

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、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、どういところで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の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わからない。ですから、「どういところでまだ課題があって、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 園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 園やはり、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 園物理や化学など、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ド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播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ド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。

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), 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⁾。

トロポニンのコアド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、

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(コアドメイン)の構造は、武田と理化学研究所の

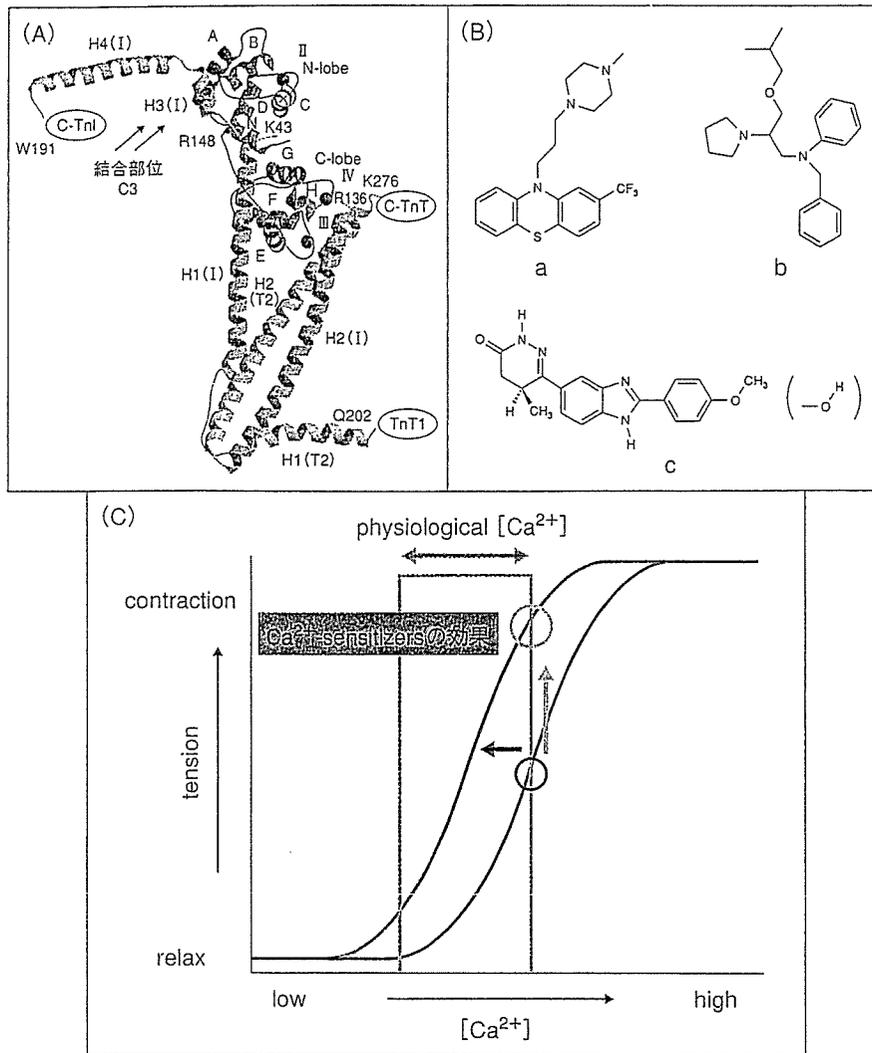


図 1 トロポニンCアダメインの構造とカルシウムセンシタイザー
 (文献¹⁾より改変)
 A: トロポニンCアダメインの構造, B: カルシウムセンシタイザー, C:
 薬剤によるカルシウム感受性の亢進.

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。大槻ら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、コアダ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

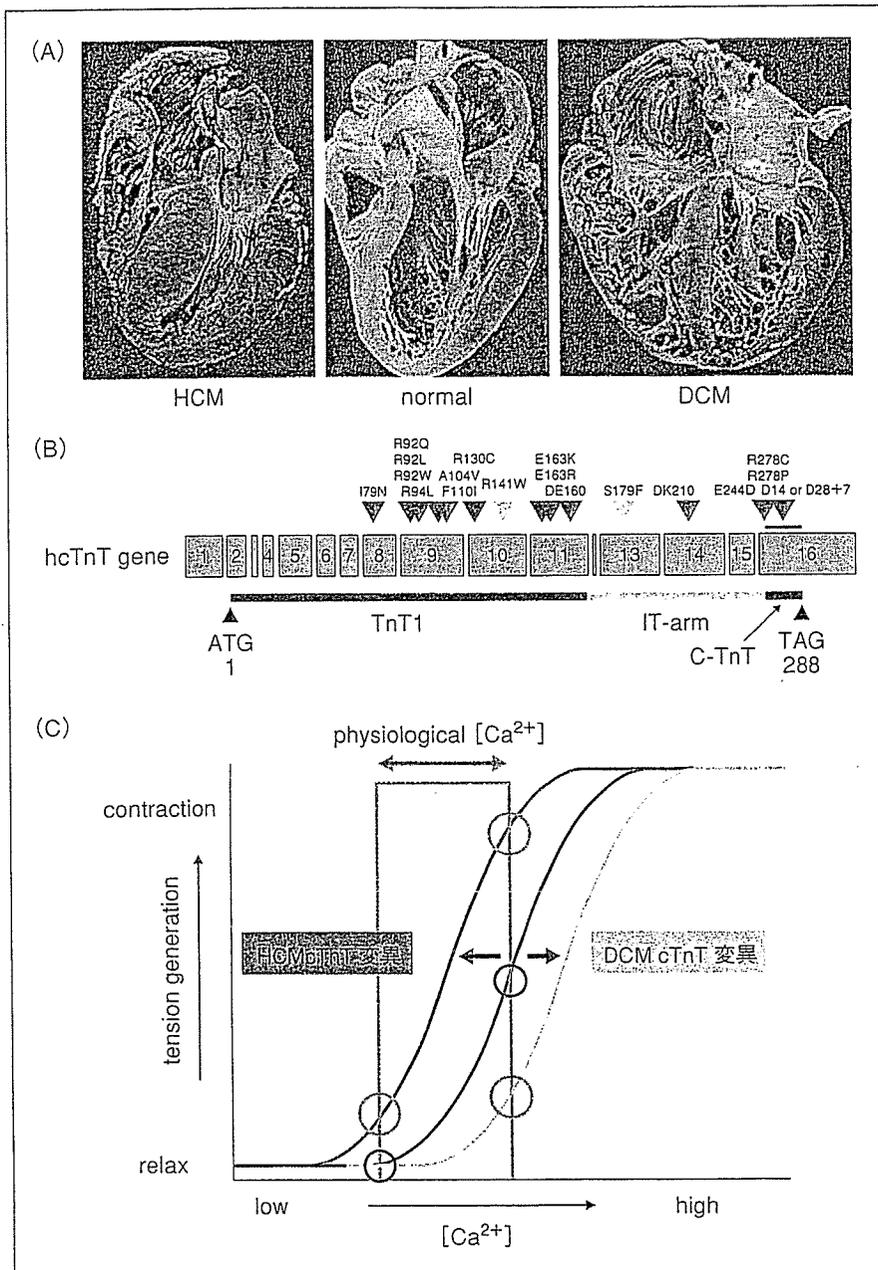


図 2 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋カルシウム感受性
心筋症の遺伝子変異は TnT1, c-TnT に多く、肥大型ではカルシウム感受性の亢進, 拡張型では低下を引き起こす。

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説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

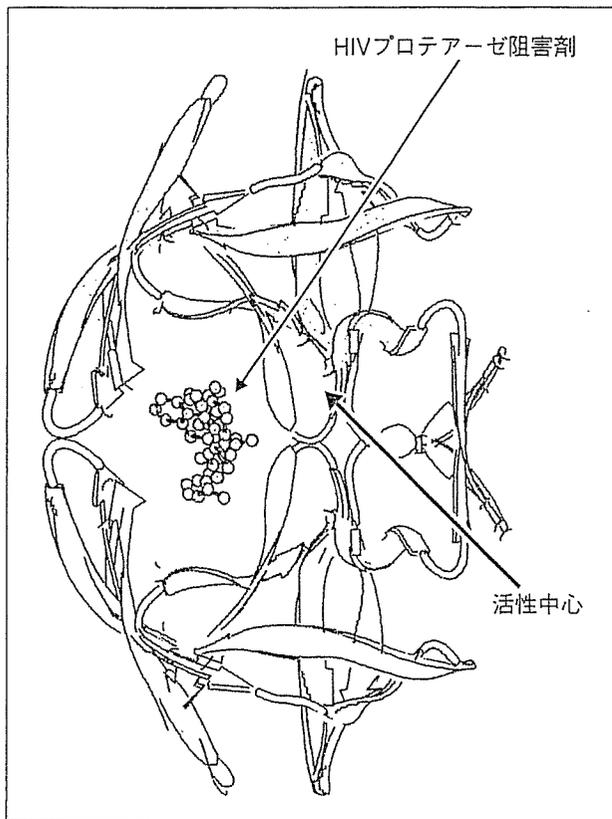


図3 蛋白構造に基づくHIVプロテアーゼ阻害薬の作用機構

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

ても、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る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

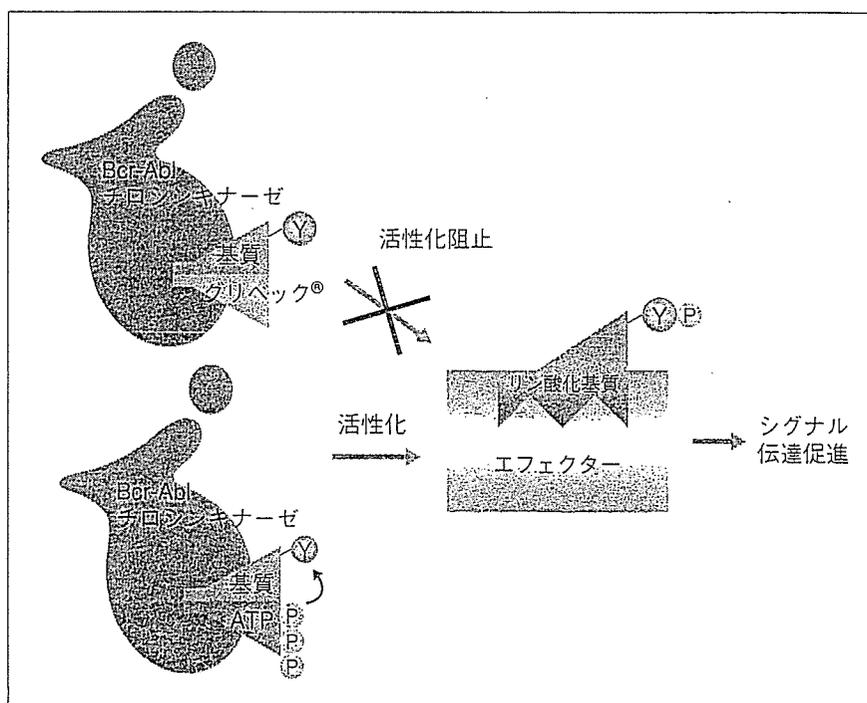


図4 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

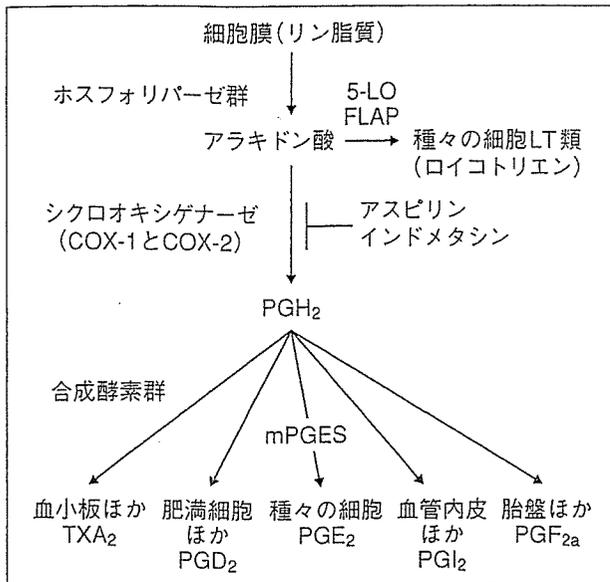


図 5 プロスタグランジン産生系

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 constiutive enzyme よばれ, 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, 炎症巣の 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 を阻害する薬物の開発は, 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

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・情報理工医学)
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心臓生理部, 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

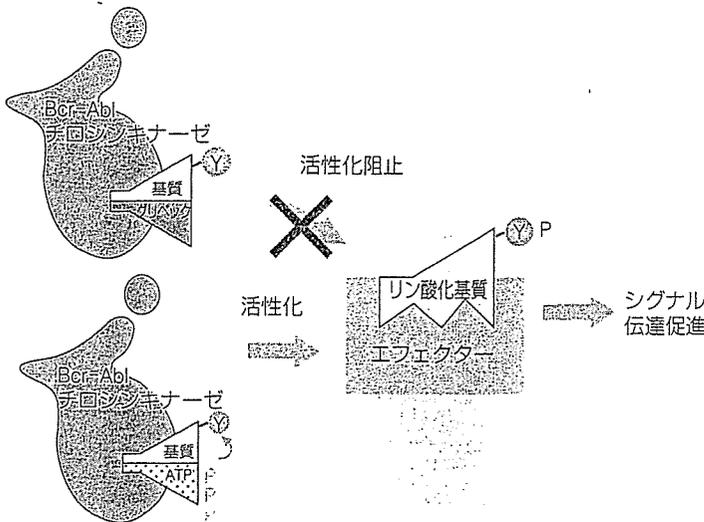
構造生物学, 創薬, 分子標的薬, 特発性心筋症, テーラーメイド医療

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



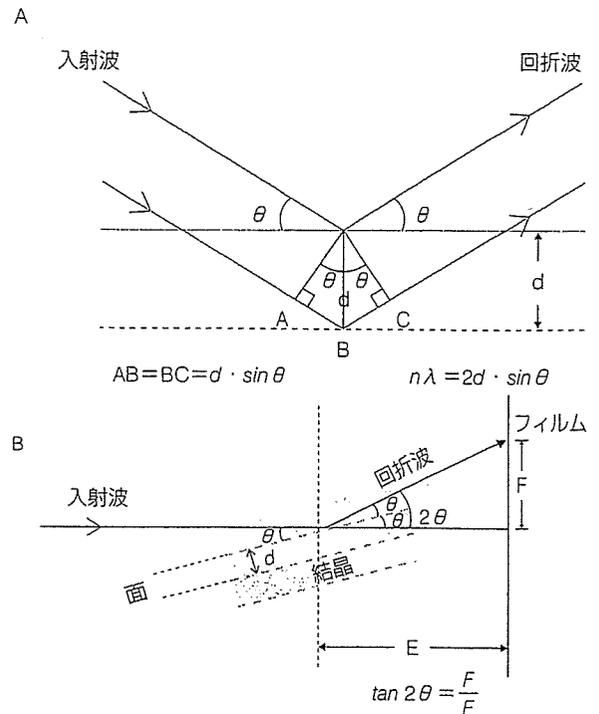
図① 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

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 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(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⁾

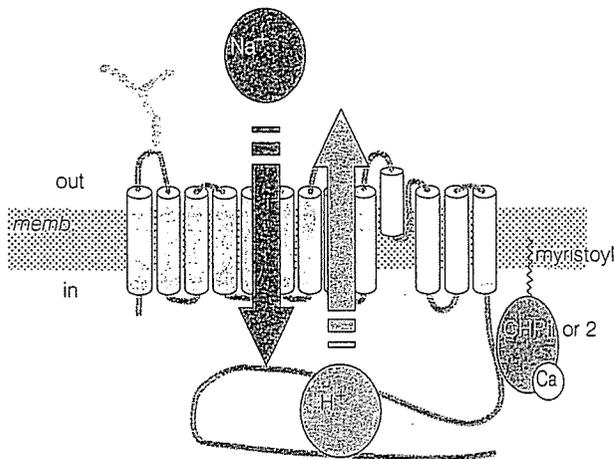
同一分子 (単位格子) が多数集まってつくる規則正しい反復構造に X 線を照射し、回折された X 線をつくるパターンから個々の分子の構造を決定する方法を蛋白結晶構造解析と呼ぶ。単位格子の反復構造とは同形の箱が積み上げられた状態を想像するとわかりやすい。同形の箱には 1 ないし複数個の蛋白分子が含まれていると考えられる。実際に蛋白結晶を作製するためには 97% 以上の高純度の蛋白溶液が必要となる。ハンギングドロップ法や結晶化ロボットなどにより結晶が作製される。

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

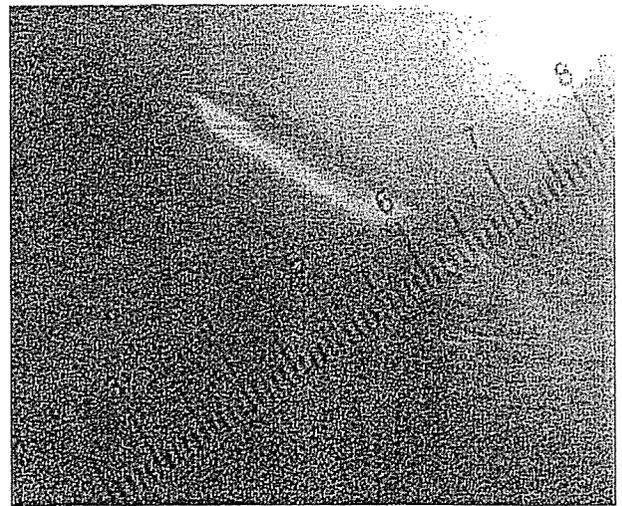


図② X 線回折法による蛋白構造解析の原理
A: Bragg 反射, B: 回折角の決定。

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③ A イオン交換輸送体とその調節因子
(Ammar YB *et al.*, 2006⁹⁾より引用)

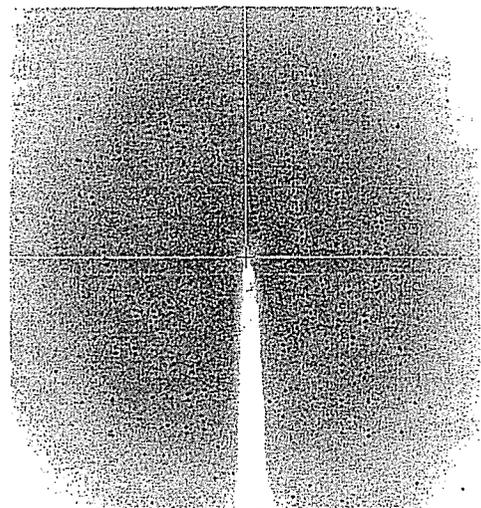


図③ B 複合体の蛋白結晶

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④ 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



図③ 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)、

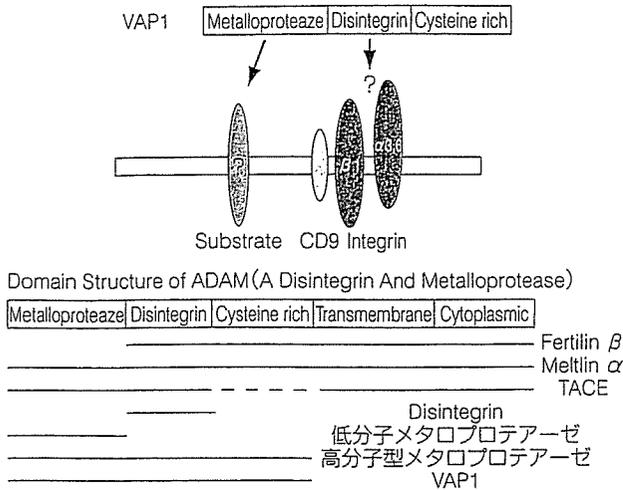


図4 A 血管内皮アポトーシス誘導因子
(Takeda S *et al.*, 2006⁹⁾より引用)

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⁹⁾。

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 H 3) 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 (H 3, H 4 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⁾⁵⁾。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がもてる。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

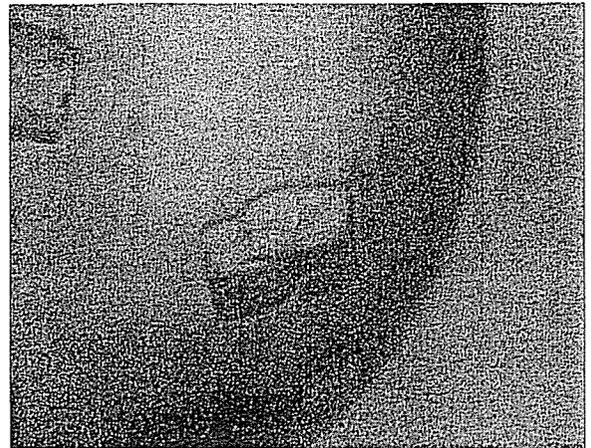


図4 B 蛋白結晶

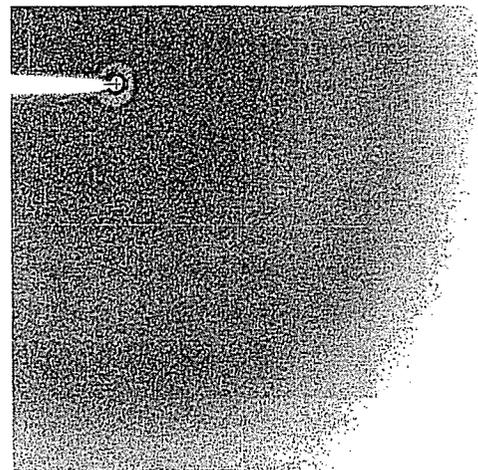


図4 C X線回折像

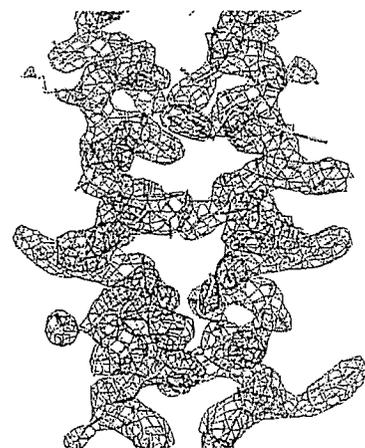


図5 放射光 X 線回折像から得られた電子密度図
ヒト心筋トロポニン複合体の電子密度図 2.6 Å 分解能。

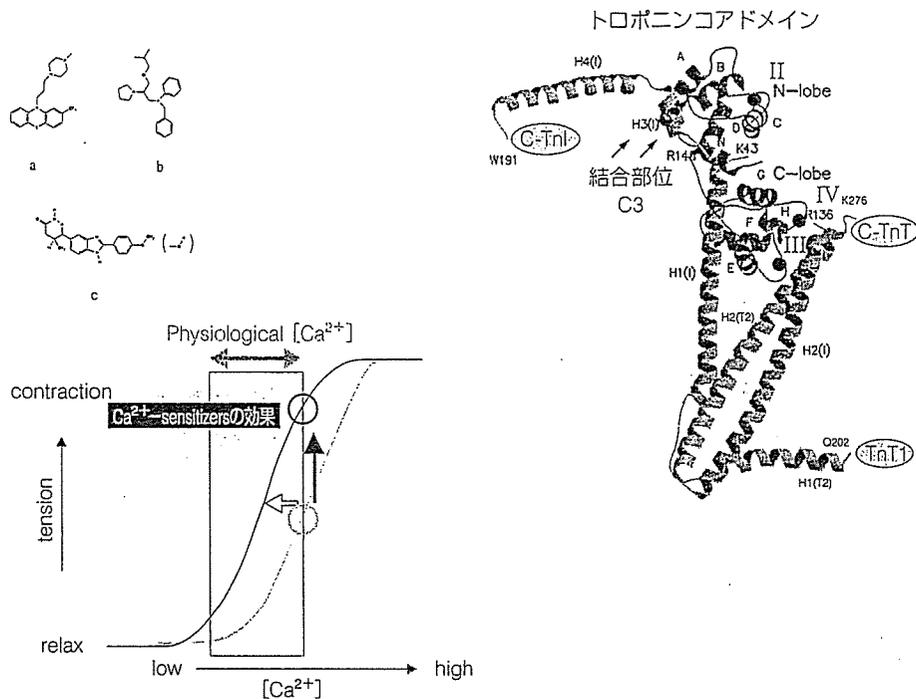


図6 トロポニンCドメインの構造と Ca²⁺センシタイザー

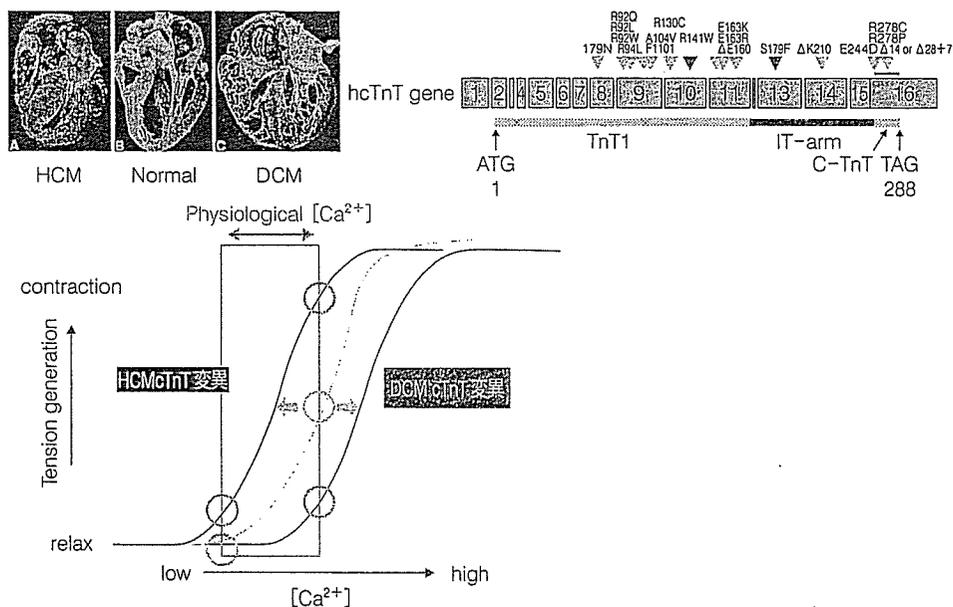


図7 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋 Ca²⁺感受性

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Ca²⁺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、Ca²⁺イオン濃度—張力関係の左方シフト、すなわちCa²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺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8 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8 B)、その結晶構造をX線回折法(図8 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Ca²⁺部位をY³⁺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2.8Å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機構が明らかになった。構造に基づく機能解析によってCHP2がCa²⁺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⁾、それらの分子機構の解明の端緒となる可能性がある(図9 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9 B)、放射光X線回折法で構造を2.5Å分解能で解明した(図9 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

ます。



文献

- 1) Drucker BJ *et al* : Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 2 : 561-566, 1996
- 2) Branden Carl *et al* : *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing Inc. New York, 1999, pp. 373-383
- 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) Takeda S *et al* : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature* 424 : 35-41, 2003
- 5) 前田雄一郎ほか : トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム. *タンパク質 核酸 酵素* 48 : 500-512, 2003
- 6) Lee JA *et al* : Effects of pimobendan, a novel inotropic agent on intracellular calcium and tension in isolated ferret ventricular muscle. *Clinical Science* 76 : 609-618, 1989
- 7) Nieminen MS *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 Cardiology. *Eur Heart J* 26 : 384-416, 2005
- 8) Ammar YB *et al* : Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation. *EMBO J* 25 : 2315-2325, 2006
- 9) Takeda S *et al* : Crystal structure of VAP1, a snake venom metalloproteinase/disintegrin/cysteine-rich protein. *EMBO J* : 2006 (in press)
- 10) Black RA *et al* : A metalloproteinase disintegrin that releases tumour necrosis factor- α from cells. *Nature* 385 : 729-733, 1997

MORI Hidezo

国立循環器病センター研究所心臓生理部長
もり・ひでぞう
慶應義塾大学医学部卒業。
慶應義塾大学大学院医学研究科修了。
慶應義塾大学医学部・助手, 国立埼玉病院循環器科医長,
東海大学医学部講師・助教授を経て, 国立循環器病センター
研究所心臓生理部長 (2000年10月)。
大阪大学大学院医学系研究科招聘教授, 東海大学医学部非常
勤教授を兼務 (2004年4月)。
研究テーマ : 微小循環, 再生医療, ナノメディシン。

ナノレベルイメージングによる 分子構造と機能の解析

盛 英三¹ 望月直樹¹ 武田壮一¹
井上裕康² 中村 俊³ 土屋利江⁴

Nano-level imaging for analyzing protein structure and function

¹Hidezo Mori, ¹Naoki Mochizuki, ¹Soichi Takeda,

²Hiroyasu Inoue, ³Shun Nakamura, ⁴Toshie Tsuchiya

¹National Cardiovascular Center Research Institute

²Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University

³National Center of Neurology and Psychiatry

⁴National Institute of Health Sciences

Abstract

The present manuscript outlines the nano-level imaging project, which is under promotion by the three national research institutes and supported by a research grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (nano-001). This research project targets collecting fundamental information regarding comprehensive understanding of cardiovascular, neurological and the other disorders, developing new diagnostic and therapeutic methods by visualizing protein structure and function in atomic (sub-nano level) or molecular (nano-level) resolution. The results of the current projects will be extended into drug design, clinical diagnostic technology and medical materials in near future.

Key words: nano-technology, structural biology, drug design, protein crystallography, tailor-made medicine

はじめに

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

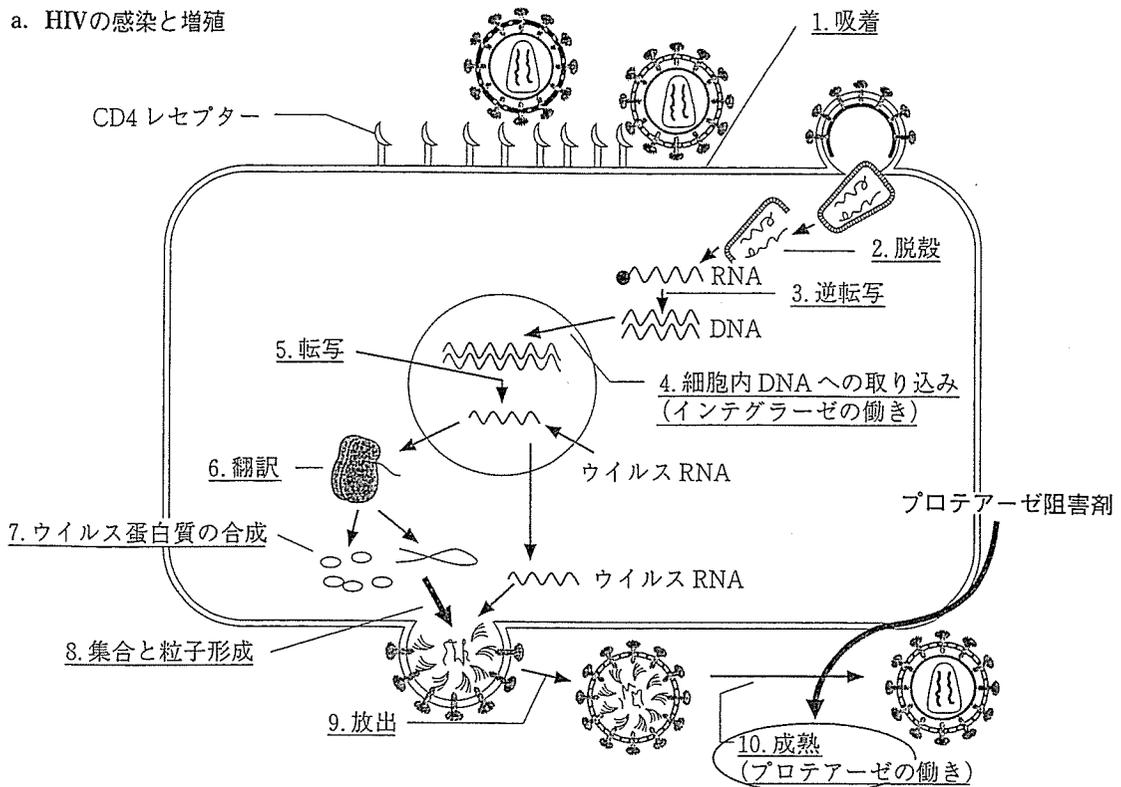
ラーメイド医療実現のための基盤技術の形成を目指している。

本稿では蛋白構造イメージングを中心に概説する。

1. 創薬に貢献した分子構造イメージング

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。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

¹国立循環器病センター研究所 ²奈良女子大学生生活環境学部 ³国立精神神経センター ⁴国立医薬品食品衛生研究所



b. HIVプロテアーゼの構造と阻害剤の設計

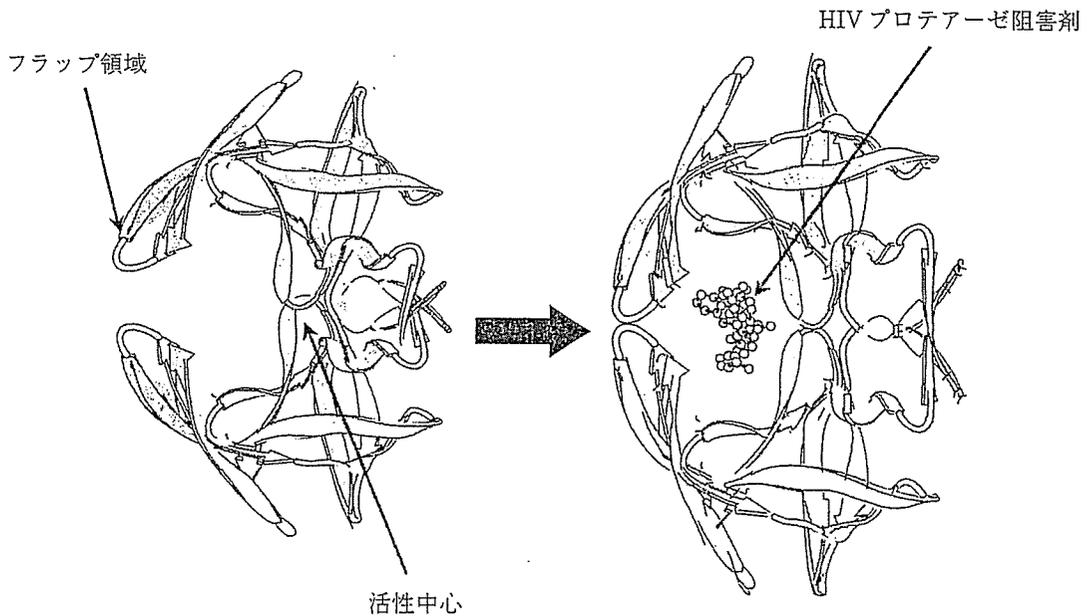


図1 AIDSウイルスの増殖過程と蛋白構造に基づく HIVプロテアーゼ阻害薬の作用機構

テアーゼ阻害薬), 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(図1-

a)。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1-b)。本剤はAIDSの発症を遅らせることに貢献した¹⁾。

慢性骨髄性白血病ではフィラデルフィア染色

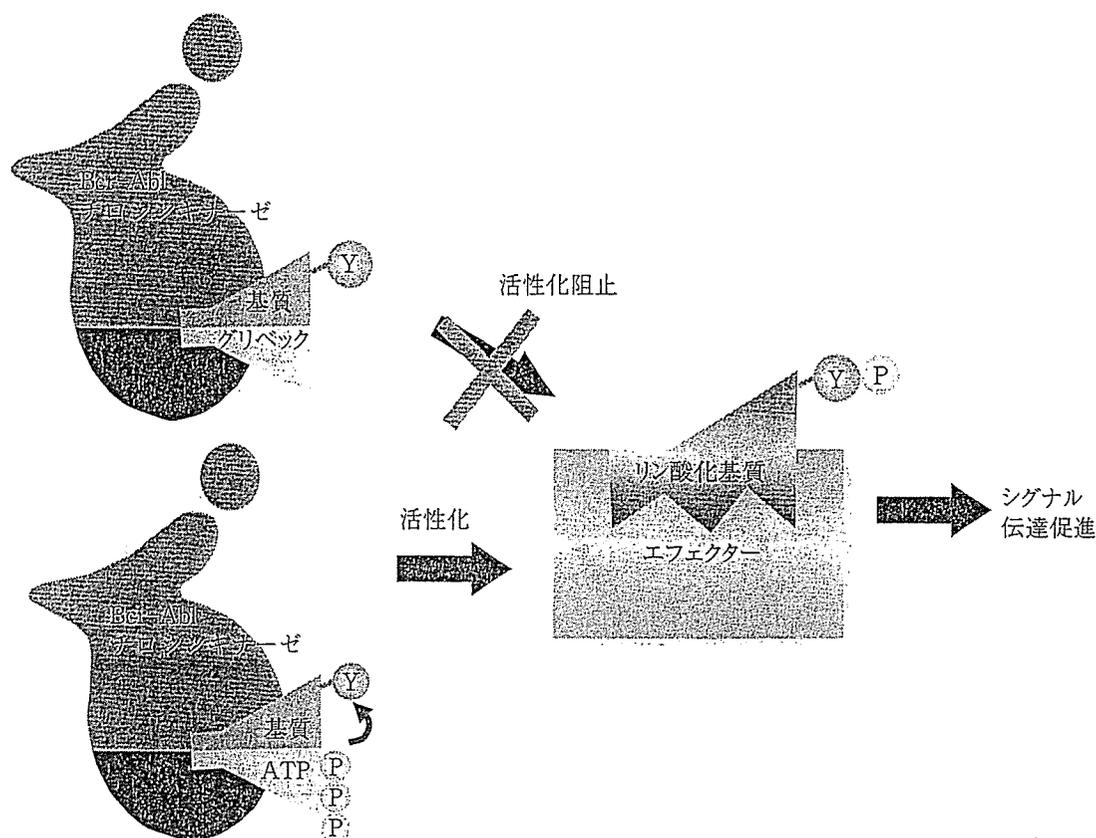


図2 慢性白血病治療薬(グリベック)の蛋白構造に基づく作用機構

体に由来する Bcr-Abl 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慢性骨髄性白血病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 から切り離し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2)²⁾。

このような構造に基づいて薬剤設計を行うことで標的蛋白との結合の特異性を高め、副作用を減少させることを期待できる。

2. ヒト心筋トロポニンの構造解析とそれに基づく創薬の可能性

心筋収縮を調節する心筋トロポニンの中核部分(コアドメイン)の構造は分担研究者である武田と理化学研究所の前田らによって解析され、Nature 誌に報告された(Vol 424, 2003)³⁾。前田らの総説⁴⁾に基づき、トロポニンの筋収縮調節

メカニズムについて述べる。

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3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, TnI, TnT と呼ばれる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⁵⁾。

トロポニンのコアドメインは更に調節頭部と 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

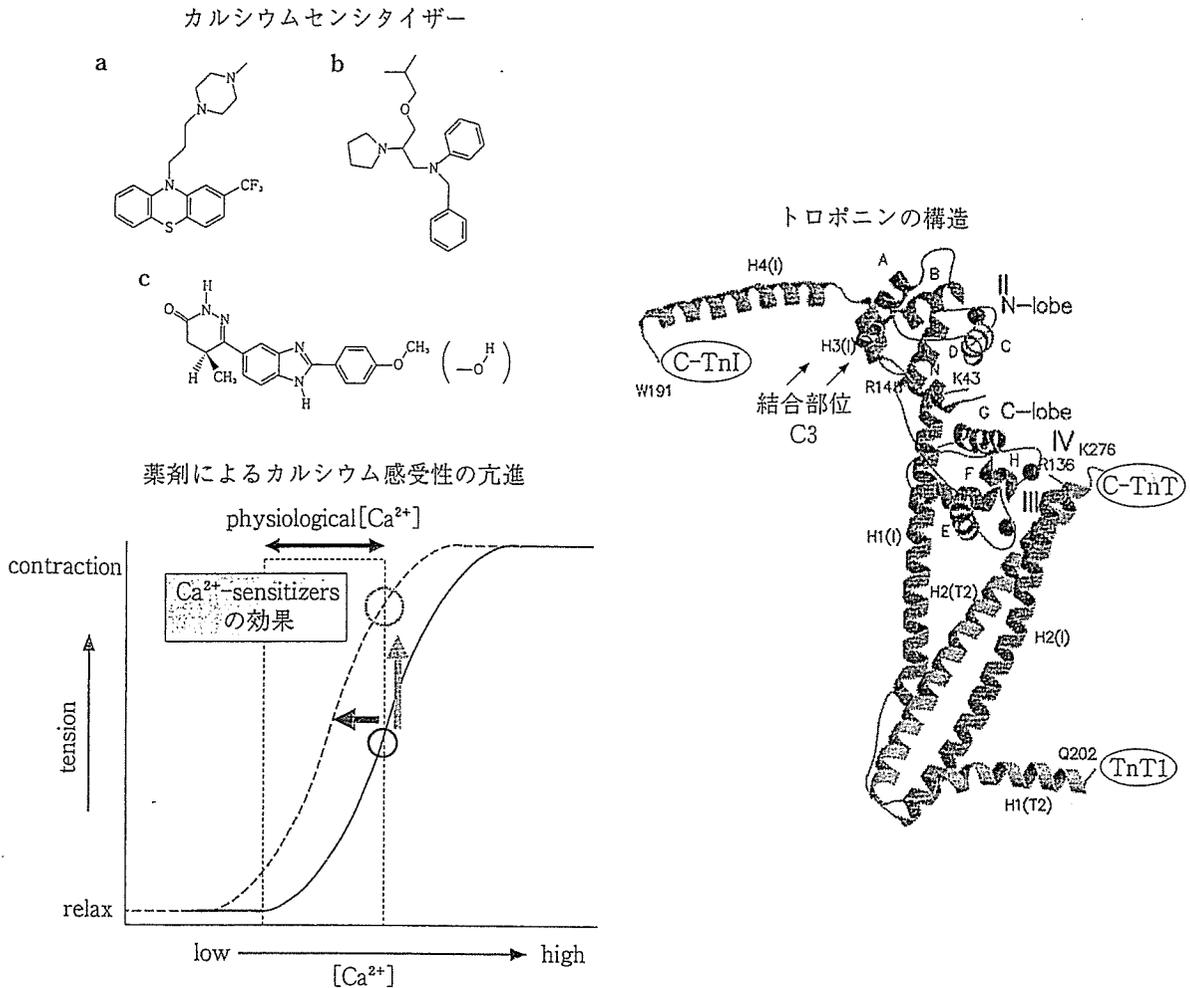


図3 トロポニンCアドメインの構造(文献⁹⁾より改変引用)

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の第二結合部位(両親媒性 α ヘリックスH3)を結合する。これにより、TnIの調節領域全体がトロポミオシン/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末端側球状部にカルシウム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の第二結合部位を結合しやすくなる。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。近年循環器領域では血管作動性薬剤で優れた新薬が数多く開発されてきたが、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呼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、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⁹⁾。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。これらのカ