

O-1

X線結晶構造解析による有機スズ化合物とヒト PPAR γ の結合様式の解明

○廣森洋平¹、原田秀作²、中村昇太³、吉田卓也²、西川淳一⁴、中西剛¹、永瀬久光¹
(¹岐阜薬大、²大阪大院薬、³大阪大微研、⁴武庫川女子大)

【目的】 これまでに我々は、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質であるトリブチルスズ(TBT)やトリフェニルスズ(TPT)が peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の強力なアゴニストとして機能し、ヒト絨毛性ゴナドトロピン産生促進作用や脂肪細胞の分化誘導作用を示すことを明らかにしてきた¹⁻³⁾。しかしながらその分子構造は、PPAR γ リガンドとして知られているチアゾリジン系薬物とは大きく異なっており、有機スズ化合物の PPAR γ への結合様式は、チアゾリジン系薬物と異なる可能性が考えられる。そこで本研究では、有機スズ化合物とヒト PPAR γ の結合様式の解明を試みた。

【方法】 TBT、TPT とヒト PPAR γ の特異的結合については、ヒト PPAR γ リガンド結合領域精製蛋白質 (PPAR γ LBD) に各有機スズ化合物を添加し、質量分析法を用いることで検討を行った。また、TBT または TPT と PPAR γ LBD の複合体を結晶化した後、X線結晶構造解析を行い、その結果から、TBT、TPT と PPAR γ の結合に重要なアミノ酸部位を推定した。重要なアミノ酸部位をアラニンに置換した変異 PPAR γ 遺伝子を作成し、さらに N 末側に GAL4DNA 結合領域を融合した発現ベクターを作製した。これとルシフェラーゼ遺伝子の upstream に GAL4 応答配列を連結したレポーター遺伝子を用いてレポーターアッセイを行い、既知の PPAR γ アゴニストである rosiglitazone、TBT、TPT の変異 PPAR γ に対する転写活性化能を評価した。

【結果および考察】 質量分析の結果から、TBTCl と PPAR γ はイオン結合により結合している可能性が示唆された。さらに X線結晶構造解析を行ったところ、PPAR γ の 285 番目のシステイン(C285)と TBT、TPT のスズ原子との間にイオン結合が形成されていることが確認された。また 363 番目のフェニルアラニン(F363)のフェニル基と TPT のフェニル基が π - π スタッキングを形成している可能性が確認された。そこで、C285、F363 に変異を導入した PPAR γ を用いてレポーターアッセイを行った。C285 に変異を導入することで、TBT、TPT の転写活性化能は完全に消失した。また、F363 に変異を導入することで、TBT の反応性低下はわずかであったが、TPT の反応性は大きく低下した。このことから、PPAR γ の C285 が有機スズ化合物による PPAR γ 転写活性化に必須であることが明らかとなった。また、TPT による PPAR γ 転写活性化に F363 が重要であることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Nakanishi T. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2830-2837 (2002)
- 2) Kanayama T. et al., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 766-774 (2005)
- 3) Hiromori Y. et al., *Chem. Biol. Interact.*, **180**, 238-244 (2009)

インターロイキン 6 産生におけるマンガンとヒ素の相互作用

○浅尾将史、角大悟、姫野誠一郎
徳島文理大学 薬学部 衛生化学

【目的】当研究室では、マンガン (Mn) を皮下投与したマウスの肝臓でメタロチオネイン (MT) が誘導され、この MT 誘導機構にインターロイキン 6 (IL-6) が関与していることを報告している¹⁾。しかし Mn による IL-6 誘導機構には不明な点が多く、Mn を投与したマウスにおいて IL-6 を特異的に産生する臓器の検出には至っていない。また細胞レベルで検討したところ、ヒト表皮角化 HaCaT 細胞が Mn に応答して IL-6 を産生することを見い出した。一方、亜ヒ酸は NO 産生やサイトカイン産生に様々な影響を及ぼすことが知られている。そこで本研究では、HaCaT 細胞を低濃度の亜ヒ酸で前処理することで、Mn による IL-6 産生誘導に影響を与えるかについて検討を行った。

【実験方法】ヒト表皮角化 HaCaT 細胞の培地に、亜ヒ酸 (NaAsO₂) を添加した 3 日後、MnCl₂ あるいは ATP を添加し、経時的に細胞と培地を回収した。IL-6 mRNA 量は特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法で、培地中に分泌された IL-6 タンパク質は ELISA 法で測定した。

【結果および考察】

HaCaT 細胞を MnCl₂ (400 μM) に曝露した後、経時的に IL-6 mRNA を測定したところ、1 時間後をピークに IL-6 mRNA レベルが顕著に上昇した。また 4 時間後の培地中 IL-6 タンパク質量を測定したところ、mRNA レベルと一致して IL-6 量の上昇が見られた。HaCaT 細胞を亜ヒ酸 (0.5, 1, 3 μM) で 3 日間前処理しておく、この Mn による IL-6 mRNA 量、タンパク質量の上昇が亜ヒ酸濃度依存的に減少した。また IL-6 誘導因子として知られる ATP (100 μM) を培地に添加して検討を行ったところ、やはり亜ヒ酸は濃度依存的に ATP による IL-6 産生を減少させた。亜ヒ酸 (0.5, 1, 3 μM) の単独添加では IL-6 産生量がわずかに上昇したものの顕著な変化は観察されなかった。

Mn、ATP のいずれによる IL-6 誘導も亜ヒ酸を前処理することで抑制されたことから、亜ヒ酸は両者の IL-6 誘導機構の共通の部分に影響を与えていると考えられる。ATP による IL-6 誘導機構については細胞内外の Ca²⁺の移動が重要であると報告されているが、Mn による IL-6 誘導にも Ca²⁺が関与するかどうかは不明である。今後、IL-6 発現誘導に関与する転写因子の活性化及び、細胞内 Ca²⁺濃度等を検討することで Mn 曝露による IL-6 産生機序を解明するとともに、亜ヒ酸による IL-6 産生抑制機構の検討を進める予定である。

【参考文献】

1) Kobayashi K., et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(2):721-7

O-3

Effect of copper and disulfiram combination therapy on the macular mouse, an animal model of Menkes disease

○Wattanaporn Bhadhrasit, Haruka Yoshino, Chie Fujisawa, Eishin Ogawa and Hiroko Kodama
Department of Pediatrics, School of Medicine, Teikyo University

【Objective】 Menkes disease (MD) is a neurodegenerative disorder characterized by a copper deficiency results from the absence or dysfunction of copper-transporting ATPase, ATP7A. The current standard-of-care treatment for MD is parenteral administrations of copper-histidine. The neurological degeneration is progressive even copper-histidine is treated. The reason is that the administered copper-histidine accumulates at the blood-brain barrier and is not transported to neurons. To resolve this problem, we investigated the effects of a combination therapy of copper and disulfiram, dimer of DEDTC; a lipophilic chelator, in the macular mouse, an animal model of MD.

【Experimental method】 Mice were treated with 50 μ g of CuCl₂ subcutaneous after birth. Then the mice were given a subcutaneous injection of CuCl₂ (10 μ g) and oral administration of disulfiram (0.3mg/g body weight) twice a week for 8 weeks and then sacrificed. Tissue copper levels were analysed with a Hitachi Z-8100 atomic absorption spectrophotometer (Hitachi Industrial, Japan). Activity of cytochrome-c oxidase was measured by observation of the decrease in absorbance at 550 nm of ferrocycytochrome c caused by its oxidation to ferricytochrome c (Sigma Aldrich; St. Louis, Mo, USA). Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (CRE) were investigated (Nagahara Life Science Laboratory, Japan).

【Results and discussion】 Copper concentrations in the brain, kidney, liver and serum were higher than those of control macular mice, which receive CuCl₂ and distilled water. In addition, cytochrome-c oxidase activity in the brain of treated mice was also improved by the combination therapy. The difference in weight gain between groups during the treatment period was observed. Liver and renal function tests showed no abnormalities in the treated mice, although copper concentrations in the kidneys of treated mice were higher than those of control macular mice. These results suggest that the copper-disulfiram complex is able to penetrate to the blood-brain barrier and Golgi membranes, in MD-affected cells and this combination therapy may be an effective treatment for the neurological disturbances in MD patients. Since the copper accumulated in the kidneys of the treated macular mice, the effects of long-term combination treatments on survival and biochemical parameters will be studied in the next future.

【References】

- 1) Hiroko Kodama and Chie Fujisawa, *Metallomics*, **1**, 42-52 (2009).
- 2) Hiroko Kodama, Emi Sato, Yong-Hong Gu, Katsuaki Shiga, Chie Fujisawa, and Takamitsu Kozuma, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **28**, 971-978 (2005).
- 3) Yuko Meguro, Hiroko Kodama, Toshiaki Abe, Shigeichi Kobayashi, Yukio Kodama, and Masahiko Nishimura, *Brain & Development*, **13**, 184-186 (1991).

機能性 Mn ポルフィリン錯体の抗酸化治療戦略

○朝山章一郎¹、米田祥浩¹、窪田 陸¹、清水孝彦²、川上浩良¹¹首都大学東京大学院 分子応用化学域、²東京都健康長寿医療センター

【目的】ミトコンドリアは生体内で酸素を用い効率的なエネルギー産生を行うオルガネラであるが、一方でスーパーオキシド($O_2\cdot^-$)をはじめとした活性酸素種(ROS)に曝露される環境にある。通常は、ミトコンドリアマトリックスに存在する Mn-SOD が $O_2\cdot^-$ を消去し、恒常性を維持している。しかし、強い酸化ストレスがかかると ROS の過剰発現に伴う疾患を引き起こすことが知られている。

当研究室では、これまでスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) ミメティック化合物である Mn ポルフィリン錯体の新しい分子設計を提案し、機能性抗酸化剤を合成してきた。 $O_2\cdot^-$ から過酸化水素を経由して水にまで多電子還元させる人工酵素として、Mn ポルフィリン錯体/ポリエチレングリコール修飾カタラーゼ複合体を開発し、その SOD 活性とカタラーゼ活性の相乗効果により、*in vivo* における肝臓の虚血・再灌流傷害を抑制してきた[1]。更に、標的細胞内での抗酸化剤局在制御の観点から、エネルギー代謝の中心的役割を演じているミトコンドリア (細胞内小器官) への特異的送達を目的に、親水性と疎水性のバランスを調節することにより、細胞膜親和性を制御した Mn ポルフィリン錯体を合成し、パーキンソン病等の治療を目指した神経細胞保護を導いてきた[2]。

本研究では主に、SOD ミミックである Mn ポルフィリン錯体が *in vivo* で酸化ストレス疾患を軽減できるかを実証するため、SOD 欠損マウスを用い、拡張型心筋症 (DCM) モデルでの *in vivo* 評価を行ったので、報告する。

【実験方法】*in vivo* では、SOD 欠損マウスが拡張型心筋症を発症する前である 5 週齢から、3 週間連日腹腔内投与し評価した。Mn ポルフィリン錯体 (Mn-P) の効果はマウス体重の増加率から評価した。解剖後は心臓/体重比から心筋の拡張抑制効果を評価した。なお、Mn-P の取り込み量は、心臓を回収し原子吸光分析法により測定した。

【結果および考察】*in vivo* において、*trans*-MnP (2 つの触媒活性基をトランス位に配する Mn-P) を投与した心臓/体重比は生理食塩水投与群と比較し有意に低下したことから、拡張型心筋症発症を抑制できることを示唆した。また、心臓の Mn-P 取り込み量では *trans*-MnP の取り込み量は少なかった。しかし、*in vitro* において、SOD1 欠損 fibroblast 細胞に *trans*-MnP を添加すると細胞内の $O_2\cdot^-$ は減少しており、*trans*-MnP は細胞内に取り込まれ SOD 活性を示したことが示唆された。*in vivo*, *in vitro* 評価より、*trans*-MnP は拡張型心筋症を抑制しているにも関わらず、心臓内に取り込まれた量が少ないことから、生体内代謝系により速やかに代謝された可能性が示唆された。

これらの結果は、機能性 Mn ポルフィリン錯体が *in vivo* における様々な酸化ストレスを抑制する抗酸化剤として有望であることを示唆するものである。

【参考文献】

- 1) T. Hanawa, S. Asayama, T. Watanabe, S. Owada, H. Kawakami, *J. Controlled Release*, **135**, 60-64 (2009).
- 2) T. Haruyama, S. Asayama, H. Kawakami, *J. Biochem.*, **147**, 153-156 (2010).

肺疾患治療を目的とした経肺投与型プラチナナノ粒子の創製と

その治療への応用

○福井謙太郎¹、勝見英正¹、北村徳子¹、佐藤香菜子¹、圓山翔子¹、石倉遙¹、中原正太郎¹、
佐野昌隆²、小山宗孝³、坂根稔康¹、山本 昌¹

1, 京都薬科大学 薬剤学分野、2, セラフト (株)、3, 京都大学大学院工学研究科

【目的】近年、肺疾患の病態には、吸入した有害物質により産生される活性酸素が関連することが明らかとされてきた。これまでに、各種抗酸化剤を利用した肺疾患治療が試みられているが、既存の抗酸化剤は、特定の活性酸素種のみを消去するものが多く、その効果も一過性である。一方、溶液中にプラチナを安定に分散させたプラチナナノ粒子は、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な抗酸化剤であることから、プラチナナノ粒子を吸入投与することによる効率的な肺疾患治療が期待される。そこで本研究では、活性酸素が関与する LPS 誘発肺障害をモデル疾患として取り上げ、その効率的抑制を目的として、活性酸素消去効果に優れたプラチナナノ粒子を創製するとともに、経肺投与後のプラチナナノ粒子の体内動態ならびに治療効果に関して系統的に評価した。

【実験方法】プラチナナノ粒子の調製：プラチナイオンに対して還元剤を水中で反応させることにより粒子径約 100 nm のプラチナナノ粒子を作製した。活性酸素種消去能：NBT 還元法または蛍光プローブ法により評価した。臓器分布評価：Wistar 系雄性ラットを pentobarbital 麻酔下、Enna & Schanker らの方法に準じて気管支にカニューレを挿管し、シリンジを用いてプラチナナノ粒子溶液を投与した。経肺投与 4 時間後に各臓器の摘出を行い、各臓器中白金量を ICP-MS を用いて測定した。LPS 誘発肺障害：pentobarbital 麻酔下、ラットに LPS を経肺投与することにより LPS 誘発肺障害モデルを作製した。プラチナナノ粒子経肺投与後の肺胞洗浄液中 LDH 活性を指標に肺障害抑制効果を評価した。

【結果および考察】プラチナナノ粒子は、スーパーオキシド、過酸化水素及びヒドロキシラジカルなどの各種活性酸素に対して高い消去能を示した。また、経肺投与後のプラチナナノ粒子は、肺内に長期滞留する傾向を示し、肺疾患治療に有利な体内動態を示した。さらに、プラチナナノ粒子経肺投与により LPS による肺障害が顕著に抑制されたことから、肺疾患治療におけるプラチナナノ粒子の有用性が明らかとなった。

O-6

AMPA 受容体活性化を介した亜鉛流入による海馬 CA1 LTP の増強と減弱

○鈴木美希, 玉野春南, 安藤正樹, 武田厚司, 奥 直人
静岡県立大学大学院 薬学研究科 Global-COE

【目的】

海馬は記憶形成に関与し、その分子基盤として長期増強 (LTP) が知られている。海馬 CA1 領域での LTP はグルタミン酸受容体である *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) 受容体依存性の nmdaLTP と、非依存性の non-nmdaLTP に分類される。海馬グルタミン酸作動性神経終末のシナプス小胞に存在する亜鉛は、LTP 誘導時に細胞外に放出され、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体活性化を介して細胞内に取り込まれ、LTP 発現に関与する。これまでに、亜鉛 (5 μ M) は nmdaLTP を促進する一方で、non-nmdaLTP には影響を与えないことを報告した。ストレス負荷などに伴い海馬グルタミン酸作動性神経が過剰興奮すると、シナプスでの亜鉛ホメオスタシスは変化する。今回、AMPA 受容体活性化を介した海馬細胞内亜鉛取込と CA1 LTP 発現との関係について AMPA 受容体アンタゴニスト (CNQX) を用いて検討した。また、電位依存性カルシウムチャネルブロックなどを介して海馬細胞内への亜鉛取込みを阻害すると考えられる塩化カドミウムの作用についても検討した。

【実験方法】

ラットから海馬スライスを作製し、亜鉛蛍光プローブ (ZnAF-2DA) を取込ませ、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて、塩化亜鉛、塩化カドミウム存在下、海馬 CA1 錐体細胞への亜鉛取込を検討した。また、海馬 CA1 領域で nmdaLTP ならびに non-nmdaLTP を測定した。

【結果および考察】

Schaffer 側枝を低頻度刺激 (0.033 Hz) し、LTP 誘導前における亜鉛取込を検討した。その結果、海馬 CA1 錐体細胞内亜鉛蛍光強度は塩化亜鉛 5 μ M 添加では増加せず、100 μ M 添加で有意に増加した。この増加は CNQX ならびに 100 μ M CdCl₂ 存在下で抑制された。一方、LTP 誘導前に塩化亜鉛 100 μ M を灌流すると、nmdaLTP は減弱したが、NMDA 受容体アンタゴニスト (APV) 存在下での non-nmdaLTP は減弱しなかった。塩化亜鉛 100 μ M 前灌流による nmdaLTP の減弱は CNQX を添加し、海馬細胞内への亜鉛取込を阻害することにより回復した。さらに、この回復は塩化カドミウム 100 μ M を塩化亜鉛と同時に灌流した場合にも見られた。カドミウムは細胞内亜鉛取り込みを阻害し、亜鉛による nmdaLTP 減弱を回復させることが示唆された。以上、AMPA 受容体活性化を介した海馬 CA1 錐体細胞への亜鉛取込が nmdaLTP の増強と減弱に関与することが示唆された。

【参考文献】

Takeda A, Suzuki M, et al., Differential effects of zinc influx via AMPA/kainate receptor activation on subsequent induction of hippocampal CA1 LTP components. *Brain Res*, 1354, 188-195 (2010).

低浸透圧処理アストロサイトから放出された亜鉛による

ミクログリアの活性化

○長澤一樹、西浦武志、大里侑希、谷 美咲、中村庄吾、瀬川将平、安田江里、西田健太郎
京都薬科大学 衛生化学分野

【目的】脳内免疫担当細胞であるミクログリアの過剰活性化は脳傷害を引き起こす。我々はこれまでに、このミクログリアの活性化に脳内情報伝達分子の一つである亜鉛が関与し、それは NADPH oxidase 活性化によるスーパーオキシドアニオンの産生及び DNA 修復酵素 PARP-1 の活性化を介したものであることを明らかにした。¹⁾ さらに、その活性化機構の詳細について検討した結果、亜鉛は ZIP-1 などのトランスポータを介してミクログリア内に取り込まれ、ヘミチャネルからの ATP の放出を促し、そしてその ATP が autocrine / paracrine 的にプリン受容体の一つである P2X7 受容体を活性化することが重要な過程であることを示した（投稿準備中）。一般に、脳細胞間隙に放出される亜鉛は、グルタミン酸作動性神経のシナプス前小胞からの分泌に由来するとされているものの、未だ不明な点が残されているのが現状である。そこで今回、ミクログリアを活性化する亜鉛の放出源としてアストロサイトに着目し、そのストレス負荷状態における亜鉛の放出について検討した。

【実験方法】アストロサイト及びミクログリアは定法に従い培養した。アストロサイトに対する低浸透圧処理は、種々の浸透圧に調製した生理的溶液（BSS）を用いて行い、その上清を採取したのち、加熱・遠心分離し、高張 BSS を添加することにより等張化した。その後、得られた上清をミクログリアに添加し、一定時間経過後にその活性化を評価した。アストロサイトへのストレス負荷は細胞外への ATP 放出により確認した。上清中の亜鉛濃度は ICP-MS により測定し、細胞内亜鉛は Newport Green (NG) を用いて検出した。ミクログリアの活性化は、その形態変化及び PARP 活性化の指標である PAR の生成に基づき評価した。

【結果及び考察】アストロサイトを低浸透圧処理することにより、細胞外への ATP 放出は浸透圧の低下に伴い増加したことから、アストロサイトに対してストレスの負荷されていることが確認された。低浸透圧処理アストロサイトから得られた上清をミクログリアに添加したところ、ミクログリアの形態変化及び PAR 蓄積が認められ、それは細胞外亜鉛キレート剤 CaEDTA を上清に添加することによりほぼ完全に抑制された。一方、アストロサイト細胞内における NG シグナルは低浸透圧処理により増強され、さらに低浸透圧処理アストロサイトから得られた上清中の亜鉛濃度は処理時間依存的に増加した。これらのことから、アストロサイトを低浸透圧処理することにより細胞外に亜鉛が放出され、それによってミクログリアが活性化されることが明らかとなった。これらの知見は、ストレス負荷された脳神経系において、アストロサイトから放出される亜鉛がそのミクログリアとの関連に重要な役割を担う分子であることを示している。

- 1) Kauppinen TM, Higashi Y, Suh SW, Escartin C, Nagasawa K, Swanson RA. Zinc triggers microglial activation. *J Neurosci*, **28**, 5827-5835 (2008).

カドミウムの排泄に関与する輸送体の探索

○井上敦仁、藤代瞳、姫野誠一郎
徳島文理大学 薬学部 衛生化学教室

【目的】カドミウム (Cd) は、Zn、Fe、Mn、Ca などの必須金属の輸送に関わる金属輸送体やチャネルを介して取り込まれることが報告されている。しかし、Cd の排泄機構については不明な点が多い。また本研究室では Cd 耐性細胞を用いた実験により、Zn を細胞外に排泄する唯一の輸送体である ZnT1 や、酵母において Cd とグルタチオンの複合体を液胞に輸送する輸送体である YCF1 (Yeast Cadmium Factor 1) の哺乳動物ホモログとして知られている MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) の発現が、Cd 耐性細胞で上昇することを見出している。しかし、ZnT1 や MRP が Cd 排泄に関与しているかどうかは不明である。そこで、本研究ではこれらの輸送体が Cd の排泄に関与しているかどうかを検討した。

【実験方法】HeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞、及び P⁻ (メタロチオネイン(MT)欠損マウス線維芽) 細胞を用いた。遺伝子の導入には Lipofectamine 2000 (invitrogen) を用いた。金属排泄効率は、金属添加 60 分後に培地を交換し、60 分後の細胞中金属濃度の減少率を測定した。金属濃度はトレーサーとして ¹⁰⁹Cd、⁶⁵Zn、⁵⁴Mn を用いて、γカウンターにより測定した。mRNA レベルは半定量的 RT-PCR 法、タンパク質レベルはウエスタンブロット法で測定した。

【結果および考察】HeLa 細胞に MRP1、MRP2 の全長遺伝子を導入したところ、mRNA 及び、タンパクレベルでの発現の上昇が見られた。また、Calcein-AM を MRP 高発現細胞に添加し、Calcein の細胞外排泄効果を蛍光光度法によって測定したところ、Calcein の排泄促進が確認できた。よって導入した MRP は細胞膜上に発現し、機能していることが確認された。この MRP 高発現細胞を用いて、Cd の排泄効率を比較した結果、MRP1、MRP2 のいずれを高発現させた場合にも、コントロール細胞とほとんど差は見られなかった。また、MRP 阻害剤 (MK571) の影響もみられなかった。このことから、MRP は Cd の排泄輸送に関与していない可能性が高いことが示唆された。一方、ZnT1 の mRNA レベルを上昇させるため、転写因子 MTF-1 を効率よく活性化する Zn 錯体 (Zn(4,7-Me₂phen)Cl₂ · 1/2H₂O) を MT が欠損している P⁻ 細胞に作用させた。Zn 錯体添加 12 時間後に Zn 及び Cd の排泄効率を検討したところ、無処理群より Zn 及び Cd の排泄効率が有意に亢進していた。しかし、Mn の排泄効率に対する影響はなかった。このことから、ZnT1 が Cd の排泄に寄与している可能性が示唆された。しかし、Zn 錯体の ZnT1 以外への作用が懸念されるため、今後は ZnT1 遺伝子を導入して ZnT1 を高発現させた系を用いて、Cd 排泄における ZnT1 の関与を検討する予定である。

Anion exchanger 1 のチオールが媒介するセレンの赤血球膜輸送

○ 北郷 真史、原武 衛、淵上 剛志、中山 守雄
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

【目的】有効なセレン(Se)供給源の一つである亜セレン酸(SA)は、赤血球(RBC)内で非酵素的に還元された後、血漿へ輸送され全身に分布する。しかし、RBC から血漿への SA 代謝物の RBC 膜輸送機構は未だ明らかにされていない。これまでに我々は、RBC 内における主要な Se 代謝中間体であるヘモグロビン(Hb)とグルタチオンのセレノトリスルフィド複合体(Hb-SSeSG)から、Hb と RBC 膜タンパクである Anion exchanger 1(AE1)の N 末端細胞質ドメイン(N-CPD)のシステイン(Cys)に Se が運搬されることを明らかにした。本研究では、Se の RBC 膜輸送における AE1 の Cys の役割を検討した。

【実験方法】RBC 膜の単離および膜中 Se 分布の測定：ヒト静脈血から単離した RBC に SA を加え 10 分間インキュベートした後、RBC 膜を単離した。単離した膜を α -キモトリプシン、NaOH、トリプシンで順次処理し、N-CPD および表在性膜タンパク、C 末端細胞質ドメイン(C-CPD)、膜貫通ドメイン(MD)に分離した後、各分画の Se 量を測定した。Se の定量：試料を硝酸-過塩素酸混液で湿式分解した後、2,3-ジアミノナフタレン法で測定した。

【結果および考察】AE1 は、N-CPD に Cys201 と Cys317、MD に Cys479 と Cys843、C-CPD に Cys885、計 5 つの Cys を有している。SA 処理後の RBC 膜中の Se の 70%は AE1 に結合しており、N-CPD だけでなく、MD や C-CPD にも検出された。次に、SA 処理した RBC から膜を単離した後、膜を封着(seal)し、血漿とインキュベートすると、膜中 Se の血漿への輸送が観察された。この時、N-CPD と MD の Se 量の減少が顕著であったことから、N-CPD の Cys に結合した Se は、MD を介して、血漿へ輸送されていることが示唆された。SA 処理後の RBC 膜から単離した N-CPD を MALDI-TOF 質量分析すると、セレノグルタチオン(GSSe)相当が付加した Cys317 含有断片のピークが検出された。すなわち、RBC 内で Hb から N-CPD に運搬された Se は、セレノトリスルフィドを形成していた。そこで、モデル化合物としてペニシラミンセレノトリスルフィド(PenSSeSPen)を用い、セレノトリスルフィドと AE1 の Cys との反応性を検討した。RBC 膜を PenSSeSPen とインキュベートすると、Se は AE1 の 3 つのドメインに結合することができた。また、膜中チオール含量は減少し、その減少量に相当する遊離の Pen が生成した。AE1 に結合した Se は、PenSSeSPen と膜中 Cys とのチオール交換 ($\text{Pen-SSeS-Pen} + \text{AE1-Cys-SH} \rightarrow \text{Pen-SSeS-Cys-AE1} + \text{Pen-SH}$) によりセレノトリスルフィドを形成しているものと考えられた。次に、*N*-エチルマレイミドで N-CPD の約 50%の Cys をアルキル化した後 PenSSeSPen とインキュベートすると、MD の Cys は未修飾であるにも拘らず、MD への Se の結合量は半減した。ヨードアセタミドを使って N-CPD の約 80%の Cys を修飾すると、MD への Se の結合はほぼ完全に抑制された。したがって、PenSSeSPen とのインキュベートにより MD に結合した Se は、MD の Cys と PenSSeSPen が直接反応したのではなく、N-CPD から MD に移行したものと考えられた。以上の結果より、セレノトリスルフィドとして AE1 の N-CPD に結合した Se は、MD の Cys とのチオール交換により RBC 膜を透過し、血漿へ輸送されると考えられた。

遺伝子ノックダウン導入細胞内の銅の解析

○小椋康光^{1,2}、宮山貴光^{1,3}昭和薬科大学¹ 衛生化学、²ハイテクリサーチセンター³ 日本学術振興会特別研究員

【目的】銅は、lysyl oxidase や superoxide dismutase (SOD1)などに要求される必須元素であるが、遊離の銅イオンは毒性が高いため、生体は銅に対し、厳密な制御機構を有していると考えられており、近年、その一端が明らかとなってきた。すなわち銅イオンは細胞内への流入から、分配、利用、排泄に至るまで、その挙動を制御するタンパク質が存在していることが示されてきた。銅代謝におけるこれらタンパク質の機能を解析する場合、細胞外の銅濃度を銅キレート剤や銅の添加により、細胞外環境の変動を細胞内の銅の栄養状態へ反映させる手法が用いられているが、厳密な制御下にある細胞内の銅の挙動を変動させることは困難であり、期待通りの効果を得ることが難しい。そこで我々は、RNA 干渉法を用いて、銅の代謝に関わる制御因子のいくつかを knockdown し、細胞内の銅の栄養状態を遺伝子レベルで変動させ、解析を試みた。解析手法として、一般的な分子細胞生物学的手法に加え、細胞内の銅の分布を 1 価の銅に特異的な蛍光プローブである CS1 を用いた元素イメージング及び細胞内の銅の化学形態を解析するスペシエーションも併せて行った。

【実験方法】先天的に肝臓内に銅を蓄積する犬種 Bedlington terrier において、その原因遺伝子が COMMD1 であることが近年同定された。COMMD1 [copper metabolism gene MURR1 (mouse U2af1-rs1 region 1) domain 1]の銅代謝における役割を解明するため、マウス肝がん細胞 Hepa 1-6 の COMMD1 を knockdown し、COMMD1 の機能解析を行った。

【結果および考察】COMMD1 の knockdown により、細胞外への銅の排泄が低下し、結果として細胞内での銅の蓄積が起こった。蓄積した銅の約 80 %は細胞質に分布し、細胞質中に存在する主要な 2つの銅結合タンパク質である SOD1 とメタロチオネイン (MT) のうち、MT に選択的に結合していた。銅のイメージングにおいても、この結果を支持し、細胞質中の蛍光量が増大していた。細胞内の銅制御因子のうち銅の排泄に関わる Atp7b の発現が、COMMD1 を knockdown することにより低下していた。さらに細胞内銅濃度の上昇によって一旦は細胞膜側へ移行した Atp7b は銅の濃度の低下とともに再びゴルジ体側へ再移行するが、COMMD1 の knockdown によって、ゴルジ体側への再移行が阻害された。これらのことから、COMMD1 は Atp7b と相互作用することにより、銅の排泄に関与していると想定された。すなわち、COMMD1 は細胞膜とゴルジ体間の Atp7b の recruitment を担っていると考えられた。

【参考文献】

- T. Miyayama, D. Hiraoka, F. Kawaji, E. Nakamura, N. Suzuki, Y. Ogra: *Biochem. J.* (2010) **429**, 53-61
T. Miyayama, K.T. Suzuki and Y. Ogra: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2009) **237**, 205-213
T. Miyayama, Y. Ogra, Y. Osima and K.T. Suzuki: *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) **390**, 1799-1804
T. Miyayama, Y. Ogra and K.T. Suzuki: *J. Anal. At. Spectrom.* (2007) **22**, 179-182

カタクチイワシ由来セレン含有物質の分離分析

○吉田 さくら, 原武 衛, 淵上 剛志, 中山 守雄
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

【目的】必須微量元素セレンは肉類, 魚介類, 卵類, 穀類などに多く含まれており, 日本人は1日に摂取するセレンの半分以上を魚介類から得ていると報告されている¹。そこで, 日本人にとって馴染み深い食材であり, セレンを比較的高濃度に含んでいるカタクチイワシに注目した。我々は以前に, 煮干カタクチイワシおよび煮干だし由来セレンは, セレン欠乏マウスの肝臓中セレン濃度, およびセレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ活性を改善するのに, 亜セレン酸と同等の効果を示すことを報告している²。本研究では, カタクチイワシに含まれるセレン含有物質の同定を目的として, 煮干だしに含まれる成分の分離分析を行った。

【実験方法】煮干約3 gに精製水30 mLを加えて加熱し, 10分間煮沸して煮干だしを作製した。試料を硝酸—過塩素酸混液で湿式分解後, 2,3-diaminonaphthalenを用いてセレンを定量した。MALDI-TOF質量分析は, マトリックスとして sinapinic acid または α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid を用い, Ultraflex (Bruker Daltonix)により行った。

【結果および考察】凍結乾燥した生のカタクチイワシおよび煮干には, セレンがそれぞれ $1.35 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$, $1.21 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 含まれていた。カタクチイワシは, 95°C で3-4分間煮沸した後, 乾燥して煮干に加工される。煮干だし中セレン濃度は $0.10 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ であり, 煮干中セレンの約8%が抽出されていた。煮干だしを分画分子量が5 kDaのフィルタを用いて限外ろ過すると, 煮干だし中セレンの87.3%がろ過され, 煮干だし中セレン含有物質の多くは分子量5,000以下であることがわかった。次に, イオン交換体の中性塩分解能を利用して煮干だしを分離した。この分離条件では, イオン性物質だけではなく, 中性条件では解離しにくい両イオン性物質もカラムに保持される。まず, OH形強塩基性陰イオン交換体 Q Sepharose [$\text{P-N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{OH}$]に煮干だしを負荷し, Milli-Q水を通液すると, 負荷したセレン量の5.7%が溶出し, 94.3%はカラムに保持された。その後, カラムに0.1 M HClを通液すると, 46.1%のセレンが溶離し, 残りの約50%はカラムに保持されたままであった。この時カラムに負荷されたアミノ酸およびタンパク量の80%以上が回収された。したがって, カラムに残ったセレンの多くは, アミノ酸やタンパクとは異なる, 有機セレン含有物質に由来するものと考えられた。Q Sepharoseカラムに保持されなかった画分を, H形強酸性陽イオン交換体 SP Sepharose ($\text{P-SO}_3 \cdot \text{H}^+$)に負荷し, Milli-Q水を通液すると, セレン量の2.4%がカラムに保持されずに溶出した。この画分には非イオン性セレン含有物質が含まれると考えられた。続いて, 0.1 M NaOHを通液し SP Sepharoseに保持された陽イオン性物質を溶離すると, ほぼすべてのセレンが回収された。以上の結果から, 煮干だしには, 分子量, イオン性の異なる複数のセレン含有物質が含まれており, その中には, 非タンパク性の有機低分子セレン含有物質が多く含まれていると考えられた。

【参考文献】

- 1) Miyazaki, Y., et al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **50**, 309-319 (2004)
- 2) Haratake, M., et al., *J. Health Sci.* **53**, 457-463 (2007)

核内のリン酸アニオン-カチオン特異的相互作用—IP6とスペルミン

○小谷 明, 小川数馬, 黄檗達人, リナタ ジャストラザブ, レコスラフ ロモジク

金沢大学薬学系・ポーランドアダムミツケビッチ大学化学部

【序論】 核酸はアニオンであり, Mg^{2+} 等の金属イオンやポリアミンのカチオンによる安定化が必須である. イノシトール六リン酸(IP6)とポリアミンは核内に多く存在し. 核酸との相互作用等アニオン-カチオン間相互作用を通して, HIVの侵入等様々な機能への関与が推定されている. そこで, IP6とポリアミンの1種である4Nを有するスペルミン(spm)間のアニオン-カチオン相互作用について, pH滴定を用いた会合体の安定度定数と, P-NMRから推定されるIP6構造から検討を加え, 相互作用特異性について金属イオンとは異なる性質, 特異性があることが判明した.

【実験方法】 pH 滴定は $20^{\circ}C$, $I=0.1(Et_4NClO_4)$ 下, IP6-12H : スペルミン spm = 1:1, 1:0, 0:1 にて Et_4NOH を用いて行い, プログラム SUPERQUAD より安定度定数 β_{pqr} を求めた. P-NMR は同様に, $I = var.$ にて行った. $pIP_6 + qspm + rH \rightleftharpoons IP_{6_p}spm_qH_r$, $\beta_{pqr} = [IP_{6_p}spm_qH_r] / ([IP_6]^p [spm]^q [H]^r)$

【結果および考察】 IP6-spm 会合体の安定度定数 1:1 会合体 $IP_6-spm-H_5$ はプロトン数 2-9 を有する会合体種が計算された. 各会合体種の会合定数 $\log K$ は, H 数 $S = 6$ で極大 7.4 を, 両端 $S = 2, 9$ で極小 4.3, 5.5 を示した. 相互作用が最も強い状態は IP_6-4H , $spm-2H$ であり, IP6 は隣接リン酸基同士が水素結合 $OPO(O^-)-OH \cdots O^+P(O)_2$ を形成しているときに最も相互作用が強く, プロトンがないとき $OPO(O^-)-O^-$ や, プロトン化リン酸 $OPO(OH)_2$ のときは相互作用が弱いことが判明した. このことは金属イオンの配位結合同様, $NH_3^+ \cdots O^+P(OH \text{ or } O^-)O_2$ を含むスペルミン spm の多点相互作用(Fig. 1)に水素結合キレート環形成によるリン酸の固定化が重要であることを示している.

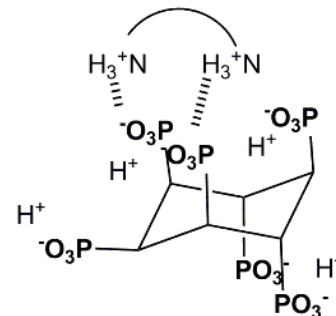


Fig. 1. Possible IP6-spm interaction

IP6-spm 会合体の IP6 構造 IP6 は高 pH の 5aq1eq から

IP_6-4H^+ 付近で 5eq1ax コンフォメーションが安定になり,

$5aq1eq \rightleftharpoons 5eq1ax$ 平衡のため, P31-ピークがブロードになる. IP6-spm 会合体では, ピークがブロードになる pH が IP6 単独より 0.5 高く, IP6 が 5eq1ax よりも 5aq1eq でスペルミン spm との相互作用(Fig. 1)が有利なことが示された. これは, 5eq1ax では, 前述の水素結合によりリン酸基の相互作用部位として電荷を有しない $P=O$ しか使えないためと想定され, リン酸負電荷が相互作用基に向くことが大切なことが示唆された.

【結論】 $OPO(O^-)-OH \cdots O^+P(O)_2$ への水素結合を含む静電的相互作用がスペルミンに認められた. このような架橋型リン酸基への特異的相互作用は, Na^+ や K^+ 等の金属イオン-IP6 系では認めておらず, ポリアミンカチオンが核酸のリン酸アニオンの安定化に必要なことを示している.

O-13

Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain

○Kyoko Itoh¹, Shingo Kato¹, Yutaka Yoshikawa², Hiroyuki Yasui², Kenji Yamamoto³, Shinji Fushiki¹

¹Department of Pathology and Applied Neurobiology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

²Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan

³The International Clinical Research Center, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

Abstract

Quantum dots (QDs) are well-known for their potential application in biosensing, *ex vivo* live-cell imaging and *in vivo* animal targeting. The brain is a challenging organ for drug delivery, because the blood brain barrier (BBB) functions as a gatekeeper guarding the body from exogenous substances. Here, we evaluated the distribution of bioconjugated QDs, i.e., captopril-conjugated QDs (QDs-cap) following intraperitoneal injection into male ICR mice as a model system for determining the tissue localization of QDs, employing ICP-MS and confocal microscopy coupled with spectrometric analysis. We have demonstrated that intraperitoneally administered QDs-cap were delivered via systemic blood circulation into liver, spleen, kidney and brain at 6 hours after injection. Although QDs-cap were located predominantly inside the blood vessels in liver, kidney and brain, but a few were distributed in the parenchyma, especially noteworthy in the brain. Careful studies on acute as well as chronic toxicity of QDs in the brain are required prior to clinical application to humans.

References

- [1] Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K 2007 *J. Artif. Organs* **10** 149
- [2] Manabe N, Hoshino A, Liang Y Q, Goto T, Kato N, Yamamoto K 2006 *IEEE Trans. Nanobiosci.* **5** 263

天然ポリウロン酸類を用いた亜鉛複合体の合成と薬理活性

○舘 祥光^{*1}、前岡 嘉晃¹、吉川 豊²、安井 裕之²、森本 善樹¹¹大阪市立大学大学院理学研究科、²京都薬科大学代謝分析学分野

【目的】生体高分子(タンパク質、核酸、脂質、多糖類等)と金属は互いに相互作用をすることで、様々な機能を発揮していることが知られている。これらの相互作用、機能、構造の解明により、生体機能の仕組みを理解し、テーラーメイド・予防医療の実現や画期的な新薬、新素材の開発をはじめとした幅広い分野での産業への応用が期待されている。

今回我々は、天然多糖類の中でも可溶性であるポリウロン酸に着目した。ポリウロン酸はキノコ(菌)類、藻類、被子植物、細胞外マトリクスなどに広く分布している。ポリウロン酸には、各々の単糖類の1級水酸基がカルボン酸に酸化された構造のウロン酸(uronic acid)ユニット、例えばガラクトツロン酸(galacturonic acid)、グルクロン酸(glucuronic acid)、等が含まれている。(図1)これら一連のポリウロン酸と金属イオン特に亜鉛(Zn^{2+})との相互作用の解明および薬理活性の開発を目的とした。

【実験方法】水溶液中でポリウロン酸を塩基で処理して溶解させ、 $Zn^{II}SO_4$ を反応させて、 Zn^{II} 複合体を調製した。調製したポリウロン酸- Zn^{II} 複合体中の Zn^{II} 含有率をICP発光分析により求め、ポリウロン酸- Zn^{II} の相互作用に関して検討した。また同様に水溶液中でウロン酸を $Ba^{II}(OH)_2 \cdot 8H_2O$ で処理して、 $Zn^{II}SO_4$ と反応させ、 Zn^{II} 錯体を調製した。得られた Zn^{II} 錯体は各種分光法によりキャラクタリゼーションを行った。この Zn^{II} 錯体とポリウロン酸- Zn^{II} 複合体を比較して複合体の金属配位構造に関して検討した。¹⁾

【結果および考察】ポリウロン酸- Zn^{II} 複合体の Zn^{II} 含有量と調製時の Zn^{II} 濃度のプロットから、 Zn^{II} 複合体の形成挙動を解析し、結合定数 K_A などのパラメータを求めた。また、ウロン酸を配位子に用いた Zn^{II} 錯体の構造を分光学的に検討した結果、ウロン酸- Zn^{II} 錯体の配位様式を決定した。¹⁾さらに、 Zn^{II} 複合体の*in vitro*における遊離脂肪酸(FFA)阻害活性の測定を行い、²⁾一連のポリウロン酸- Zn^{II} 複合体およびウロン酸- Zn^{II} 錯体に関する構造-活性相関について検討した結果を報告する。

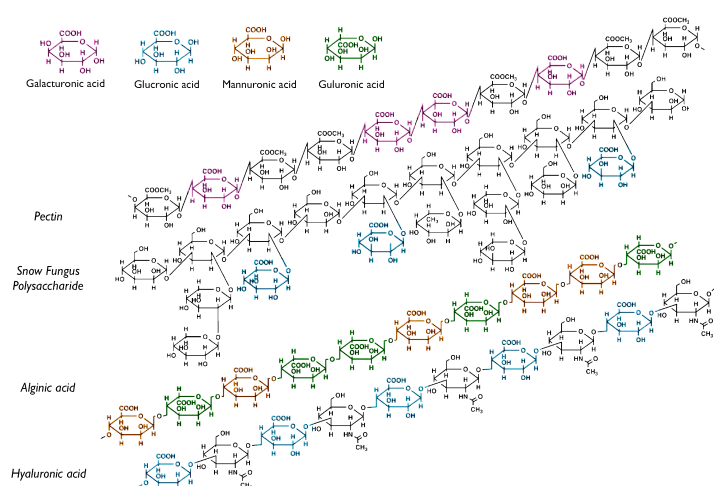


図1.ポリウロン酸類と構成ユニットウロン酸の構造

【参考文献】

- 1) 前岡、吉川、安井、森本、舘、第59回錯体化学討論会、1PA-035.
- 2) 前岡、吉川、安井、森本、舘、第90春季年会、2C1-011

制がん活性を有するアゾラト架橋白金(II)二核錯体

○米田誠治¹ Yuh-Lin Ling² 鈴木俊宏³ 植村雅子¹ 千熊正彦⁴

鈴鹿医療科学大学 薬学部 物理系薬学分野

Fu-Jen Catholic University, Basic Science Faculty

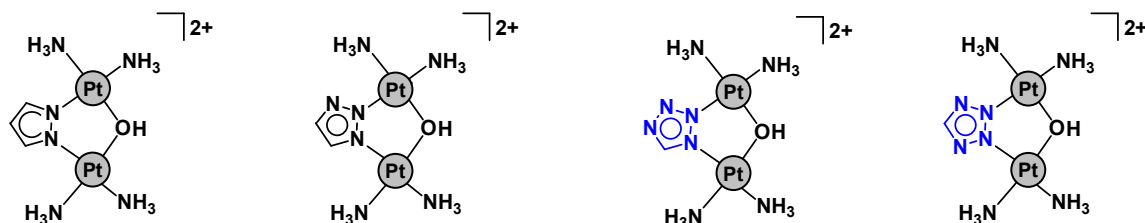
明治薬科大学 薬学部 健康・環境薬学系

大阪薬科大学 薬学部

【目的】シスプラチンに代表される白金制がん剤は臨床で広く用いられており、その薬理効果は DNA との共有結合性相互作用に起因すると考えられている。本研究では、化学療法に対して感受性が低いがんに対する治療効果の増大とシスプラチン交叉耐性の克服を念頭に、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体 ($[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-tetrazolato})]^{2+}; 5\text{-H-N1,N2}$ および 5-H-N2,N3) の分子設計を行った。そして、これらの錯体の DNA との相互作用様式および制がん活性を検討し、アゾラト架橋白金(II)二核錯体の創薬基盤の構築を試みた。

【実験方法】テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の 9-Ethylguanine(9-EtG) との相互作用様式について、NMR 分光法を用いて解析を行った。また、H460 ヒト非小細胞肺癌細胞に対する *in vitro* 増殖抑制活性を測定した。さらに、H460 肺癌細胞および Panc-1 ヒト膵がん細胞移植ヌードマウスにおける *in vivo* 抗腫瘍活性の検討を行った。

【結果および考察】トリアゾラト架橋錯体である AMTA が 9-EtG と反応する際に、ウェルナー型錯体としては非常に珍しい白金原子の転移反応が観測されたが^[1]、テトラゾラト架橋錯体についても同様の転移反応が確認され、2つの構造異性体 5-H-N1,N2 と 5-H-N2,N3 は、同一の 9-EtG 錯体を生成する。ほとんどのテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体は、シスプラチンと同程度かそれよりも高い *in vitro* 増殖抑制活性を示し、シスプラチン耐性がん細胞に対しても顕著な増殖抑制活性を発揮した。また、 5-H-N1,N2 は H460 肺癌および Panc-1 膵がん移植ヌードマウス実験においても、顕著な *in vivo* 抗腫瘍活性が認められた。これらのことから、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体は次世代白金制がん剤として、その臨床応用が大いに期待される。



AMPZ

AMTA

5-H-N1,N2

5-H-N2,N3

Fig. 1. The structures of azolato-bridged dirhodium(II) complexes.

【参考文献】

- [1] S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J Am Chem Soc* 2002, 124, 4738.

アルブミンへのセレノシステインの導入による グルタチオンペルオキシダーゼ擬似体の合成

○坂野 綱則、淵上 剛志、原武 衛、中山 守雄

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

【目的】グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は、グルタチオン(GSH)を利用して多種の過酸化物の還元反応を触媒する抗酸化酵素である。GPxは生体内の活性酸素種を消去し、酸化的傷害から細胞を防御している。GPxの活性中心にあるセレノシステイン(Sec)は、終止コドンのUGAによりコードされており、他のアミノ酸とは異なる特有の翻訳システムで発現するため、遺伝子工学的的手法によるSec含有体の作製は極めて困難である。また、これまでに多くの低分子性のGPx擬似体が作製されてきたが、その活性はGPxに比べて著しく低く、高い活性の発現には高次構造を有することが重要であるとする報告もある。本研究では、高分子性GPx擬似体の作製を目的として、化学的手法によりアルブミンにSecを導入したタンパク性分子の合成を企図した。

【実験方法】L-ペニシラミン(Pen)保護セレノシステイン-マレイミド誘導體(Pen-Sec-NCMM)の合成：L-セレノシスチン(SeCyst)のカルボキシル基をエステル化し、Boc-Pen-OMeとのチオール交換反応によりPenで保護したSecを得た後、N-carboxymethyl maleimide(NCMM)とをカップリングさせた。その後、トリフルオロ酢酸を用いてBoc基を脱保護し、Pen-Sec-NCMMを得た。Sec含有HSAの合成：市販のヒト血清アルブミン(HSA)をジチオスレイトールで還元処理した後、0.01 Mリン酸緩衝液(pH 7)中、室温でPen-Sec-NCMMと反応させた。Seの定量：試料を硝酸-過塩素酸混液で湿式分解した後、2,3-ジアミノナフタレン法で測定した。MALDI-TOF MS分析：HSA誘導體をトリプシン消化し、Cys34を含む断片を、Ultraflex(Bruker製)で分析した。GPx様活性の測定：Se濃度10 μM に調製した試料にGSHとGSHリダクターゼを加え、過酸化水素を基質として、波長340 nmにおけるNADPHの吸光度の減少から算出した。

【結果および考察】HSAは、そのペプチド鎖の34番目に唯一の遊離システイン(Cys34)を有している。本研究では、Cys34のチオールを介してHSA分子へのSecの選択的な導入を試みた。まず、SeCystのカルボキシル基をエステル化し、その両端の α -アミノ基を介してマレイミドを導入し、SeCyst-di-NCMMを合成した。SeCyst-di-NCMMとHSAとの反応生成物をMALDI-TOF質量分析すると、SeCyst-di-NCMMの半分の分子量が増加したCys34含有断片のピークが確認された。つまり、マレイミドによるCys34のチオールのアルキル化は進行せず、セレネニルスルフィド結合(-Se-S-)によりSecが導入されていた。この導入様式では、GPx様活性の発現は期待できないため、ジセレナイド部位(-Se-Se-)のないSec含有マレイミド誘導體を設計した。エステル化したSeCystのジセレナイドとBoc-Pen-OMeとのチオール交換によって、Pen保護Secを合成した後、酸アミド結合を介してマレイミドを導入し、Pen-Sec-NCMMへ誘導した。Pen-Sec-NCMMとHSAの反応物を同様に質量分析すると、Pen-Sec-NCMMの分子量が増加したピークが観察された。また、Seの分析の結果から、HSA 1分子にSe 1原子が付加したことを確認した。これらの結果より、Cys34とマレイミドの反応によりSecが特異的にHSAに導入されていることが示された。得られたSec含有HSAのGPx様活性を測定すると、遊離のSeCystのそれに比べて増大した。

酸化型ウマシトクロム *c* の多量体形成とポリマー化

○廣田 俊¹、服部洋子¹、長尾 聡¹、竹田 翠²、小森博文²、上久保裕生¹、
根木 滋³、杉浦幸雄³、片岡幹雄¹、樋口芳樹²

¹奈良先端院大物質創成、²兵庫県大院生命理学、³同志社女子大薬

【目的】シトクロム *c* (cyt *c*) は生体内の呼吸鎖で電子伝達を担うヘムタンパク質である。cyt *c* は単量体の状態で電子を伝達するが、多量化することが 50 年程前から知られており、75°C で 12 時間加熱することでアミロイド線維を形成することも報告されている。しかし、cyt *c* 多量体の構造や形成機構は長らく不明のままである。本研究では cyt *c* の 2~4 量体を作製、精製し、各多量体の構造と熱力学的性質を調べ、cyt *c* の多量体形成機構を初めて明らかにした。

【実験方法】酸化型ウマ cyt *c* 多量体を作製後、ゲルろ過クロマトグラフィーを繰り返し行い、cyt *c* 単量体、2~4 量体、約 40 量体を精製した。cyt *c* 単量体、2~4 量体、約 40 量体の活性部位と二次構造をそれぞれ吸収および CD スペクトルにより調べた。cyt *c* 2 量体と 3 量体の結晶構造と溶液構造をそれぞれ X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱測定により調べた。示差走査熱量測定により cyt *c* 2~4 量体の熱安定性を調べた。

【結果および考察】cyt *c* 2~4 量体や 40 量体では、活性部位構造や二次構造はそれぞれ似ているが、単量体の構造とは若干異なることが、吸収スペクトルや CD スペクトルにより明らかになった。鉄-メチオニン(Met) 結合に由来する 695 nm の吸収帯は、酸化型 cyt *c* の単量体で観測されたが、cyt *c* 2~4 量体では強度が著しく減少し、cyt *c* 2~4 量体では鉄-Met 結合が解離していることが示唆された。X 線結晶構造解析により、cyt *c* 2 量体および 3 量体は各 cyt *c* モノマーユニットの C 末端の α ヘリックスが外れ、この領域が別の分子の対応する部位に結合するドメインスワッピング構造を有することが判明した。結晶中の cyt *c* 2 量体および 3 量体の構造では、鉄-Met 結合が解離しており、代わりに OH⁻ がヘムに配位していた。また、X 線溶液散乱測定により、水溶液中の cyt *c* 2~4 量体は多量体数の増加とともに鎖状に連なって伸びた構造をしていた。示差走査熱量測定により、cyt *c* 2~4 量体はすべて約 58 °C で単量体に解離し、各多量体が単量体に解離するとき、モノマーユニット当たり約 20 kcal/mol のエネルギーが放出された。このエネルギーには、多量体の解離に伴い、Met がヘムに再配位することによる安定化エネルギーが大きく寄与すると推測された。

以上より、cyt *c* 2~4 量体と 40 量体付近の多量体のヘム配位構造と二次構造はそれぞれ類似しており、酸化型ウマ cyt *c* は C 末端領域が連続的にドメインスワッピングし、タンパク質が鎖状に連なってポリマー化すると推測された。

【参考文献】

- 1) Shun Hirota, Yoko Hattori, Satoshi Nagao, Midori Taketa, Hirofumi Komori, Hironari Kamikubo, Zhonghua Wang, Isao Takahashi, Shigeru Negi, Yukio Sugiura, Mikio Kataoka, Yoshiki Higuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12854-12859 (2010).

プリオン蛋白断片ペプチドのコンフォメーション変化と

神経毒性に及ぼす微量金属の影響

○川原正博、小山裕也、定金豊

九州保健福祉大学 薬学部 分析学講座

【目的】プリオン病は、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病、クールー病、牛では牛海綿状脳症(BSE)などの形をとる伝染性神経疾患であり、脳内の正常プリオン蛋白(PrP^{C})が、外界から侵入してきた異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})によって、そのコンフォメーションが β シート構造へ変化してアミロイド構造をとる結果、難溶化、蓄積することが発症につながると考えられている。プリオン蛋白はCu結合蛋白であり、Cuホメオスタシスの異常と発症との関連も注目されている。演者らは、 β シート構造を持ち金属結合能を持つ断片ペプチド PrP106-126 を合成し、そのコンフォメーション変化と神経毒性に対して Cu, Zn などの金属が及ぼす影響について検討した。

【実験方法】 PrP106-126 は、固相法により合成し、HPLCにて精製を行った。ラット海馬初代培養神経細胞に対して PrP106-126 を投与し、LDH法により神経細胞死を測定した。また、 β シート構造に結合して特異的な蛍光を示す thioflavin T、CDスペクトル解析により β シート構造含量の定量化を行い、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて重合したアミロイド線維の形態観察を行った。

【結果および考察】 PrP106-126 の水溶液に対して aging、すなわち 37°C で数日間の incubation を行うことによって、 β シート構造の含量が増加するとともに、神経毒性も増強されることが判明した。また、aging 処理後の PrP106-126 溶液の雲母板上にける形態を AFM により観察した結果、直径 1~2nm の細線維構造が観察された。そこで、この aging 過程において Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} などの金属イオンを共存させた結果、 Zn^{2+} と Cu^{2+} によって細胞毒性は有意に減少した。一方、thioflavin T 法により β シート構造形成に与える影響を調べた結果、 Cu^{2+} は特に強く β シート構造形成を阻害した。また、AFM観察により、形成されたアミロイド線維の太さが Cu^{2+} や Zn^{2+} の共存によって有意に減少することも判明した。さらに、金属キレート能を持つ carnosine (β -alanyl histidine) が PrP106-126 の β シート構造形成を阻害し、神経毒性を抑制することも判明した。

これらの結果は、プリオン病の発症において Cu, Zn などの金属が関与していることを示唆するものであり、プリオン病の予防・治療薬開発につながる結果である。

【参考文献】

- 1) Masahiro Kawahara, Midori Negishi-Kato, Yutaka Sadakane, *Expert Rev Neurother*, **9**, 681-93 (2009).
- 2) Yutaka Sadakane, Keiko Konoha, Masahiro Kawahara, Kazuya Nakagomi, *Chem & Biodivers*, **7**, 1371-1379 (2010)
- 3) Masahiro Kawahara, Keiko Konoha, Tetsuya Nagata, Yutaka Sadakane, *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2**, 145-149 (2007)