学生命工学部准教授 理博

トレス誘導型アポトーシスとの間で、細胞を死滅させる細胞内分子機構に大きな違いがあることが前述の通り分かった。これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構は、アポトーシス実行の刺激を受けた後、細胞内小器官であるミトコンドリアの機能不全が起り、ミトコンドリア内からcytochrome cというタンパク質が細胞質内に放出される。その後、cytochrome c、Apaf-1、pro-caspase-9（不活性化型）、dATPによる複合体（apoptosome）が形成され、プロテアーゼ活性を有するcaspase-9（活性化型）を産生する。次に、このcaspase-9は、pro-caspase-3（不活性化型）を切断し、caspase-3（活性化型）を産生する。最後に、caspase-3は、ICADとCADの複合体のICADを切断し、DNA切断活性を有するCADを活性化することによって、核内DNAの断片化を引き起こさせる¹⁾。以上が、これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構である（図1参照）。

一方、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの場合、その防御と実行の相反する分子機構が同時に働くことが分かった²⁾。まず、小胞体ストレスが負荷されると、細胞内では、小胞体膜に存在している3種のセンサータンパク質（ATF6、Ire1、PERK）によって異常構造タンパク質の産生が感知され、異常構造タンパク質の構造正常化（refolding）や新規タンパク質合成の停止を行うことによって小胞体ストレスの進行が防御される。Refoldingのためには、シャペロンが動員されることになる。小胞体ストレスが惹起した時には、ATF6とIre1の下流の分子（転写因子）によって、主としてGRP78というシャペロンタンパク質が、発現誘導され、小胞体ストレスを緩和していると考えられている（図2参照）。我々の研究室からも他大学との共同研究の結果として同様の結果を得ている³⁾。また、PERKが、翻訳に関わるeIF2 α をリン酸化することによって、eIF2 α の機能を阻害し、翻訳抑制によって小胞体ストレスがさらに高まることを防いでいると考えられている。しかし、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが起るような状況では、ATF6、Ire1、PERKを介する防御の能力を超えている。記述の通り、むしろ、ATF6、Ire1、PERKは、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起し、実行する方向に働いている。これが、小胞体ストレスに特異的なアポトーシス実行の初期段階における細胞内分子機構であり、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に関する初期段階の細胞内分子機構である^{2, 4)}。caspase-12の活性化、CHOP/GADD153やBcl-2ファミリータンパク質の発現上昇も小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に重要であることがわかっている。この事実は、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスにおける小胞体ストレ

ス誘導型アポトーシス刺激への抵抗性が増大する報告からも明らかとなった⁵⁾。ただ、caspase-12を活性化する機能タンパク質やcaspase-12の機能的基質も未同定であることや、Bcl-2ファミリータンパク質の機能発現機構も不明であり、更なる解析の余地を残している。

4. 健康を害する神経変性疾患と小胞体ストレス

神経変性疾患と言って、具体的に何を指しているのが分かる人は少ないと思う。そこで、神経変性疾患について解説する。神経変性疾患とは、中枢神経細胞が、経時的には、徐々に死滅して起こる疾患を指す。この神経変性疾患には、特定の遺伝子が原因となる遺伝性と周囲の環境や毎日の食事などに依存する孤発性に分けることが出来る。例えば、アルツハイマー病では、原因遺伝子群として、amyloid precursor protein (APP)、presenilin 1 (PS1)、presenilin 2 (PS2)、危険因子として、apolipoprotein E (ApoE) が知られている^{6, 7)}。病理所見として、海馬神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅した後、そこに投射している大脳皮質コリン作動性神経細胞も小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅する。その結果、アルツハイマー病患者は、学習・記憶・行動などの障害を呈し、最終的には死に至る。また、パーキンソン病では、parkinが、若年性の原因遺伝子として同定されている⁸⁾。病理所見として、黒質ドーパミン作動性神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅することが知られている。黒質ドーパミン作動性神経細胞は、運動を調節する線条体に投射していることから、その神経細胞の死滅によって、患者は、無動・固縮・震戦などの随意運動障害を呈する。いずれにしても、神経細胞が小胞体ストレスを受け、その結果、アポトーシスが起ることによって神経細胞が死滅する。この小胞体ストレス誘導型アポトーシスの細胞内の分子機構としては、上述の通りである。

では、健康を害する原因となるストレスは、何であろうか？治療法を確立する上で非常に重要な事項である。しかし、神経細胞が死ぬことによって引き起こされる孤発性の脳疾患では、高齢の患者が多いため、ストレスの特定は困難である。そこで、孤発性の研究は避けられ、脳における特定の病気に対する原因遺伝子の探索が行われるようになり、これまでに数多くの原因遺伝子が同定されている。そこから治療法を見出そうと世界中の研究者たちが考えたが、現在までに確立された治療方法は存在しない。

5. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスと神経栄養因子による抑制作用

この小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することが出来るならば、神経変性疾患の治療につながる可能性がある。そして、高齢になっても健康を維持することが出来る。私は、神経栄養因子と呼ばれるタンパク質群が、これまで知られているアポトーシスのみならず、小胞体ストレス誘導型アポトーシスをも抑制することを見出した^{3, 6-8)}。

神経栄養因子は、NGF、BDNF、NT-4/5、NT-3などとファミリータンパク質を形成している⁹⁾。神経細胞膜上には、膜一回貫通型の受容体 (TrkA、TrkB、TrkC) が存在する。これらの受容体もファミリーを形成しており、リガンドである神経栄養因子と特異的に結合する。これらの受容体は、神経栄養因子の結合によって、細胞内側に配置する数個から数十個のチロシン残基が自己リン酸化する。上記の神経栄養因子の作用は、TrkA、TrkB、TrkC内のリン酸化チロシン残基近傍に特定のシグナル伝達タンパク質が、特定のリン酸化チロシン残基に結合することによって実現される。次に、特定のリン酸化チロシン残基に結合したシグナル伝達タンパク質もリン酸化を受け、さらに下流の特定のタンパク質群が結合とリン酸化を繰り返し、リン酸化シグナル伝達のカスケード (経路) を形成している。これまでに、Ras/MAPK経路、PI3-K/Akt経路、PLC- γ 経路の少なくとも3つのシグナル伝達経路が見出されている⁹⁾。著者らは、小脳顆粒細胞を用いた低カリウム刺激によるこれまで知られているアポトーシスや、PC12細胞を用いたMPTP (細胞死誘導剤の一つ) による酸化刺激によるこれまで知られているアポトーシスでは、神経栄養因子添加によって活性化されたPI3-K/Akt経路を介して、神経細胞が、死滅から防御されることを見出してきた^{3, 10, 11)}。

さらに、著者らは、研究室で実験可能な培養細胞を用いて、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの実行と神経栄養因子による抑制機構を解析するために、糖鎖修飾阻害剤であるtunicamycin (Tm) や小胞体膜上のCa²⁺-ATPase阻害剤であるthapsigargin (Tg) を添加する実験系を用いた。両薬剤は、小胞体での正常な構造を有するタンパク質の生合成を阻害することが知られている。既述の通り、小胞体ストレスでは、アポトーシス進行過程でcaspase-12が特異的に活性化される。そこで著者らは、TmやTg添加後に活性化されるcaspase-12が、神経栄養因子 (NGFやBDNF) を存在させることによって活性化するPI3-K/Akt経路を介して抑制され、その結果、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが抑制されるのではないかと考えた。そこで、培養大脳皮質神経細胞と

PC12細胞にTmを添加し、小胞体ストレスを惹起すると同時に、BDNFやNGFをもそれぞれ培養大脳皮質神経細胞やPC12細胞に添加することによってcaspase-12活性の変動を見る実験を行った。その結果、BDNFとNGFは、有意にcaspase-12の活性化を抑制した。また、PI3-Kの特異的阻害剤であるLY294002をBDNFやNGFと共存させると、caspase-12の活性化が抑制できないことを見出した。また、BDNFやNGFによって活性化されたPI3-K/Akt経路は、caspase-9やcaspase-3の活性化も抑制していた^{6, 7)}。caspase-12は、caspase-9を直接活性化し、さらに下流のcaspase-3を活性化するとする報告が見られている⁴⁾。以上から、培養大脳皮質神経細胞とPC12細胞では、caspase-12から開始される小胞体ストレスによるアポトーシス進行は、caspase-9を活性化した後、caspase-3を活性化し、細胞を死滅させることが確認された。そして、神経栄養因子は、caspase-12の活性化を抑制することによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制していることが明らかになった。同様の結果は、Tgを添加した後、更にNGFを添加する実験においても同様であった⁸⁾。

さらに、古典的アポトーシスの進行過程でも見られていたBcl-2ファミリータンパク質の寄与についても検討を行った。その結果、PUMAやBimと呼ばれるアポトーシス誘導型のBcl-2ファミリータンパク質の発現上昇が重要であることが明らかになった。また、Baxのホモダイマー化も重要であることが明らかになった。これらの進行過程は、神経栄養因子によって活性化型から不活性化型となり、結果として小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することも分かった。

以上の実験から、神経栄養因子によって活性化されるPI3-K/Akt経路をうまく制御することによって神経変性疾患治療への可能性を示唆することが出来たと考えている。さらに限局的に述べるならば、GRP78の発現上昇による治療戦略が、細胞の抗アポトーシス作用の分子機能をも動員した良い方法になるのではないかと考えられる。結果として生命体の健康を維持しようと考えられる。

6. おわりに

患者だけではなく、介護者にも負担を強いる神経変性疾患の多くは、難病に属する疾患であり、研究者が早急に基礎的研究を積み重ねることによって治療方法を確立していかなければならないと考えている。高齢化社会の中、患者と限られた介護者の健康を促進せねばならないということから、研究の意義は大きいと考えている。本稿では、神経変性疾患の例として、アルツハイマー病とパーキンソン病に関して解説した。世界中で、華々しく原因遺伝子の解析に関する研究が実施され、それらの成果論

文を目にする傍ら、遺伝性の患者は、約1から2割である現状を考えると、孤発性を含めた一般的な小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行過程の研究と小胞体ストレス自体の根源を絶つ治療方法を地道に研究していく必要性も感じている。著者らは、孤発性の疾患進行分子機構とその抑制分子機構を解析することによって、実現可能な治療方法を提言していくと共に、結果的に、ヒトの健康に貢献しうる研究を継続せねばならないと考えている。また、著者は、小胞体ストレス誘導型アポトーシスにおいても、ミトコンドリアの機能不全を惹起すると考えられるBcl-2ファミリータンパク質群の解析を行い、特定のファミリータンパク質が小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起することも見出している。今後の研究の発展が、高齢化社会における健康維持対策の一つになるべく、研究を進めていきたいと考えている。

参考文献

- 1) M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, Nature 391, 43-50 (1998)
- 2) R. J. Kaufman, Genes. Dev., 13, 1211-1233 (1999)
- 3) S. Kishi, K. Shimoke, Y. Nakatani, T. Shimada, N. Okumura, K. Nagai, K. Shin-Ya, T. Ikeuchi, Neurosci. Res., in press.
- 4) N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata, Y. Yasuhiko, J. Biol. Chem., 277, 34287-34294 (2002)
- 5) T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, et al., Nature 403, 98-103 (2000)
- 6) K. Shimoke, H. Amano, S. Kishi, H. Uchida, M. Kudo, T. Ikeuchi, J. Biochem., 135, 439-446 (2004)
- 7) K. Shimoke, T. Utsumi, S. Kishi, M. Nishimura, H. Sasaya, M. Kudo, T. Ikeuchi, Brain Res., 1028, 105-111 (2004)
- 8) K. Shimoke, S. Kishi, T. Utsumi, Y. Shimamura, H. Sasaya, T. Oikawa, S. Uesato, T. Ikeuchi, Neurosci. Lett., 389, 124-128 (2005)
- 9) N. Takei, H. Nawa, Seikagaku, 76, 111-123 (2004)
- 10) K. Shimoke, K. Kubo, T. Numakawa, Y. Abiru, Y. Enokido, N. Takei, T. Ikeuchi, H. Hatanaka, Dev. Brain Res., 101, 197-206 (1997)
- 11) K. Shimoke, M. Kudo, T. Ikeuchi, Life Sci., 73, 581-593 (2003)

Ⅳ. ナノ粒子製剤化ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤プロドラッグの抗がん剤および遺伝子導入剤としての利用

石井 佑太、長岡 康夫*

1. はじめに

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) はヒストンタンパクのアセチル化を誘導する結果、遺伝子の転写活性化を引き起こし抗がん効果を始めとする様々な生理活性を与える。我々はHDACiが遺伝子導入時に外来遺伝子の発現増強作用を示すことを明らかにしており遺伝子治療にも有効である可能性を示した。HDACiの多くはその活性部位としてヒドロキサム酸 (HA) を有するがHAは血漿中での還元反応を受けやすく血中半減期が極めて短い。そこで、私はこの欠点を克服するためにHDACiのナノ粒子製剤化 (NP) を試みることにした。NPはコレステロールや脂質で構成される複合体で内部に薬剤を封入することにより、薬剤の血中安定性を向上することが出来る。また、NPの構成脂質をカチオン性脂質にすることにより、遺伝子導入のベクターともなる。しかしながらHDACiと脂質との親和性が低くそのままNP製剤化することは困難であるため、HDAC阻害剤に脂肪鎖を修飾したプロドラッグ化HDACi (Fig. 1) を設計、合成しこれをNP製剤化することにした。HDACiとしてはK-182またはSAHAを用いた。HDACiと脂肪鎖の結合部位には生分解性リンカーである、エステル基、

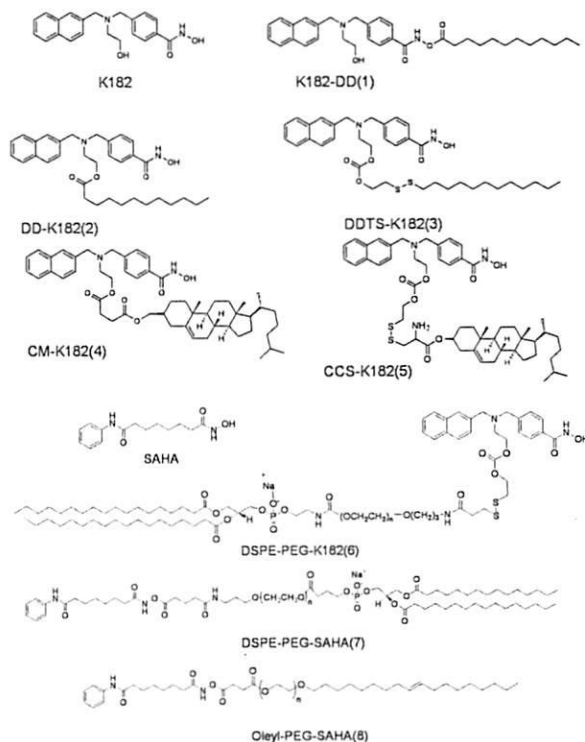


Fig.1 プロドラッグ化HDACiの構造

* 化学生命工学部准教授 薬博

又はジスルフィド基を導入した。そしてこのHDACiを含むNP製剤を用いて細胞毒性試験、遺伝子導入実験を行った。

2. 実験方法

(1) プロドラッグ化K-182の合成

・K182のヒドロキサム酸基またはヒドロキシエチル基にn-Dodecanoic acid、Cholesteryl succinateをエステル縮合し化合物 1, 2, 4 を得た。

・K182THP中間体にtriphosgeneでクロロカルボニル化しピリジンチオール保護したメルカプトエタノールを付加させ化合物 9 を得た。そこにシステインを介したコレステロール又は、Dodecanethiolを付加し化合物 3, 5 を得た。



Fig.2 DDTs-K182, CCS-K182の合成経路

(3) PEG修飾HDACiの合成

・SAHAをPEG-DSPE-PEG-NHSまたは、PEG-Oleyl-O-PEG-NHSとDMF中で反応させ化合物 4, 5 を得た。化合物 (6) は化合物 9 に 4, 5 の応用でジスルフィド結合を形成した。

(4) K-182プロドラッグを含むNPの作成

化合物 1, 2, 3 を正電荷コレステロール (OH-Chol) と界面活性剤 (Tween80) から成るNPに各種プロドラッグ化K-182を10mol%になるように調整し遺伝子発現活性を評価した。PEG脂質を 5 mol%のHDACi-PEG脂質 6, 7, 8 に置換したSL (ステルスリポソーム) と、Cholを 5 mol%のHDACi-Chol 4, 5 に置換したL (リポソーム) を調整し、製剤添加後48時間の細胞増殖抑制効果を評価した。

(5) 遺伝子発現活性の測定

ヒト前立腺癌細胞PC-3およびヒト乳癌細胞SKBr-3にGluc (分泌性ルシフェラーゼ) plasmid DNAと正電荷ナノ粒子を投与し、48時間目のルシフェラーゼの活性を測定した。

(6) 培養細胞におけるヒストンH3のアセチル化

PC-3細胞にGluc plasmid DNAと正電荷ナノ粒子を投

与し、24時間後にWestern Blotを行った。

(7) HDACi修飾リポソーム製剤の細胞毒性

Hela細胞にHDACi修飾リポソーム液を添加し48時間後にWST-8 assayを行った。

3. 結果と考察

(1) HDACi修飾NP製剤の遺伝子増強作用

以下に各がん細胞種におけるルシフェラーゼアッセイの結果を示した。

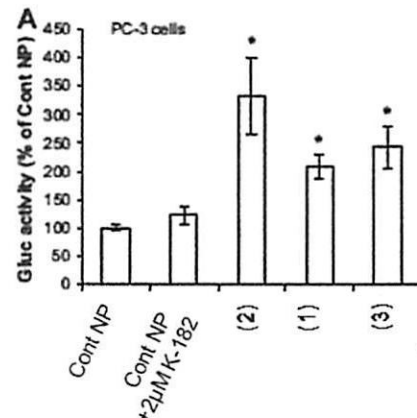


Fig.3 ヒト前立腺がん細胞PC-3に対する遺伝子発現増強作用

K-182とNPを混合しただけの系では、遺伝子発現の上昇は見られなかったが、1, 2, 3を加えたNP製剤はPC-3細胞においてcontrol NPに比べて遺伝子発現上昇作用を示した。

(2) PC-3細胞におけるヒストンH3のアセチル化

以下にWestern Blotの結果を示した。

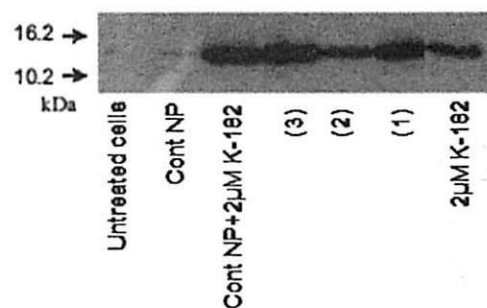


Fig.4 プロドラッグ化K-182によるヒストンH3のアセチル化

K-182ならびに1, 2, 3はPC-3細胞のコアヒストンH3のアセチル化を誘導していた。

(4) HDACi修飾リポソーム製剤の細胞毒性

化合物 5, 8 で調製したリポソーム製剤は高い細胞毒性を示した。Fig.5

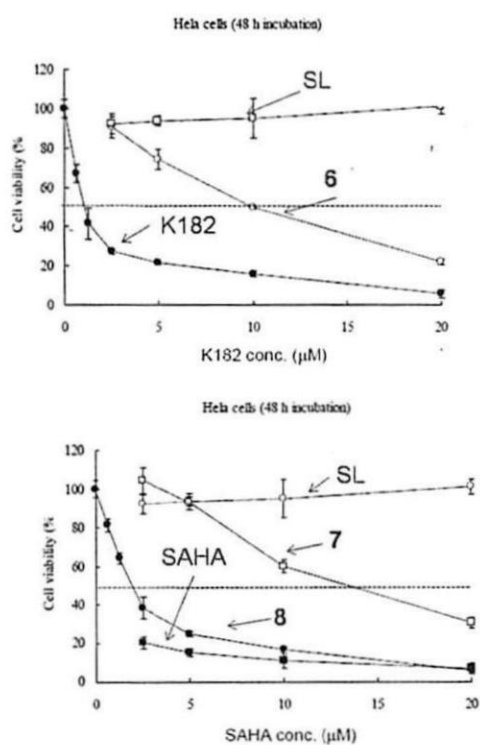


Fig. 5 投与48時間後のHDACi修飾リボソーム製剤の細胞毒性

4. 結論

1, 2, 3で調整したNP製剤は遺伝子導入剤として外来遺伝子の増強作用を示した。また5, 8で調整したリボソーム製剤は培養細胞で最も高い細胞毒性を示した。