



国立循環器病センター研究所先進
医工学センター循環動態機能部
長/厚生労働省指定型ナノメディ
シン・プロジェクト ナノデバイス
主任研究者

すぎまち・まさる
1959年、佐賀市生まれ。
1984年、九州大学医学部卒業。
1992年～、国立循環器病センター
研究所・血行動態研究室長。
2004年～、同循環動態機能部長。
現在に至る。
専門：循環器内科、生体医工学。
研究テーマ：循環バイオニック医
学。

1) ナノデバイス治療の必要性

杉町 圖実は治療に使うようなデバイスというのは、形としてはナノにはなりようがありません。ですから、そのなかに使われている技術としてナノテクノロジーを使っていこうということがナノデバイスの1つの方向性です。

ナノを押し進めるにあたって、厚生労働省として何を目標に進めていくかは、やはり医療に結び付いていくものだろうと思います。そういった意味で、われわれは、最終的には疾患の治療に使える、できる限り小さなデバイスをつくることだと思います。そして、そのなかにナノテクノロジーで開発した技術を入れていくことをめざしています。

なぜデバイス治療が必要かといいますと、重症慢性疾患の治療には、薬に加えて、治療機器を植え込んで長期間持続的な治療をおこなうことが必要になるであろうということが、1つのポイントです。

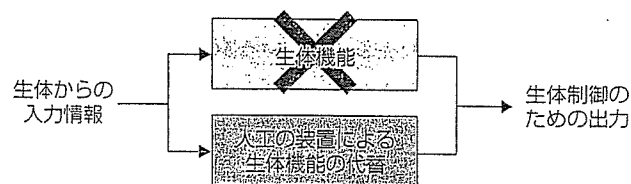
2番目は、このような植え込み機器はできるだけナノデバイス化したほうが侵襲が少なくなるわけですが、その実現に必要な技術として、できる限り小さい回路で通信を効率的におこなうということ、また生体燃料電池などを用いた電源の小型化の問題があります。そして、わが国が得意とする半導体技術の応用として、回路のできる限りの微小化、省電力化もポイントとなってきます。さらにそれらに加えてどんな治療をおこなうかということもポイントになってきます。これは、植え込み治療機器を植え込んでしまうと勝手に作動するわけだから、ある程度、自動的あるいは自律的な治療の論理が必要であるということです。

2) バイオニック治療論理

杉町 圖実は、この自律治療ということの論理をわれわれは以前から開発しており、「バイオニック治療論理」と名づけています。たとえば、起立性低血圧がひどい方で、起きただけで血圧が下がってしまうという方の血圧安定化、あるいは慢性心不全の調節異常というものを是正する、などの治療ができるようになります。

現在は、ペースメーカーのようなかたちで心臓から

喪失した生体機能の代替



異常化した生体機能の是正



図② バイオニック医学
(杉町勝先生よりご提供)

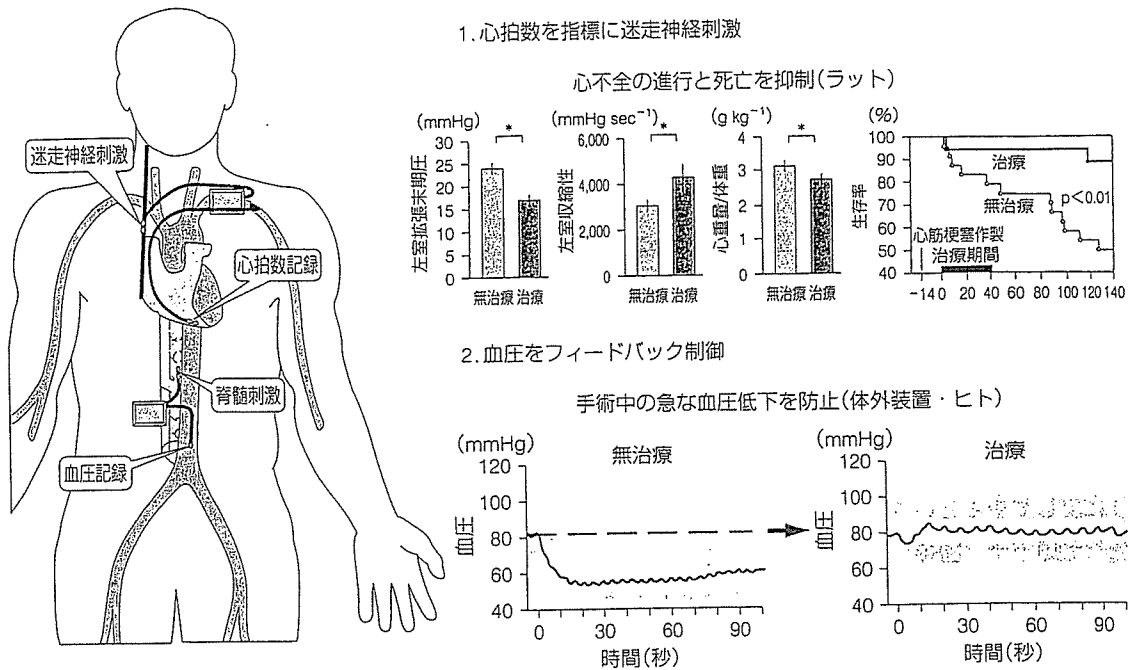


図4 ナノ化すべきデバイス：循環治療バイオニックデバイス (杉町勝先生よりご供与)

データを取り神経を刺激する、あるいは血圧を測定して脊髄を刺激するといったものをつくっている段階です。まず、迷走神経を刺激することによって慢性心不全の調節異常を改善するという方法では生存率の飛躍的な改善がみられておりますし、また、血圧を感知して脊髄を刺激するという方法では、たとえばヒトでも、手術中に血圧をピタリと安定させるということができています (図 2)。

3) ナノデバイスの開発状況

杉町 図 これらに必要な技術として、われわれは東北大学大学院工学研究科の西澤松彦先生と共同で生体燃料電池を開発しておりますが、燃料電池でも、生体の材料だけを使うということをめざしています。そうしますと、基本的には酵素ですので、体温で動きます。これは容易に想像できることですが、グルコースを酸化して電力を得るということなのです。

ある程度の電力の確保の見通しが立ってきたので、現在、さらに改良を進めているのですが、問題は起電力がやや低いということ、また、やはり電極が小さいので、

非常に内部抵抗が大きく、電流が取れないということですね。当然、酵素の安定性などということも問題になってきます。ところが、こういったものは通常の電池の溶液を入れる部分がなくて良いので、実際のところ、非常に小型化はできるはずだと考えています。

次に、通信に関しましては、最近、携帯電話などで使われている周波数拡散通信というものをもっと高度にした UWB (Ultra Wide Band) 通信を今後使う予定にしています。これを使いますと、電力が少なくてすみ、隣りに同じような通信があっても干渉せず、そして情報がたくさん伝えられる、という3つの特徴があります。

生体内では電波を容易に吸収するという問題、あるいは、生体内のいろいろな境界領域で反射が起こるという問題がありましたが、検討した結果、5 cm 程の距離であれば通信できますので、たとえば心臓と神経の間といったように、ある程度の距離の通信は可能であろうという見通しが立っています。

また、回路自体をどのようにして小さくしていくかですが、先ほどの電池の技術と通信の技術ができれば、ペースメーカーなども回路自体はある程度小さくできるとい

う見通しが立っています。カスタムメイドでなく既存のものでも約7mm角ぐらいにはできると考えています。最近はやりの心臓再同期療法もこれで可能となり、好きなところにペースメーカーを置き、ペースングができるということが、できるようになるだろうと思います。

治療論理に関しては、先ほどいいましたが、生体自体も自分自身から情報を得て、それに応じて調節をしているわけですが、たとえば、起立性低血圧の場合には、生体機能がはたらかないという点を人工の装置で代わりにおこなう装置、逆に、慢性心不全のような場合には、生体機能はありますが異常になっているので、ある程度正常のほうに戻してやるということを自動的におこなう装置を開発しています(図③)。

植え込み治療機器はできる限りナノデバイス化し、治療につなげていくことが求められています。現在、さまざまな必要な基盤技術を開発中です。そして、肝心の治療の論理も同時に開発中であり、これらを合体させていこうと考えています。

菅 ありがとうございます。ご質問はございますか。

盛 植え込み型のナノデバイスを使った場合に、患者さん自身が制御装置をオンにする、オフにする、といったような操作をしなければいけない事態が生じるのではないのでしょうか。血管外の組織のどこかにあるデバイスを制御する方法として、次のような方法が思い浮かびます。舌下錠のようなものを飲む、粘膜から吸収されて血管の中に入って組織へたどり着き、血管外のデバイスに何らかの作用をするという方法です。このような制御手段として、ナノマテリアルが必要となってくるのではないのでしょうか。

そのような「制御」という局面でのナノマテリアルが、杉町先生のこのナノデバイスの治療システムにおいては今後、大事な役割をしてくると考えますが、いかがでしょうか。

杉町 そうですね。ある意味、DDSとの融合という形になるのだろうと思います。指令をおこなうのに、現在、想定しているのは、確かに電波という物理的な方法ですが、いろいろな方法がありうると思います。たとえば、化学的な指令を与えるという方法もあるでしょうし、

あるいは、極端にいうと、遺伝子治療との組み合わせということになってくるのかもしれない。

盛 電波は遠くから飛ばせるという利点がありますが、反対に、悪意の人からの電波が飛んできたり、誤った電波が飛んでくると誤作動するという危険性があるため、やはり最後のところで、患者さん自身が自分の体調をみながら、システムを操作する安全弁がいるのではないかと思います。そのため、やはりナノマテリアルやナノDDSと先生のこのプロジェクトの融合という側面を促進する必要が出てくるのではないかと思います。

杉町 そうですね。大変貴重なご意見だと思います。

馬場 この研究を進めるにあたって、1番のネックとなっているのはどんなことでしょうか。

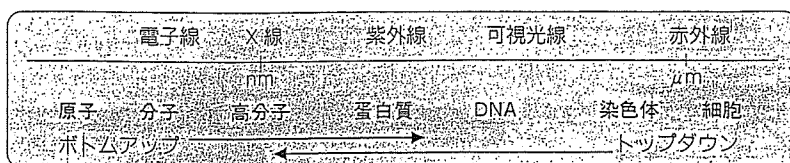
杉町 1番ネックとなっていることの1つは、企業との連携だと思います。ナノメディシン・プロジェクトでも、課題の1つとして挙げていますが、今後、世界を舞台に開発をおこなっていくなかで、企業との連携は不可欠になると思います。企業の側にも、どのような利益があるのかということを経営的に啓蒙していくことが必要だと思います。

馬場 3つ目のバイオニック治療論理は、私は部外者ですが、非常にわかりやすい論理だと思います。いかにナノテクノロジーをナノメディシン領域に使っていくかという意味では、非常にシンボリックな論理になるのではないかと思います。これは、血圧安定化以外のところでも、同様な論理がはたらくのではないかと思います。

■ 創薬関係などのナノメディシン国際情勢、シーズとニーズのマッチング

菅 では、次は馬場先生に、外部からの研究協力者という立場として、また創薬関係など国際情勢にも非常に詳しいので、そのあたりを踏まえて、シーズ・ニーズ・マッチングを含めてお話しただけですでしょうか。

馬場 ナノテクノロジーの研究はここ数年間でかなり進展しています。この図④はもう先生方には釈迦に説法で恐縮ですが、最近はこのナノサイズの領域のなかでも、図に挙げておりますように、いくつかのかなり特徴的な現象が発見され、かつ、それを理論的にも説明するよう



- 100~800 nm 溶液物理化学で説明できない現象
- 200~500 nm 可視光の波長の2分の1~4分の1, フォトニック結晶
- 1~100 nm 分子集合体・生体分子, バリティの非保存
- 1~10 nm 電子波と同程度か小さい構造, 量子ドット

量子ビーム, 量子もつれ, 量子テレポーテーション

図④ ナノテクノロジーの今後の方向
(馬場嘉信先生よりご供与)

になってきております。さらには、ナノメディシンのような領域に展開可能だとする論文が、ここ1~2年の間に“Nature”誌, “Science”誌等のかなり重要なジャーナルに発表されています。このあたりのことについて、まず少し簡単にご説明いたします。

まず、ナノデバイスのような非常に小さい空間をつくる場合、これまでのナノテクノロジーでは、半導体で構造をつくり、その中を、半導体ですから電子を動かすわけです。しかし、これを医療、ナノメディシンの分野で使おうとしますと、当然、ヒトの生体の中は全部、溶液の反応で進んでいますので、溶液を入れることになるわけです。1 μm以上の構造中の溶液反応は、19~20世紀初頭に確立された物理化学でかなり説明できるのですが、800 nm以下になってまいりますと、通常、19世紀に確立された、われわれが大学で最初のうちに習うような物理化学で説明できない現象がかなり出てきます。

通常は、800 nmというのは、溶液の主要な成分である水に対してはきわめて大きい構造ですので、当初はこのサイズでそのような現象は起きないだろうと考えていたのですが、われわれも含めていくつかの実験データで、800 nmを切ってくると、今までの物理化学ではどうも説明できない現象が現れています。もしうまくこのことが説明できるようになりますと、細胞の中や、さらには核の中で起こっている現象をより正確に知るといような、そういう技術につながるのではないかと考えています。

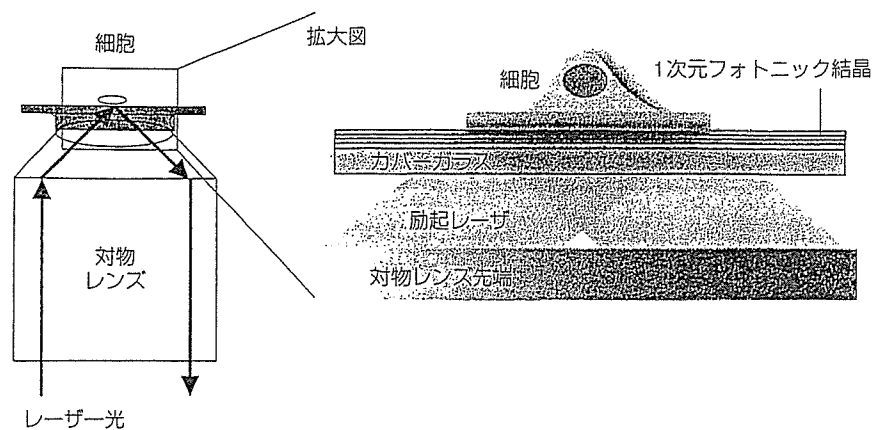
つい最近も、ハーバード大学のグループが、単一細胞

の中の蛋白質の発現状況で、これまでの方法では調べられなかったこと調べることに成功したという論文を“Nature”誌¹⁾で発表しているなど、かなり大きな展開をみせています。

そして、もう少し小さな200~500 nmのサイズは、先ほどの盛先生のイメージングでも使われているような可視光程度、ヒトの目にみえる光の波長の大体2分の1から4分の1程度のサイズです。実は、このぐらいの構造では光そのものを自由に操ることができます。

図⑤はフォトニック結晶という材料ですが、たとえば、一番簡単なフォトニック結晶は、屈折率の違う材料を光の波長の半分ぐらいの厚みで積層し、その積層した先に、ある光が届かないギャップをつくります。ギャップによって光の強度は最大100倍ぐらいに上がります。これはまだナノメディシンの分野に使われていませんが、実は、この研究は日本は非常に盛んで、“Nature”誌²⁾, “Science”誌³⁾にてよく発表されている領域です。今後、非常に大事になってくると思います。

光ファイバーが1番わかりやすい例なのですが、もともとは光通信用に光を自由に曲げたり反射させたりということは今まで難しかったのですが、光ファイバーでかなりできるようになりました。さらにこのフォトニック結晶で光の波長の2分の1程度の小さい構造をつくりますと、光子1個を操作したり、光を90°に曲げるなど、いろいろな角度で曲げたり、それから、光をうまく制御するということに使えるようになります。ここ数年で、この分野もかなり進歩してきており、近い将来ナノメ



図④ 1次元フォトニック結晶—エバネセント光顕微鏡の原理
(馬場嘉信先生よりご供与)

ディシンの分野でも利用されることになると思います。

さらに小さいものでは、蛋白質やDNA、分子集合体、生体分子など1~100 nmのサイズになります。

これに関連して、図④にあるパリティの非保存を説明しますと、まず、パリティの保存とは、左右対称のことで、たとえば、蛋白質やDNAでアミノ酸を合成したときに、D体とL体が1対1でできることです。このことは、1950年頃までは「常識」でしたが、実は、1950年代の末に「パリティの非保存」が実証されました(1957年ノーベル物理学賞)。原子あるいは素粒子のレベルでは、現代ではその素粒子の「パリティの非保存」が物理学者の常識となっていますが、最近、分子のレベルでも同じらしいということがわかってきました。

パリティの非保存とは、要するに、アミノ酸を合成したときに、D体とL体が通常1対1でできるものが、その比が崩れるという状態です。どちらかが多くできるということになるのですが、そのエネルギー差はきわめて小さく、実際、現在のわれわれの技術ではほとんど検出できません。

パリティの非保存は、理論的にはこの数年間でかなり実証されてきているようですが、まだ実験が非常に困難です。ただ、分子集合体や生体分子といったものを使うと、実験ができそうということが最近わかりつつあります。今後、薬の合成などに使える技術になるかもしれません。

さらに小さくなってくると、1~10 nmサイズの量子

ドットになります。電子そのものが波の性質をもっていますが、それと同程度か小さい構造です。当初は、量子ドットは、半導体用に考えられていました。そういう意味では、ナノメディシンへの応用はあまり考えられておらず、カドミウムのようなかなり毒性の強いものが大半でした。近年、この量子ドットの理論的なことが少しわかってまいりまして、毒性のない材料でもちゃんと光るという結果が出てきました。それも、とくに1~10 nmの領域での理論的な研究が出てきており、かなり進展しつつあると思います。

先ほど、盛先生のところでもFRETの話が出てまいりましたが、最近、量子ドットの領域ではやはりBRETというもので、これは「バイオルミネッセンス・リゾナンス・エナジー・トランスファー (bioluminescence resonance energy transfer)」の略なのですが、量子ドットにバイオ発光するような酵素をつけてやりますと、量子ドットは、普通、例えば紫外線を当てると光ることなのですが、そうではなくて、そのバイオルミネッセンスを起こす物質が細胞の中にあると、それが反応して発光して、その光で量子ドットが光ります。外から光を当てなくていいのです。

しかも、その光を赤外線領域、あるいは近赤外線領域にしてやりますと、皮膚のかなり下のほうの細胞でも一かなりといいましても、真ん中は見えないと思うのですが、表面ではなくても、ある程度、中のところでも光が透過して見えるというようなものも、これもつい最近、

2~3ヵ月前にアメリカのグループが発表したのですけれども、そういうことができるようになってまいりました⁵⁾。

それから、量子ビームというのは、これも先ほどの盛先生のところでも出てまいりましたが、シンクロトロン放射光を使ったような放射線とか、それから重粒子線とか、そういう放射光、あるいは非常に強力なレーザービーム、それから放射能を使ったようなものを総称して「量子ビーム」と最近と呼んでいるようなのですけれども、これがまさに蛋白質の構造解析には非常に重要ですし、癌の治療なんかにも最近使われていますし、そういう意味では、ナノテクノロジーが、理論的にも実験技術としてもかなり洗練されてまいりました。

ナノテクノロジーを、このナノメディシンのプロジェクトの始まった当初に使用する際、まず半導体技術の方向を向いてつくられたものを、ある意味、無理やりといいますか、研究者の希望にあまり合わないものを使っていたという状況だったのが、最近では、ナノテクノロジーを研究している他の分野の研究者にも、ナノテクノロジーは医療の領域に使えるという認識がだいぶひろまってきています。

また、最近、私は個人的に量子もつれや量子テレポーテーションに興味をもっています。量子力学は Bohr や Heisenberg という人たちが提唱したのですが、もともと Einstein は量子力学を認めておらず、その量子力学の理論の不完全性を突くために、1935年にある論文を発表しました。それは非常に有名な『EPR パラドックス』という論文です⁶⁾。この論文は、先日、物理学で最も長い期間引用されている「賞味期間の長い論文である」と発表され、出版後70年以上たった今でも年間80回程度引用されているそうです。

現実には、その Einstein が「不完全である」と指摘したことは、実際には、自然には存在したのです。それは今では Einstein が予想した現象として知られているのですが、ただ、その現象について、その理論を実証することが今まで不可能でした。

ところが、近年実証することができるようになり、量子もつれや量子テレポーテーションといった現象として知られるようになりました。これらはまだ、ナノメディ

シンの領域に使えるのかはわかりませんが、日本の研究者が世界をリードしている分野で⁷⁾、もしかしたらそんなに遠くない将来にナノメディシンの領域に使える発見があるのではないかと考えております⁸⁾。

そのためには、先ほど杉町先生もいわれましたように、企業とのニーズとシーズのマッチングが非常に重要です。いろいろな企業の方にお話を聞くと、実用化の課題としてはいくつかあるのですが、やはり1番最初は、ナノメディシンを研究されている最先端の先生方から、どういうところに課題があるのかといったロードマップを企業側に提示できる範囲で提示するということが一番大事なのではないかと思えます。

また、もちろん、ナノメディシンの目標は患者さんにとって1番良い医療を提供するということだと思いますが、もう1つの側面として、日本の企業の得意な分野をうまく活用できるということがあると思います。たとえば、電気・電子の分野や自動車の分野でもナノテクノロジーは非常に盛んに研究されています。そして、おそらくナノメディシンの先生方からみるとかなり異業種のところでも、実は、ナノテクノロジーの研究は盛んにおこなわれています。その理由の1つとして、将来、バイオや医療に展開しようと考えているという企業もたくさんいます。ただ、何をどうしたら医療の分野に応用できるのかがわからない。ですから、「どういうところにまだ課題があって、今後どういう方向に進みますよ」ということと公に示すようなロードマップがあればいいのではないかと思います。

菅 ありがとうございます。医療の側からではみられない側面についても、お話しただけでした。また大いに実用化に向かっていけそうな分野のお話も聞け、将来が非常に楽しみだという気がいたします。

■ まとめ；今後の方針

菅 やはり、研究者だけのグループではなくて、産学官が連携し、情報を共有することが今後ますます重要になってくるように思います。

盛 物理や化学など、いわゆる基礎科学は従来の流れですと、10年、20年という間をおいて医学の分野でも

基礎医学といわれる分野に浸透し、それがまたあるタイムラグを経てトランスレーショナルリサーチがおこなわれて臨床医学に応用されるという流れがありました。しかし、このナノテクノロジー、そしてナノテクノロジーを利用したナノメディシンの分野は、この基礎医学が直接臨床医学に結び付く時代の先駆けなのではないかと考えているのですが、それについては、馬場先生はどのようにお考えですか。

馬場 〇私もまったく今のご指摘の通りだと思います。自分の世界のみで研究していた時代ではなく、とくにナノテクノロジーの領域はそうだと思うのですが、自分たちがつくった非常に機能性の高いナノ構造を、いかにライフサイエンスや医療のほうに展開しようかという考えをもって研究している人がかなりいます。

菅 〇杉町先生、ご質問はございますか。

杉町 〇馬場先生のお話をお伺いしますと、ある意味で、生体がやっていることが、「生体がナノテクノロジーを積極的に使っている」というのでしょうか、そういうふうには生体が進化してきているように聞こえます。もちろん、生物が細菌みたいな小さなものから始まっているからというだけなのか、あるいは、やはり進化するうえで好都合なように進んできたのか、と考えられます。そういった意味で、生体というのがナノテクノロジーの研究に何か好材料なのかなという気がします。

馬場 〇そうですね。おっしゃる通りだと思います。たとえば、半導体技術でつくったナノ構造が、蛋白質、DNA、細胞染色体と同じぐらいのものができるようになり、バイオの分野に応用しようとしたときに生命がおこなっているいろいろな反応、あるいは現象が、非常に参考になります。また、蛋白質をはじめ、生物の美しい構造をナノテクノロジーで再現するための研究も盛んに

なっています。

菅 〇ナノの現象というのは、地球上に生命が誕生する前に、すでに自然に存在していたもので、それをうまく利用して生物が進化してきて存在し得たわけですから、やはり生物というのは、ある種のナノテクノロジーを使っているとも考えられますね。そういう意味で、非常にロマンがある研究分野でもありますね。

盛 〇生理学も、こういう構造に基づいて身体機能をとらえる構造生理学 (structural physiology) という新しい分野が生まれてくるのではないかと考えています。構造生理学に基づいた治療法の開発は構造医学 (structural medicine) というべき分野を創出するかもしれないと思います。

菅 〇そうですね。ですから、「医療への応用」という目的に到達しながら、実はベーシックでありながらも新しい分野へと研究対象を広げていっているともいうことができます。ナノテクノロジーとナノメディシンは、1足す1が3ですとか、5だというように進展していく分野です。今後、ますます発展が望めますね。

本日はお忙しいところをお集まりいただき、大変ありがとうございました。

なお、本プロジェクトの毎年の成果は、財団法人医療機器センターのホームページ (<http://nano.jaame.or.jp/medicine/index.html>) に掲載されていますので、ご関心のある方はどうぞご覧下さい。とくに各研究班の成果報告は、<http://nano.jaame.or.jp/medicine/report/shitei/index.html> に全文が掲載されています。またナノメディシンフォーラムの映像ライブラリも <http://www.medical-bank.org/nanomedicine/top.html> からご覧になれます。

(2006年4月 大阪にて)

参考文献

- 1) L Cai *et al* : Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* 440 : 358-362, 2006
- 2) Akahane Y *et al* : High-Q photonic nanocavity in a two-dimensional photonic crystal. *Nature* 425 : 944-947, 2003
- 3) Fujita M *et al* : Simultaneous inhibition and redistribution of spontaneous light emission in photonic crystals. *Science* 308 : 1296-1298, 2005
- 4) Quack M : How important is parity violation for molecular and biomolecular chirality? *Angew Chem Int Ed Engl* 41 : 4618-4630, 2002
- 5) So MK *et al* : Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* 24 : 339-343, 2006
- 6) Einstein A *et al* : Can quantum-mechanical description of physical reality be considered complete? *Phys Rev* 47 : 777-780, 1935
- 7) Edamatsu K *et al* : Generation of ultraviolet entangled photons in a semiconductor. *Nature* 431 : 167-170, 2004
- 8) Yonezawa H *et al* : Demonstration of a quantum teleportation network for continuous variables. *Nature* 431 : 430-433, 2004

特発性心筋症の原因解明と治療法開発に向けた構造生物学的アプローチ

Structural biological approaches for idiopathic cardiomyopathy

盛 英三 武田壮一 五十嵐智子 柴田洋之

Hidezo MORI, Soichi TAKEDA, Tomoko IGARASHI and Hiroyuki SHIBATA

国立循環器病センター研究所心臓生理部

◎肥大型心筋症と一部の拡張型心筋症にはサルコメア(筋節)構成蛋白の遺伝子異常が多く認められる。βミオシン重鎖に次いで、トロポニンT(全体の約15%)に高頻度である。近年、放射光を用いたX線回折法により原子レベルの解像度で、ヒト心筋トロポニンのコアダメインの構造が決定された。収縮調節の詳細な機構解明の端緒となるとともに、構造に基づく創薬から特異的な治療法の開発も期待できる。本稿では、心筋トロポニンの構造から期待される心筋症の病因の解明と治療法の開発の可能性について述べてみたい。合わせて、構造に基づく創薬の成功例についても概説する。



Key word 構造生物学, 構造に基づく薬剤設計, 特発性心筋症, テーラーメイド医療

肥大型心筋症は常染色体性優性遺伝の形式で伝搬する家族性発症の疾患として知られている。筋原線維の収縮単位であるサルコメア(筋節)構成蛋白の遺伝子異常が多く、βミオシン重鎖に次いでトロポニンTに高頻度の遺伝子異常(全体の約15%)が認められる。一部の拡張型心筋症にも筋節構成蛋白の遺伝子異常が認められる。近年、放射光を用いたX線回折法の発達により、原子レベルの解像度で蛋白結晶の構造を決定できるようになった。この方法によりヒト心筋トロポニンのコアダメインの構造が決定され、収縮調節の詳細な機構解明の端緒が得られつつある¹⁾。

本稿では心筋トロポニンの構造から、将来の心筋症の病因の解明と治療法の開発の可能性について述べてみたい。

ヒト心筋トロポニンの構造と収縮調節機構

心筋収縮を調節する心筋トロポニンの中核部分(コアダメイン)の構造は、武田と理化学研究所の

前田らによって解析された¹⁾。これに基づき、トロポニンの筋収縮調節メカニズムについて以下に述べる²⁾。

筋収縮はアクチンとミオシンの滑り運動による。アクチンフィラメントはアクチン、トロポニン、トロポミオシンを含む複合体であり、それらの3分子は7:1:1の存在比をもつ。トロポニンの存在下でアクチンとミオシンはカルシウムイオン濃度に応じた収縮と弛緩を行う。

図1-Aに心筋トロポニンのコアダメインの構造を示す。トロポニンはTnC(図中赤色)、TnI(図中青色)、TnT(図中黄色)とよばれる3つのポリペプチド鎖からなる。これまでの研究により、TnIは収縮抑制因子、TnCは脱抑制因子、TnTはTnCの脱抑制を弱める因子(カルシウム濃度依存性の付加因子)であることが示されている³⁾。

トロポニンのコアダメインは機能的に調節頭部とITアームの2つのサブドメインに分かれる。調節頭部はカルシウムイオンとの結合を通じて、

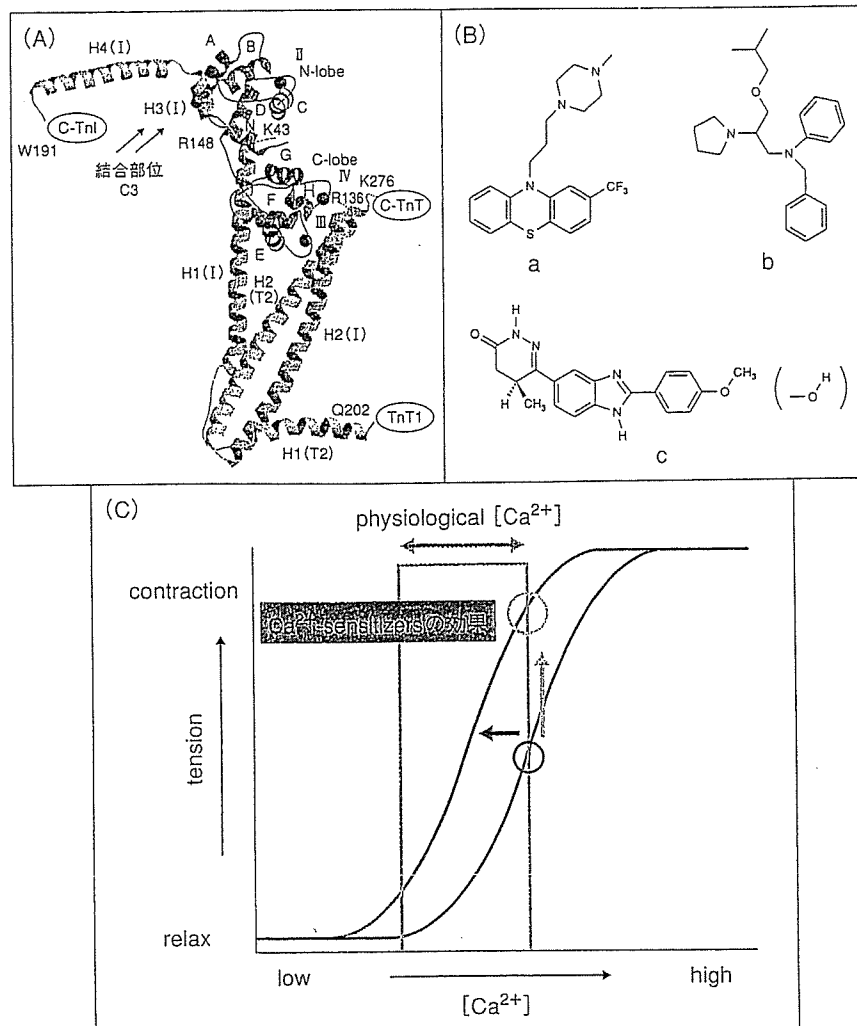


図 1 トロポニンコアドメインの構造とカルシウムセンシタイザー
 (文献¹⁾より改変)
 A: トロポニンコアドメインの構造, B: カルシウムセンシタイザー, C:
 薬剤によるカルシウム感受性の亢進.

トロポニンの構造変化とそれに基づくアクチンとミオシンの滑り運動に対するスイッチの役割を果たす。IT アームは剛性を有するコイルドコイル構造からなる。TnC は N 末端側と C 末端側の 2 つの球状部が α ヘリックスで連結された構造をもつ。カルシウム濃度にかかわらず C 末端側球状部は TnI に結合し、TnC をトロポニン分子内に常につなぎとめている。一方、TnC の N 末端側球状部は、細胞内カルシウム濃度が上昇した場合のみ構造が開き、TnI の両親媒性 α ヘリックス (H3) を結合する (図中結合部位)。これにより TnI の調節領域 (トロポミオシンをアクチンに結びつけている部分) 全体 (H3, H4 から C-TnI までを指す) がトロポミオシン/アクチンより解離し、アクチンとミ

オシンの滑り運動がはじまる。

肥大型心筋症 (図 2-A 左側) ではトロポニンの遺伝子変異によりカルシウム感受性が亢進することが発病に関連する可能性が示唆されている。同患者の遺伝子解析によると約 15% の患者に TnT の遺伝子変異が認められる。大概³⁾によれば、トロポニンがアクチン/トロポミオシンと直接接触する部分 (TnT1, C-TnT, TnI 調節領域) に変異が多く認められ、コアドメインには変異は少ないという (図 2-B)。変異 TnT の交換導入を行った心筋スキンドファイバーを用いた研究で、カルシウムイオン濃度-張力関係の左方シフト、すなわちカルシウム感受性の亢進が認められた (図 2-C 赤色のグラフ)。この結果から TnT などのサルコメア蛋

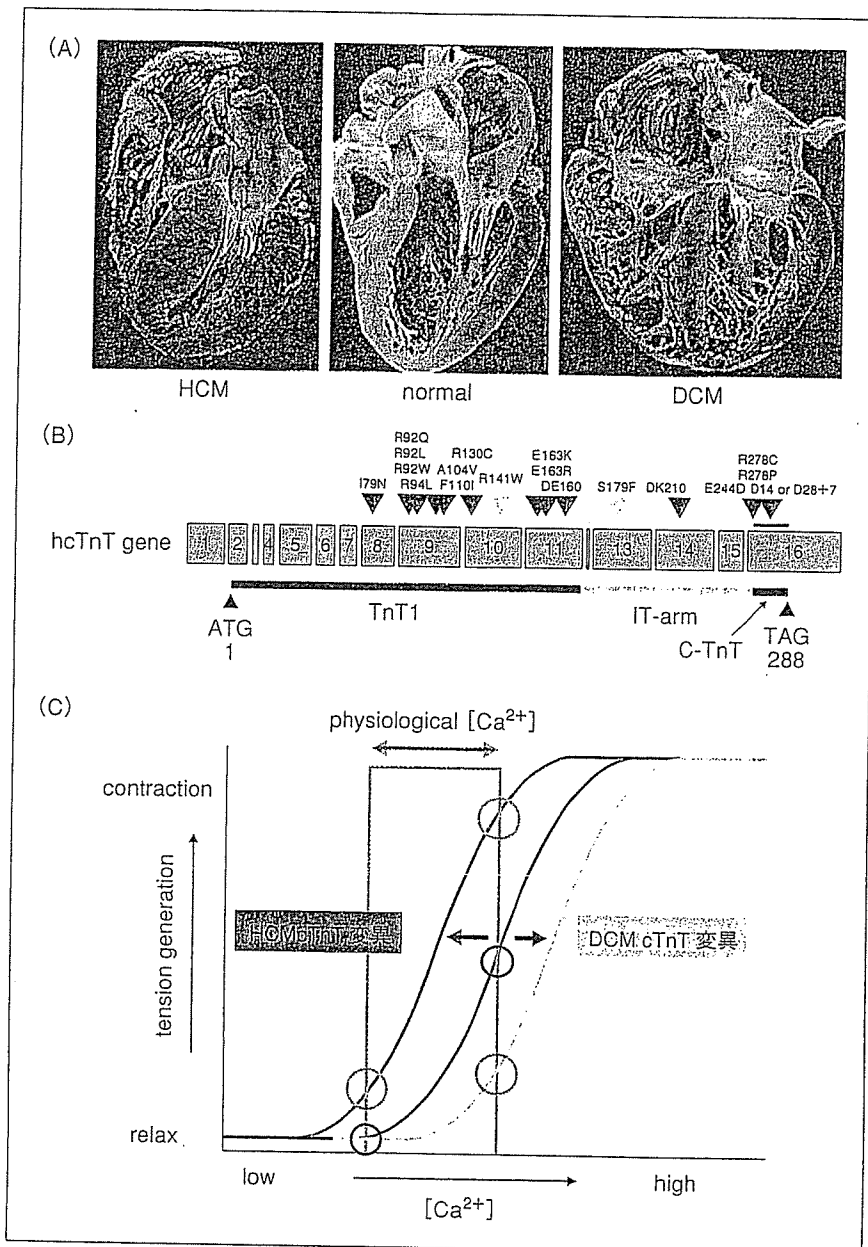


図 2 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋カルシウム感受性
心筋症の遺伝子変異は TnT1, c-TnT に多く、肥大型ではカルシウム感受性の亢進、拡張型では低下を引き起こす。

白の部分変異によりカルシウム感受性が亢進し、収縮増加と弛緩不全という肥大型心筋症に特有の症状が発症するという有力な仮説が生まれる。TnT の変異によるカルシウム感受性亢進のメカニズムを原子構造で解明することができれば、肥大型心筋症を特異的に治療する薬剤の設計が期待できる。原因となる遺伝子変異ごとに異なる構造の薬剤を設計し、各病型に特異的な治療が可能となる。このような心筋トロポニンの変異に基づく肥大型心筋症の治療法の開発はテーラーメイド医療

のモデルケースとなる可能性がある。

カルシウム感受性の調節は TnC を介して調節することも可能である。TnC の N 末端側球状部にカルシウムセンシタイザー(図 1-B)が結合すると同球状部は開いた構造をとり、TnI の両親媒性 α ヘリックス(H3)が結合しやすくなる(図 1-A 赤のドメイン)。すなわち、TnC による TnI の脱抑制が起こりやすくなる。前述のように TnT は TnC の脱抑制作用にカルシウム濃度依存性を付加することができるので、TnC と TnT の制御を組み

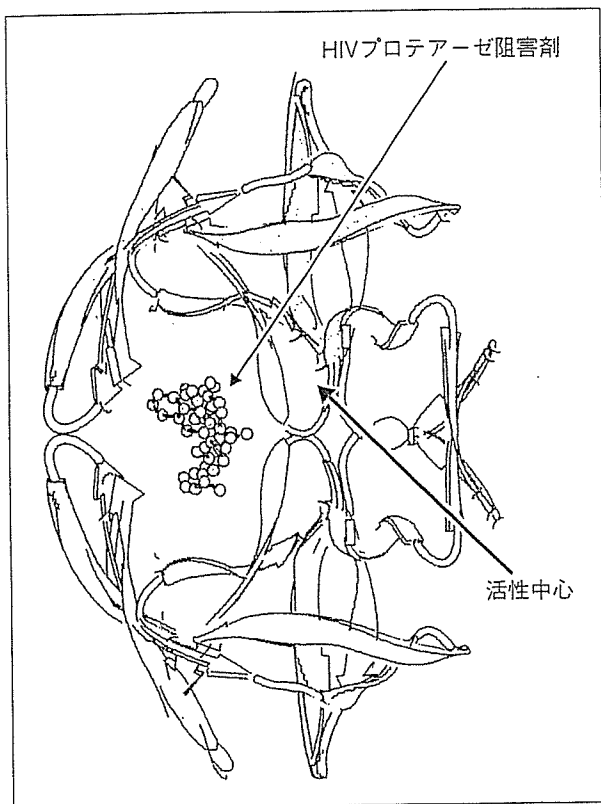


図3 蛋白構造に基づくHIVプロテアーゼ阻害薬の作用機構

でも、TnCを介したカルシウム感受性の調節薬は期待がもてる。ジギタリス以来、これを超える強心剤が生まれていない。従来の強心剤は細胞内カルシウムイオン濃度を高めて強心作用を誘導するために、細胞に対する負荷(カルシウム overload)が不可避であった。1980年代後半に開発されたカルシウムセンシタイザーとよばれた薬剤群はカルシウムイオン濃度-張力関係を左方にシフトさせることにより(図1-C)低い細胞内カルシウムイオン濃度で高い収縮力を得ることができ理想的な強心剤ではないかと期待された⁴⁾。しかし、これらの薬剤の臨床使用経験から、短期的に心筋収縮力は高まるものの、心不全患者の長期予後の改善に役立つことはなかった。これらのカルシウムセンシタイザーは phosphodiesterase の阻害作用も合わせもっており、細胞内 cyclicAMP の増加によって筋小胞体からのカルシウムイオン放出が増加し、ついにはカルシウム overload となる可能性や⁵⁾、構造が類似した他の蛋白と相互作用があるなど、薬剤としての標的特異性が低いことが原因として考えられる。拡張型心筋症例では、すくなくとも一部の症例でカルシウム感受性の低下と収縮不全の関連が示唆されている(図2-C黄色のグラフ)。これらの事実は TnC や TnT を特異的に制御

合わせることで段階的な筋収縮の増強を実現できるかもしれない。肥大型心筋症の治療薬としてだけでなく、心疾患一般に適用できる強心剤とし

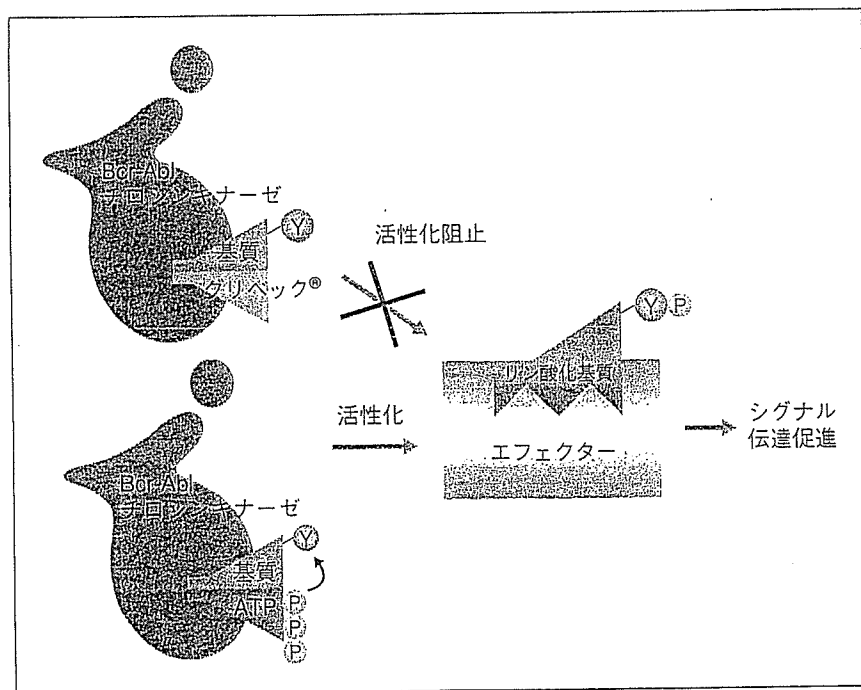


図4 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

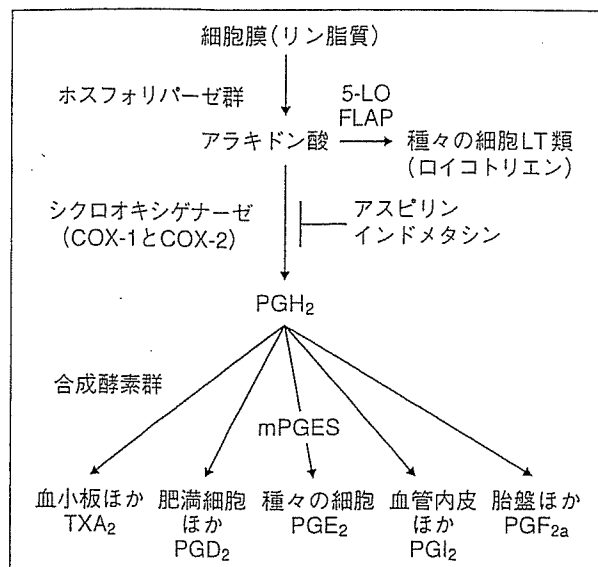


図 5 プロスタグランジン産生系

する化合物の設計により、あらたな強心剤を開発できるという可能性を示している。

構造解析が創薬に結びついた実例

構造に基づく薬剤設計の具体的な成功例として、AIDS 治療薬(HIV プロテアーゼ阻害薬)と白血病治療薬(グリベック®)について以下に述べる。

AIDS ウイルス、HIV は活性化外殻蛋白 gp120 により CD4 陽性 T リンパ球に感染し、自己増殖をする。その際、自己由来のプロテアーゼによって前駆体蛋白から活性化外殻蛋白を得る。この HIV プロテアーゼの構造に基づいて設計され、その活性中心を選択的に阻害する目的で設計された薬剤が HIV プロテアーゼ阻害薬である(図 3)。本剤は AIDS の発症を遅らせることに貢献した⁶⁾。

慢性骨髄性白血病では、フィラデルフィア染色体に由来する BcrAbl チロシンキナーゼが恒常的な増殖シグナル伝達系の活性化を通じて、発症の原因になると考えられている。同酵素は ATP と基質に結合し、ATP から切り離れたリン酸基で基質のチロシン残基をリン酸化する。グリベック®は BcrAbl チロシンキナーゼの ATP 結合部位の詳細な構造に基づいて設計され、基質のチロシンリン酸化を構造特異的に阻害して白血病化を防ぐ⁷⁾(図 4)。このような構造に基づく薬剤設計をトロポニンを標的として行うことにより、肥大型心筋症に対する創薬を期待することができる。

創薬標的としてのプロスタグランジン合成酵素群の構造解析

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、プロスタグランジン(PG)を生合成する律速酵素として知られている(図 5)。2種類のアイソザイムが存在する。COX-1 は constitutive enzyme によれば、ほとんどの細胞で常時発現しており、生体の安定性を維持する役割を果たす。一方、COX-2 は、inducible enzyme として単球、線維芽細胞、滑膜細胞などの炎症にかかわる細胞で発現し、炎症性サイトカインなどによって誘導される。従来の非ステロイド系抗炎症剤は COX-1 と COX-2 の両方を阻害するために、炎症巢の PG だけでなく、胃粘膜や腎での PG(とくに PGE₂)産生を抑制し、胃や腎の副作用を合併する。そこで、炎症に深く関与していると考えられる COX-2 だけを選択的に阻害する薬剤の開発が進められてきた。このようにして開発された COX-2 阻害薬は胃潰瘍を起こしにくい鎮痛剤として好んで投薬されていた。しかし、2004 年末、アメリカ政府はこれらの COX-2 選択的阻害薬の 3 剤は心筋梗塞や脳梗塞の危険性を高めるおそれがあるとして、心臓病患者への処方や多量の長期使用を避けるよう勧告した。COX-2 の下流に位置するプロスタサイクリン合成酵素の作用も抑制するために、同酵素に由来する抗血栓性作用や血流増加作用が損なわれることが原因ではないかと考えられている⁸⁾。

図 5 に示したように COX-2 の下流には多くの合成酵素があり、それぞれの作用を有する蛋白を合成している。個々の合成酵素を選択的に阻害する薬剤の開発が次世代の創薬の標的として注目される。PGE₂の産生にかかわる mPGES を阻害する薬剤の開発は、血管内血栓形成を伴わない理想的な抗炎症剤となる可能性がある。TXA₂産生を阻害する薬剤の開発は、血管内血栓形成の予防、局所血流増加作用を通じて脳梗塞、心筋梗塞の予防薬や治療薬として期待できる。PGI₂はすでに、難病といわれた原発性肺高血圧症の治療に有効であることも知られている。

おわりに

国立循環器病センター内に構造生物学ラボを立

ち上げ、分子特異的な治療薬の開発をめざしている。トロポニンの構造解析は肥大型心筋症治療法開発の可能性を有する。肥大型心筋症ではトロポニンのさまざまな部位に遺伝子変異が確認されており、これらに対応する構造の薬剤を開発することはテーラーメイド医療の先駆けとなると考えられる。

謝辞：本稿の執筆および英文作成に協力していただいた東本弘子女史、松尾千重女史に感謝します。

文献

- 1) Takeda, S. et al. : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca^{2+} saturated form. *Nature*, 424 : 35-41, 2003.
- 2) 前田雄一郎・他：トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム. 蛋白質・核酸・酵素, 48 : 500-512, 2003.
- 3) 大槻磐男：筋収縮カルシウム受容調節の分子機構と遺伝性機能障害. 日本薬理学雑誌, 118 : 147-158, 2001.
- 4) Lee, J. A. et al. : Effects of pimobendan, a novel inotropic agent on intracellular calcium and tension in isolated ferret ventricular muscle. *Clin. Sci.*, 76 : 609-618, 1989.
- 5) Authors/task force members, Markku, S. et al. : Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure : The task force on acute heart failure of the European society of Hcardiology. *Eur. Heart J.*, 26 : 384-416, 2005.
- 6) Patick, A. K. et al. : Activities of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease inhibitor nelfinavir mesylate in combination with reverse transcriptase and protease inhibitors against acute HIV-1 infection *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 : 2159-2164, 1997.
- 7) Drucker, B. J. et al. : Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, 2 : 561-566, 1996.
- 8) Mukherjee, D. et al. : Risk of cardiovascular events associated with selective cox-2 inhibitors. *JAMA*, 286 : 954-959, 2001.

●お知らせ●

図第 57 回日本電気泳動学会総会

1. 会期：平成 18 年 10 月 27 日(金), 28 日(土)
2. 会場：アクトシティ浜松コンgresセンター
(〒430-7790 静岡県浜松市板屋町 111-1,
TEL 053-451-1111)
3. 行事予定：
 - ①特別講演「拡大するユビキチンの世界：基礎から病態へ」
田中啓二(東京都臨床医学総合研究所・分子腫瘍学
研究部門)
 - ②教育講演「臨床検査領域での分離分析(仮題)」
菅野剛史(浜松医療公社)
 - ③シンポジウム「エピジェネティクスと RNA ワールド」
“胚発生と DNA メチル化, エピジェネティクスの世界”
岡野正樹(理化学研究所, 発生・再生科学総合研究セ
ンター)
“ヒストンメチル化修飾と疾患の世界”
眞貝洋一(京都大学ウイルス研究所 感染症モデル
研究センター)
“RNA 修飾の世界”
鈴木 勉(東京大学大学院工学系研究科 化学生命
工学)
“アンチセンス RNA の世界”
船渡忠男(京都大学医学部保健学科・検査技術科学
専攻・情報理工学)
追加発言 “It's a microRNA World” 水谷隆之(B-Bridge)
 - ④ワークショップ「臨床検査値に異常を及ぼす体液成

- 分一発見から報告の仕方まで」
- ⑤ランチョンセミナー, テクニカルセミナー
 - ⑥第 45 回日本電気泳動学会児玉賞受賞講演
 4. 総会参加費：5,000 円(学生 2,000 円)
 5. 一般演題の申込要領：日本電気泳動学会ホームページ(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jes1950/>)から所定の抄録記入用ファイル(Microsoft Word ファイルでファイル名 summary.doc)をダウンロードし, 所定の書式に従って申込先宛(agata@hama-med.ac.jp)にメール添付で平成 18 年 7 月 15 日(土)までにお送り下さい。
 6. 第 57 回日本電気泳動学会総会事務局
〒431-3192 浜松市半田山 1-20-1
浜松医科大学医学部臨床検査医学
阿形初代(事務担当)
連絡先 TEL(053)435-2788
連絡先 FAX(053)435-2096
E-mail : agata@hama-med.ac.jp
常設事務局 URL : <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jes1950/>
 7. 入会方法および問い合わせ先
一般演題での発表者は本学会会員に限りませんが, 連名発表者は非会員でも可能です。
演者で非会員のほうは申込と同時に入会手続きを行ってください。
学会事務局：〒229-8501 相模原市淵野辺 1-17-71
麻布大学内日本電気泳動学会
TEL/FAX042-769-2293,
E-mail : honjo@azabu-u.ac.jp

疾患関連蛋白のサブナノ構造イメージングと 分子標的薬剤の開発；ナノイメージング構造

盛 英三^{*1}, 武田壮一^{*1}, 若林繁夫^{*1}, 井上裕康^{*1,2}

ユーセフベンアマー^{*1}, 松原孝宜^{*1}, 五十嵐智子^{*1}, 柴田洋之^{*1}

MORI Hidezo, TAKEDA Shoichi, WAKABAYASHI Shigeo, INOUE Hiroyasu
YUSSEF Ben Ammar, MATSUBARA Takayoshi, IGARASHI Tomoko, SHIBATA Hiroyuki

^{*1}国立循環器病センター研究所以臓生理部, 分子生理部

^{*2}奈良女子大学生生活環境学部

SUMMARY

厚生労働省のナノメディシン・プロジェクトにおける蛋白分子の構造イメージングの成果について概説する。まず、放射光 X 線回折法による蛋白結晶構造解析の原理を説明する。次に、本研究グループが解析した疾患関連蛋白の構造解析とその創薬への応用の可能性について3つの例を挙げて説明する。第1の例として、ヒト心筋トロポニンのコアダメインの構造解析の結果と収縮調節機構の関連を説明する。トロポニンと相互作用する薬剤を構造に基づいて設計することで、理想的なカルシウムセンシタイザーの設計や肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy: HCM) の治療薬が設計できる可能性について述べる。引き続き、ほかの2つの疾患関連蛋白の構造解析の成果についても同様に概説する。

POINTS

- 蛋白分子の構造イメージングは分子標的薬の設計に役立つ。
- 蛋白分子の構造解析の主要手段は放射光 X 線回折法である。
- ヒト心筋トロポニンの構造解析は収縮調節の機構を明らかにする。
- 薬剤とトロポニンの複合体の構造解析は分子標的薬剤の設計に役立つ。
- ナノメディシン・プロジェクトで、複数の疾患関連蛋白の構造を解析した。

KEY WORDS

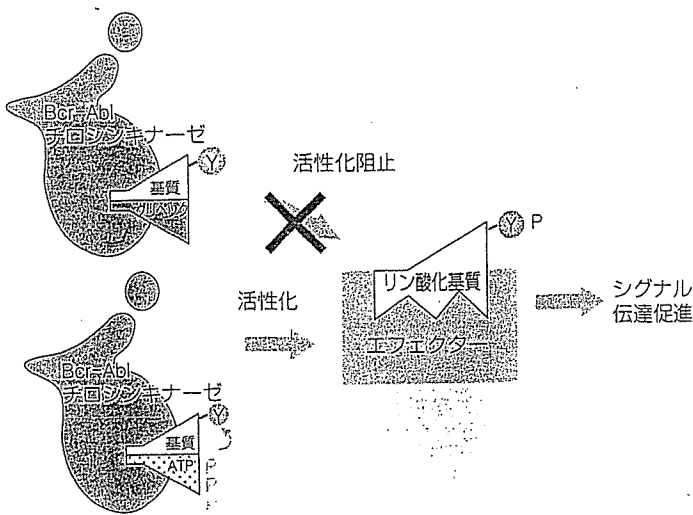
構造生物学, 創薬, 分子標的薬, 特発性心筋症, テーラーメイド医療

はじめに

遺伝子, アミノ酸, 蛋白などのナノメートルサイズの分子の挙動に視点をおいた医学領域をナノメディシンと定義する。蛋白の詳細な構造を解析する分子構造イメージングは, 蛋白分子の挙動を可視化する分子機能イメージング (桜井らの別稿参照) とともに次世代医学の基盤情報を形成すると考えられる。本稿では, 厚生労働省の

ナノメディシン・プロジェクトにおいて2002 (平成14) 年度から実施されてきた構造イメージングとその医学応用の可能性について述べてみたい。

サブナノレベル (Å オーダー) の解像度で蛋白の構造を解析すると, それと特異的に結合する化合物 (薬剤) の構造を最適化するための基盤情報を得られる。実例を挙げると, 慢性骨髄性白血病ではフィラデルフィア染色体に由来する BcrAbl チロシンキナーゼが恒常的な増殖



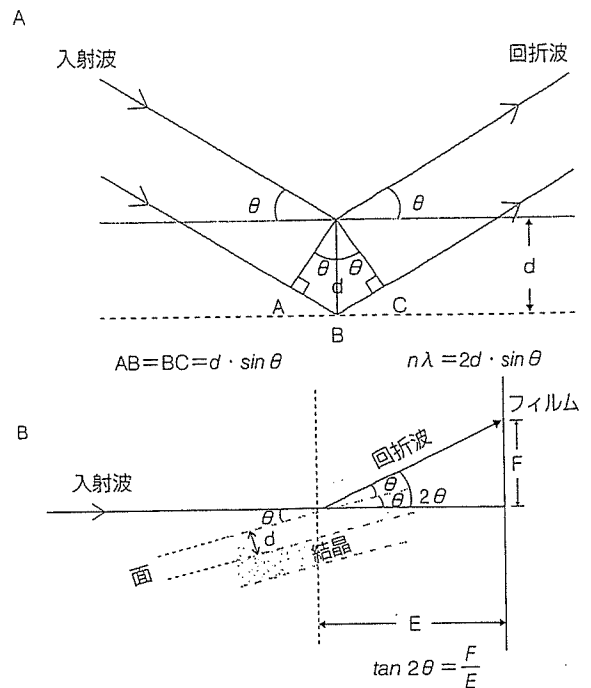
図① 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

シグナル伝達系の活性化を通じて慢性骨髄性白血病発症の原因になると考えられている¹⁾。同酵素はアデノシン三リン酸(ATP)と基質に結合し、ATPから切り離れたリン酸基で基質のチロシン残基をリン酸化する。グリベック®はBcr/AblチロシンキナーゼのATP結合部位の詳細な構造に基づいて設計され、基質のチロシンリン酸化を構造特異的に阻害して白血病化を防ぐ(図①)。このような構造に基づく薬剤設計法は標的分子にのみ作用する創薬に道を開く。

■ 1. 放射光 X 線回折法による蛋白結晶構造解析の原理²⁾

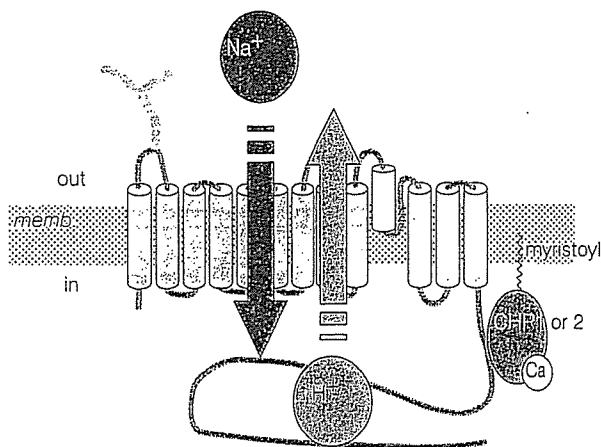
同一分子(単位格子)が多数集まってつくる規則正しい反復構造に X 線を照射し、回折された X 線をつくるパターンから個々の分子の構造を決定する方法を蛋白結晶構造解析と呼ぶ。単位格子の反復構造とは同形の箱が積み上げられた状態を想像するとわかりやすい。同形の箱には 1 ないし複数個の蛋白分子が含まれていると考えると、積み上げられた箱の集合全体が蛋白結晶に相当する。実際に蛋白結晶を作製するためには 97% 以上の高純度の蛋白溶液が必要となる。ハンギングドロップ法や結晶化ロボットなどにより結晶が作製される。

X 線が結晶にあたるとその一部は結晶を構成する電子と相互作用をして電子を振動させる。この電子の振動



図② X 線回折法による蛋白構造解析の原理
A: Bragg 反射, B: 回折角の決定。

によってあらゆる方向に散乱 X 線が発生する。結晶内では原子と原子内電子が規則的に配列しているので特定の方向の X 線は加算されて回折 X 線を生じ、一方、ほかの方向では打ち消し合う。Bragg は X 線の回折現象を結晶中の平行面による入射波の反射として説明した²⁾。間隔が d (格子間距離) だけ離れた (図② A) 2 つの平行面で入射角と反射角が等しくなるように 2 つの反射波が生じる場合、下面からの反射波の光路は $AB + BC$ ($2d \cdot \sin \theta$ に等しい) だけ上面からの反射波よりも長い距離をたどる。この距離が X 線の波長 λ に等しい時 ($n\lambda = 2d \cdot \sin \theta$) に同一方向の X 線の強度が加算される (回折が生じる)。シンクロトロン放射光のような単色 X 線を用いれば λ は既知となる。 θ もフィルム上での回折斑点と入射波との距離と結晶とフィルムの距離から算出できる (図② B)。すなわち、各回折斑点は結晶中のそれぞれのくり返し構造を反映する (図③ C ④ C)。入射 X 線に対して結晶を回転させることで可能な回折斑点をすべて記録することができる。通常の X 線とくらべてシンクロトロン放射光は高輝度で、レーザーに準ずる指向性を有し、解像度の高い回折斑点のデータを短時間で収集することがで



図④ A イオン交換輸送体とその調節因子
(Ammar YB *et al*, 2006⁸⁾より引用)



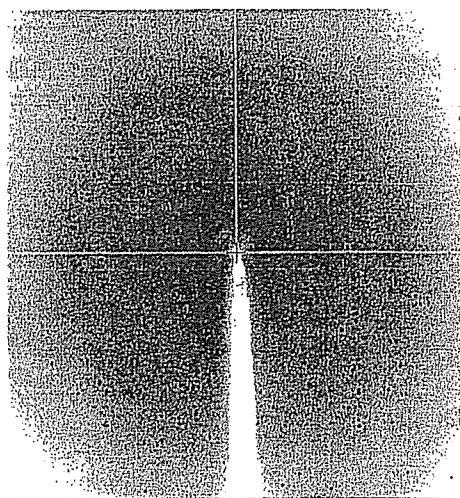
図④ B 複合体の蛋白結晶

きる。

回折波を生じた原子の位置を決定するためには回折波の振幅(回折斑点の強度から算出される)、波長(X線源によって決まる)、位相(上記の実験で確定できない)の3情報をすべて知る必要がある。位相の決定には以下の2つの方法がある。結晶の単位格子中に重金属を導入して得たX線回折実験を追加しておこない、位相を決定する方法を多重原子同型置換法(multiple isomorphous replacement: MIR)と呼ぶ。一方、以下の方法ではたった1つの結晶の回折データで位相を決定することが可能となる。まず、蛋白質を構成するアミノ酸の1つであるメチオニンのかわりにセレンメチオニンに置き換えた蛋白質を合成する。これに、セレン原子の回折能が異なる波長を複数選んでデータを取ることで、位相を決定する。この方法は多波長異常分散(multiwavelength anomalous diffraction: MAD)法と呼ばれ、現在多くの蛋白質がこの方法で解析されている。

蛋白質結晶の回折データの位相と振幅から、蛋白質の電子密度図が算出される。電子密度図の良否は回折データの分解能に依存する。3Å程度の分解能があればポリペプチド鎖をたどり、既知のアミノ酸配列を図上にあてはめることができる。2Å程度の分解能では類似した構造をもつアミノ酸の側鎖を区別できるようになり(図⑤電子密度図)、1.5Å以下の解像度になると個々の原子の判別が可能となる。モデルを精密化する過程で観測値と計算値の不一致の度合いを示す指標としてR値を用いる。分

r6(342)



図④ C X線回折像

解能が3Å以上で、精密化の指標R値が0.30以上の構造には誤差の存在を留意する必要がある。

■ II. ナノメディシン・プロジェクトにおける疾患関連蛋白質の構造解析

1) ヒト心筋トロポニン

筋収縮はアクチンとミオシンの滑り運動による。トロポニンの存在下でアクチンとミオシンはカルシウム(Ca^{2+})イオン濃度に応じた収縮と弛緩をおこなう。

図⑥右側に心筋トロポニンのコアドメインの構造を示す。トロポニンはTnC(図中赤色)、TnI(図中青色)、

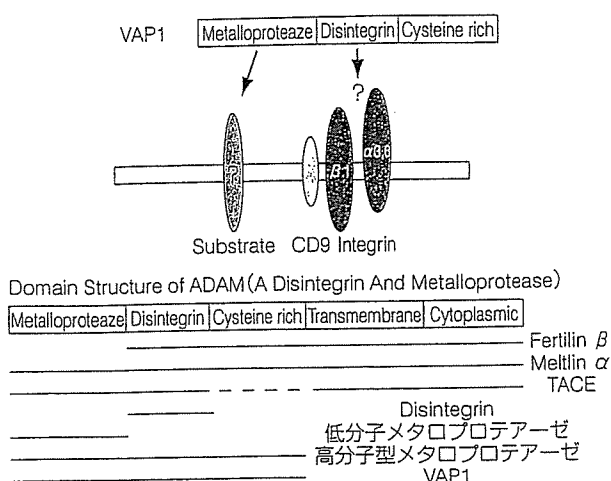


図4 A 血管内皮アポトーシス誘導因子
(Takeda S *et al*, 2006⁹⁾より引用)

TnT (図中黄色) とよばれる3つのドメインからなる。これまでの研究により、TnI は収縮抑制因子、TnC は脱抑制因子、TnT は TnC の脱抑制を弱める因子 (Ca²⁺濃度依存性の付加因子) であることが示されている³⁾。

TnC は N 末端側と C 末端側の2つの球状部が α ヘリックスで連結された構造をもつ。Ca²⁺濃度にかかわらず C 末側球状部は TnI に結合し、TnC をトロポニン分子内につねにつなぎとめている。一方、TnC の N 末端側球状部は細胞内 Ca²⁺濃度が上昇した場合のみ構造が開き、TnI の第2結合部位 (両親媒性 α ヘリックス H3) を結合する (図中結合部位)。これにより、TnI の調節領域 (トロポミオシンをアクチンに結びつけている部分) 全体 (H3, H4 から C-TnI までを指す) がトロポミオシン/アクチンより解離し、アクチンとミオシンの滑り運動が始まる。

TnC の N 末端側球状部に Ca²⁺センシタイザーが結合すると同球状部は開いた構造をとり、TnI の第2結合部位を結合しやすくなる (図6右側赤のドメイン)。すなわち、TnC による TnI の脱抑制が起こりやすくなる⁴⁾。TnC を介した Ca²⁺感受性の調節薬は心疾患一般に適用できる強心剤として期待もてる。従来の強心剤は細胞内 Ca²⁺イオン濃度を高めて強心作用を誘導するために、細胞に対する負荷 (Ca²⁺ overload) が不可避であった。1980年代後半に開発された Ca²⁺センシタイザーと呼ばれた薬剤群 (図6左上) は Ca²⁺イオン濃度—張力関係を

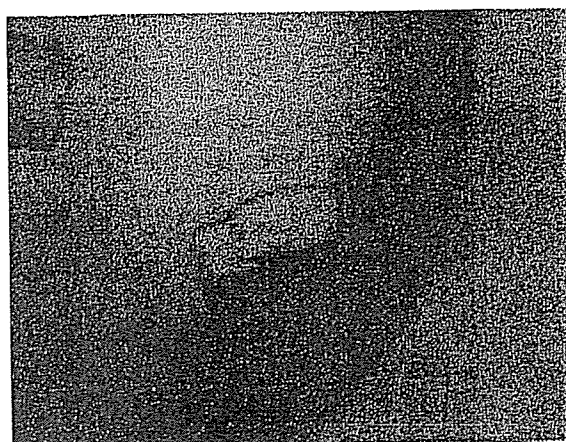


図4 B 蛋白結晶

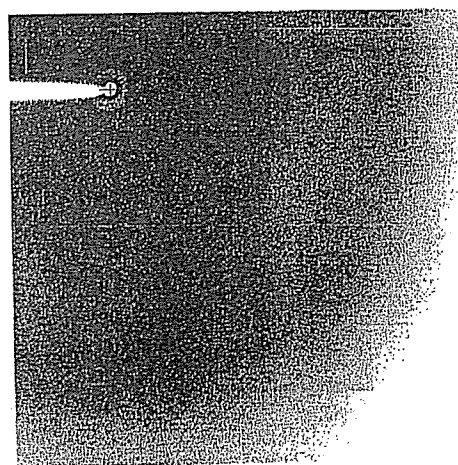


図4 C X線回折像

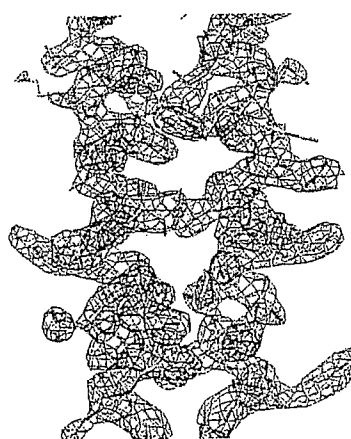


図6 放射光 X線回折像から得られた電子密度図
ヒト心筋トロポニン複合体の電子密度図 2.6 Å 分解能。

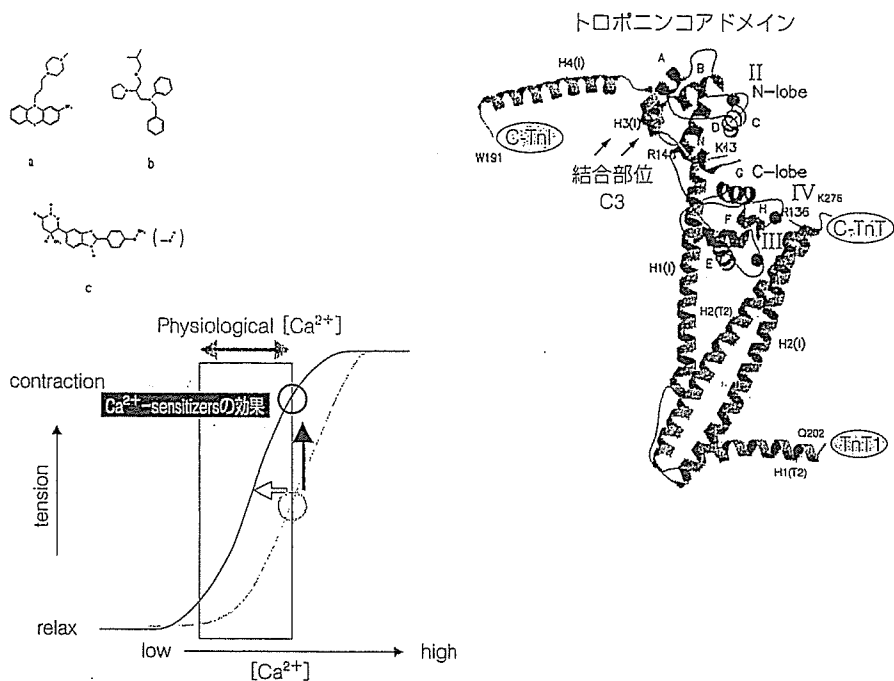


図6 トロポニンCドメインの構造とCa²⁺センシタイザー

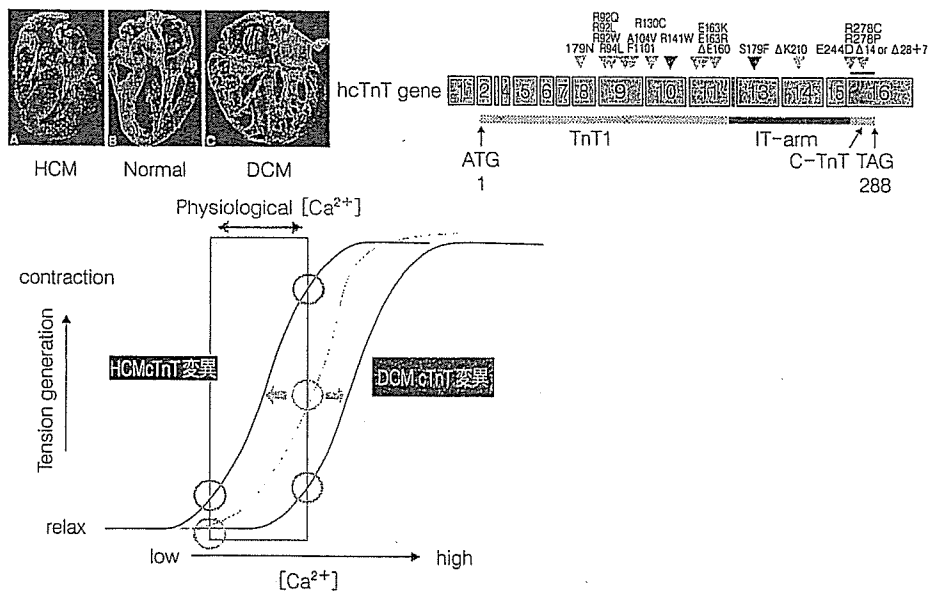


図7 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋Ca²⁺感受性

左方にシフトさせることにより(図6左下), 低い細胞内Ca²⁺イオン濃度で高い収縮力を得ることができる理想的な強心剤ではないかと期待された⁶⁾。しかしながら, これらの薬剤の臨床使用経験から, 短期的に心筋収縮力は高まるものの, 心不全患者の長期予後の改善に役立つこ

とはなかった。これらのCa²⁺センシタイザーは phosphodiesterase の阻害作用もあわせてもっており, 細胞内cyclic-AMPの増加によって筋小胞体からのCa²⁺イオン放出が増加し, ついにはCa²⁺ overloadとなる可能性⁷⁾や, 構造が類似したほかの蛋白と相互作用があるなど,

薬剤としての標的特異性が低いことが原因として考えられる。トロポニンを特異的に制御する化合物の設計により、新たな強心剤を開発できる可能性がある。

HCM ではトロポニンの遺伝子変異が15%の患者に認められ、その変異による Ca^{2+} 感受性の亢進が発病に関連すると考えられている。大槻⁹⁾によれば、トロポニンがアクチン/トロポミオシンと直接接触する部分 (TnT1, C-TnT, TnI 調節領域) に変異が多く認められる (図⑦ 右上)。変異 TnT の交換導入をおこなった心筋スキンドファイバーを用いた研究で、 Ca^{2+} イオン濃度-張力関係の左方シフト、すなわち Ca^{2+} 感受性の亢進が認められた (図⑦ 下左側グラフ)。HCM における変異トロポニンを発現する遺伝子導入マウスを作製することで HCM の発症と個々の遺伝子異常の関連を実証することができる。その際に、白井らが別稿に述べるような放射光小角散乱法は、生体下で収縮蛋白の分子機能を評価することにより、病態解明と治療法の評価に役立つと想像される。TnT の変異による Ca^{2+} 感受性亢進のメカニズムを原子構造で解明することができれば、構造に基づく薬剤の設計により、HCM を遺伝子変異ごとに特異的に治療する薬剤の設計を期待できる。

2) イオン交換輸送体調節蛋白複合体

Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) の多くは細胞膜に存在して細胞内の H^+ と細胞外の Na^+ を交換することで、細胞内の pH 調節、 Na^+ とそれに伴う水分量調節に寄与している。膜型 NHE の細胞内ドメインに結合する Ca^{2+} 結合蛋白質の1つ、カルシニューリン様蛋白質 CHP が NHE の活性制御に重要である⁹⁾。具体的には CHP が結合することで NHE が活性化され、細胞内 pH を上昇させる (図③ A)。癌細胞の増殖に NHE の活性化による細胞内 pH の上昇が関与する。CHP1 はあらゆる組織に存在するが、CHP2 は癌細胞に特異的に発現する。われわれは癌細胞に特異的に発現する CHP2 と NHE 複合体の結晶の作製に成功し (図③ B)、その結晶構造を X 線回折法 (図③ C) で決定した。CHP2/NHE ペプチド複合体を大量精製した後、EF ハンド Ca^{2+} 部位を Y^{3+} イオンで置換することによって結晶化をおこない、SPring-8 の放射光を用いて 2.8 Å の解像度で結晶構造を解明した。その結果、

CHP2 と NHE がきわめて特異的に強く相互作用する分子構造が明らかになった。構造に基づく機能解析によって CHP2 が Ca^{2+} センサーではなく NHE の pH センサーを制御するユニークな機能を有することが明らかになった。創薬的観点から、CHP2/NHE 相互作用を阻害する薬剤の設計により新たな癌治療薬の開発が期待できる。

3) 血管内皮アポトーシス誘導因子

血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 (vascular apoptosis inducing protein 1: VAP1) は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導して出血を引き起こす蛇毒である⁹⁾。この蛋白の構造解析は新たな血管再生医療法の開発に道をひらく可能性がある。また VAP1 のアミノ酸配列はヒト ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリー蛋白と高い相同性を有しており⁹⁾、それらの分子構造の解明の端緒となる可能性がある (図④ A)。たとえば、TNF- α converting enzyme (TACE: ADAM17) は ADAM ファミリー蛋白に属する蛋白の1つで、膜結合型シグナル因子 (TNF- α など) の切断遊離に関与する¹⁰⁾。TNF- α も細胞のアポトーシスを誘導する。ほかの ADAM 蛋白と同様にプロテアーゼドメイン、disintegrin、システインリッチドメインからなる VAP1 の結晶化に成功し (図④ B)、放射光 X 線回折法で構造を 2.5 Å 分解能で解明した (図④ C)⁹⁾。サイトカインなどの膜結合型シグナル因子の切断遊離機構 (ectodomain shedding) の説明にも演繹できる構造解析結果を得た⁹⁾。

■ おわりに

21 世紀の医療の社会的課題として提唱されているテーラーメイド医療の達成には、標的となる蛋白の構造を患者ごとに確定し (分子診断)、最適な薬剤の構造を選択し (分子治療)、薬剤と生体蛋白の相互作用を分子レベルで観察する (分子評価) などの医療基盤技術の育成が求められる。ナノレベルイメージングプロジェクトでは、蛋白分子の構造と機能の解析を通じて、テーラーメイド医療実現のための基盤技術の形成に貢献している。

謝辞 本稿編集に協力していただいた東本弘子女史に感謝し