

取り組み Proc Natl Acad Sci などの雑誌に研究成果を報告している¹⁰⁾。

おわりに

本ナノメディシンプロジェクトでは循環器治療の中核施設である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目指している。ナノ DDS 技術や分子機能イメージング技術に関する研究を併せて推進することで、特異的な分子治療薬の分子輸送技術開発と他の分子との相互作用の可視化技術を推進することが可能となる。これにより、分

子診断・分子治療・分子評価を包含するテーラード医療の基盤形成に貢献したい。

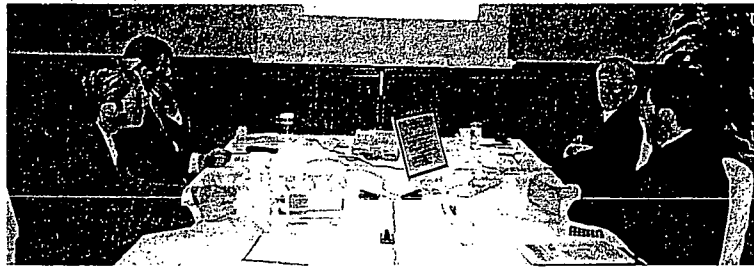
謝辞 本原稿の執筆内容は本研究グループの成果を元にしております。国立循環器病センター研究所若林繁夫分子生理部長およびユースフ・ベン・アマー同研究員、増田道隆循環器形態部室長、柴田洋之心臓生理部同室員、五十嵐智子同研究員、松原孝宜同研究員、大阪大学月原富武教授、理化学研究所宮野雅司主任研究員に感謝いたします。また、本原稿編集と英文作成に協力していただいた東本弘子女史、松尾千重女史に感謝します。

参考文献

- 1) Patick AK, 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.
- 2) Drucker BJ, 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.
- 3) Takeda S, et al: Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺ saturated form. *Nature* 424: 35-41, 2003.
- 4) 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. *蛋白質核酸酵素* 48: 500-512, 2003.
- 5) 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. *日薬理誌* 118: 147-158, 2001.
- 6) Lee JA, 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.
- 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) Mukherjee D, et al: Risk of cardiovascular events associated with selective cox-2 inhibitors. *JAMA* 286: 954-959, 2001.
- 9) Mochizuki N, et al: Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001.
- 10) Itami C, et al: Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of silent synapses in developing mouse barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13069-13074, 2003.

座 談 会

ナノメディシン・プロジェクト —厚生労働省指定型ナノメディシン・ プロジェクトを中心に—



【写真左より馬場嘉信先生、盛 英三先生、菅 弘之先生、杉町 勝先生】

出席者（発言順）

菅 弘之 国立循環器病センター研究所/司会

盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部

馬場 嘉信 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野

杉町 勝 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

■ はじめに；厚生労働省指定型ナノメ ディシン・プロジェクトの概要説明

菅 ■本日は「ナノメディシン (nanomedicine)・プロジェクト」というテーマで厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクトを中心に、このプロジェクトに深くかかわっていらっしゃる先生方にお集まりいただき、お話を伺いたいと思います。

まずはじめに、「ナノメディシン・プロジェクト」の概要について説明いたします。ナノメディシン・プロジェクトは、2002年（平成14）年から5年間の予定で、厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究として開始されました。指定型研究と公募型研究からなり、指定型研

究では、国立高度専門医療センター（循環器病、がん、精神神経、成育医療、国際医療）、国立医薬品食品衛生研究所、財団法人医療機器センターなどの厚生労働省関係機関や大学、民間企業などの研究者が積極的に産学官連携をし、研究をおこなっています。そして、そのプロジェクトリーダーを私が務めさせていただいております。

プロジェクトは、本日ご参加いただいている盛英三先生が中心となっておこなっている超微細画像（ナノイメージング）、杉町勝先生が中心となっておこなっている微小医療機器・操作技術開発（ナノデバイス）、そして国立国際医療センターの山本健二先生が中心となっておこなっている薬物搬送システム（drug delivery system：DDS）、馬場嘉信先生が研究協力者としてご参加されて



菅 弘之先生

国立循環器病センター研究所長/
厚生労働省指定型ナノメディ
ン・プロジェクトリーダー

すが・ひろゆき
1941年、岡山県生まれ。
1960年、岡山朝日高等学校卒業。
1966年、岡山大学医学部医学科
卒業、医学士。
1970年、東京大学大学院医学系
研究科博士課程修了、医学博士。
東京医科歯科大学医
器材研究所生体計測講座助手。
1971~1973年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Postdoctoral Fellow。
1975~1978年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Assistant Professor。

1978~1982年、国立循環器病センター研究所心臓生理部長。
1982~1991年、同研究所循環動態機能部長。
1991~2000年、岡山大学医学部生理学第二講座教授。
2000年より現職。
専門：循環生理学、とくに心臓生理学および医用工学。なお、ナノメ
ディン関連では、拍動心臓内のクロスブリッジ動態のX線回折研究。
研究テーマ：心臓力学および心臓エネルギー学の統合的分析。
趣味：旅行、ドライブ、電気電子工作。
好きな言葉：初志貫徹、余人をもって代え難し、など。
E-mail: hsuga@ri.ncvc.go.jp
E-mail & PVA Club HP: <http://www.eonet.ne.jp/~emaxpva/>

おり、医療機器センターの長谷川慧重先生が中心となっ
ておこなっている基盤データベース研究・技術評価の4
本の柱からなっています。スタート時より府省連携、省
庁横断、医工連携、産学官連携などの方針に沿って進め
ております。

プロジェクトは現在5年目です。2006年度いっぱい
で、この指定型研究はひとまず終わりを告げますが、2006
年度から第3期科学技術基本計画にも沿ってプロジェク

トを進めております。

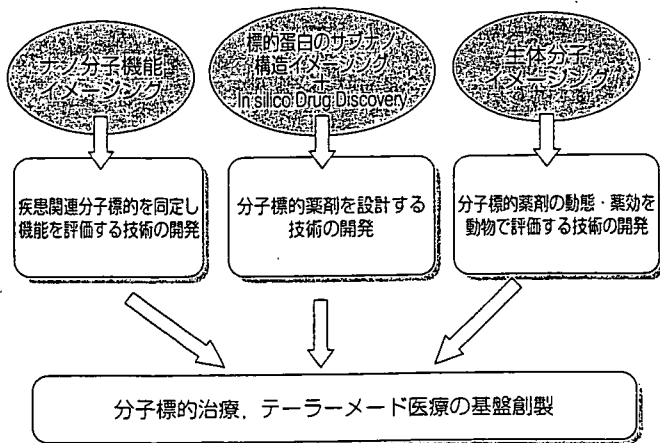
■ ナノイメージングの目的、進捗状況、 具体的成果

1) 分子標的治療の基盤としてのナノレベルイメージ ング

菅 ■ それでは、まず、盛先生から「ナノレベルイメー
ジングによる分子の機能および構造解析」についてご説
明ください。

盛 ■ われわれの研究テーマは「ナノレベルイメー
ジング」というものです。ナノレベルイメージングをいい
かえすと「蛋白分子の超微細画像技術」となります。
この蛋白分子の超微細画像技術、これは機能と構造の両
面をもっておりますが、これを中核として、将来求めら
れている分子標的医療の基盤技術を創製しようというも
のです。このなかに含まれるものは、蛋白分子の構造イ
メージング、蛋白分子の機能イメージング、そして、大
動物を用いた分子イメージングが包含されています。

図①に示すように、個別にみていきますと、1番左のナ
ノ分子機能イメージングでは、分子の機能を可視化する
ことによって疾患関連分子を治療の標的として同定する
ことを目的とします。そして、標的蛋白のサブナノ構造
イメージングと、*in silico* のドラッグディスカバリーを
組み合わせますと、分子標的薬剤を設計する基盤技術が
できます。このようにしてつくられてきた分子標的薬剤



図① 分子標的治療、テーラーメイド医療の基盤創製
(盛英三先生よりご供与)

を大動物レベルで検証する技術が生体分子イメージングです。これらの3つの基盤技術を融合させることで、分子標的治療、あるいはテーラーメイド医療の基盤をつくらうと考えています。

本日は、分子構造イメージングを中心に説明させていただきます。分子標的薬剤の例として挙げますのは、ノバルティスファーマ株式会社が開発した、慢性白血病の治療薬グリベック®です。慢性白血病では、白血球において、ATPのリン酸基が特定のチロシン残基をリン酸化することによって基質の活性化がおこなわれます。このシグナルが下流に伝達されていくことによって、白血球の白血病化が起こります。

グリベック®は、チロシンキナーゼのATP結合部位に構造特異的に設計されておりますので、選択的に白血病発症にかかわるチロシンキナーゼに結合します。これによってATPが結合による基質のリン酸化が起らなくなり、白血球の白血病化が阻止されることとなります。このような構造特異的にデザインされた薬剤は標的蛋白に特異的に結合しますので、副作用が少なく、効率のよい治療効果をもつことが知られています。

2) 薬剤設計の基盤となる分子構造イメージング

盛 丸われわれは、基本疾患関連の標的となる蛋白の構造をまず解析し、その活性中心の構造に適合する薬剤を設計するという事を通じて、分子標的治療薬の開発に資するようになりたいと考えています。その1例として、心筋の収縮の調節をしているトロポニンの構造と、その構造から導かれる創薬の可能性について説明します。

本誌特集の私の稿にある図(p.18図⑥)は、われわれの分担研究者である武田壮一研究員が3年ほど前に“Nature”誌に発表したトロポニンのコアドメインの構造です。トロポニンは3つのドメインからなっています。図の赤い部分が収縮全体を調節しているトロポニンCと呼ばれる部分、黄色い部分がトロポミオシンに結合するトロポニンT、そして青い部分がトロポミオシンをアクチンフィラメントに結び付けているトロポニンIというドメインです。

この図は、カルシウム(Ca²⁺)が結合していわゆる興奮状態にあるトロポニンのコアドメインの構造です。ト



盛 丸 武田 壮一

国立循環器病センター研究所心臓生理部長/厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクト ナノイメージング主任研究者

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。

ロポニンIの一部がトロポニンCに結合しています。この状態では、このトロポニンIのアクチンフィラメントに対する抑制作用がとれていますので、アクチンフィラメントとミオシンの滑り運動が始まっている状態の構造を示しています。Ca²⁺センシタイザー(calcium sensitizer)と呼ばれているいくつかの薬剤が知られています。これらの薬剤がトロポニンに結合すると、心筋ファイバーのCa²⁺—張力関係が左側にシフトします。すなわち、Ca²⁺感受性の亢進が起こることが知られています。

この複合体の構造を詳細にみてみます。トロポニンCにCa²⁺センシタイザーが結合するとトロポニンCが開いた構造をとり、トロポニンIが結合しやすくなります。すなわち、トロポニンIによるアクチンフィラメントの滑り運動の抑制機構が外れやすくなるということになります。

このようなメカニズムでCa²⁺感受性の亢進が起こるわけです。このように原子レベルでの複合体の構造がわかってくると、Ca²⁺センシタイザーがトロポニンCのどのアミノ酸残基と相互作用を起こしているのかを調べることもできます。従来のCa²⁺センシタイザーの問題点は、トロポニンCに選択的に結合するだけではないということです。フォスフォジエステラーゼやカルモジュリンなど、ほかの蛋白ともこれらの薬剤が結合してしまうということでした。これは、見方を変えれば、作用が特異化されていない、すなわち副作用を起こしやすいという原因になっているわけです。蛋白構造に基づいて薬剤設計をすれば、トロポニンCだけに選択的に結合する薬剤の設計ができる可能性があります。すなわち、低Ca²⁺



馬場嘉信先生

名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野/厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクト 基礎データベース作成研究協力者

ばば・よしのぶ

1958年、熊本県生まれ。
1977年、熊本県立人吉高等学校卒業。
1981年、九州大学理学部化学科卒業。
1986年、九州大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。
日本学術振興会特別研究員。

大分大学教育学部助手。
1988年、大分大学教育学部講師。
1990年、神戸女子薬科大学薬学部講師。

1996年、神戸薬科大学薬学部助教。
1997年、徳島大学薬学部教授。
2002年、産業技術総合研究所単一分子生体ナノ計測研究ラボ長併任。
2004年、名古屋大学大学院工学研究科教授。
2005年、産業技術総合研究所健康工学研究センター副センター長(バイオナノ研究統括) 併任。
現在に至る。
専門：応用計測化学、マイクロ・ナノ科学。
研究テーマ：次世代バイオナノデバイスの創成、テーラーメイド医療、1分子・1細胞操作。
ナノバイオテクノロジーが医学に貢献できるような研究分野に育っていくことを夢見ています。
研究室HP：<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/index.html>

で収縮を高めることができる理想的なCa²⁺センサーの設計に道を開く可能性があると考えています。

トロポニンの構造解析は肥大型心筋症(HCM)、拡張型心筋症(DCM)といわれる難治性の心筋の治療法開発につながる可能性があります。これらの疾患は患者さんをしばしば心臓移植に追い込むことで知られています。HCMでは、トロポニンに遺伝子異常が高頻度に認められるということも知られています。HCMの変異トロポニン蛋白をつくり、それを導入したスキンドファイバーでCa²⁺—張力関係を調べてみますと、Ca²⁺感受性の亢進、すなわち、Ca²⁺—張力関係の左方へのシフトが生じます。一方、収縮力の低下で知られるDCMのミュータントを導入しますと、右方シフト、すなわちCa²⁺感受性の低下を起こす方向に、このCa²⁺—張力関係が移動します。

これらのCa²⁺感受性の異常が心筋症の発症と密接にかかわっているものだとすると、これらの変異蛋白の構造を補正するような薬剤、変異蛋白に特異的な薬剤を設計すれば、HCMにおける異常な心筋肥大を正常の心筋の状態に戻すという夢のような治療の開発も夢ではない

のではないかと考えています。

次の例として、細胞膜にあり、ナトリウムイオンと水素イオンを交換しているイオン交換輸送体の制御因子の構造解析の結果について説明します。ソディウム・プロトン・エクスチェンジャー(sodium-proton exchanger/sodium-hydrogen exchanger: NHE)は細胞膜にあり、細胞中の水素イオンをくみ出すことにより、細胞内のイオン環境をアルカリ性に傾いた方向に保つ役割があります。NHEがはたらくためには、その細胞内ドメインにカルシニューリンBホモログス・プロテイン(calcineurin B homologous protein: CHP)が結合する必要があります。この物質が結合して初めて、このナトリウムとプロトンの交換機序がはたらきはじめるのです。

このCHPにはさまざまなアイソフォームが知られています。CHP1はさまざまな組織に存在しています。一方、CHP2は癌細胞に特異的に発現します。細胞内のイオン環境がアルカリ性に保たれると細胞増殖が誘導されます。ですから、このCHP2に特異的に結合するような薬剤を開発し、このNHEのはたらきを制御することで、癌の増殖を抑制できる可能性があると考えています。

本誌特集の私の稿にある図(p.16図③BC)は、われわれが構造解析したCHP2とNHEの細胞内ドメインの複合体の細胞とX線回折像です。NHEの細胞質ドメインの一部がCHP2にはまり込む構造を確認しました。この構造に特異的に結合する薬剤を開発することができれば、CHP2がNHEと結合できなくなることを通じて、NHEのイオン交換作用を癌細胞で特異的に制御することができます。すなわち、その癌細胞の増殖を抑える可能性がみえてくるわけです。

次に、ADAMファミリー蛋白と非常に相同性をもった蛇毒の構造解析の結果を紹介します。これらの構造解析から、血管内皮のアポトーシスのメカニズム、あるいは血栓形成のメカニズムについて大きな進展が得られる可能性があります。また、このほかにも6本のαヘリックスから構成されるBAR(Bin-Amphiphysin-Rvsp)ドメインという構造をもった蛋白質群を3つの構造を解析しています。

3) 分子機能イメージング

盛 ■分子機能イメージングの紹介に移ります。サイクリック AMP を介して血管内皮細胞の細胞間接着が増強されるメカニズムとして、従来はプロテインキナーゼ A を介した機構が知られているだけでした。国立循環器病センター研究所循環器形態部の望月直樹先生のグループは、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) と呼ばれる、細胞内の分子を可視化する方法を用いてサイクリック AMP を介した新たな細胞間接着の増強メカニズムを示しました。

FRET 現象が陽性の部分、Rap1 と分子の活性化を可視化することに成功しました。細胞の接着部位で選択的に Rap1 が活性化されていることが、この FRET イメージングでわかりました。つまり、従来のプロテインキナーゼ A を介した経路のほかに、Rap1 を介して細胞間接着が増強されるというメカニズムを示すことができました。

これらの機能イメージングの総括から、Rap1 を標的とした細胞間接着の増強作用をめざした治療、たとえば、肺水腫に対する血管透過性の治療などを制御するような治療法が生まれてくる可能性があります。

生体分子イメージングにつきましては、PET (positron emission tomography) を用いて、開発された薬剤の動態を大動物で調べる、あるいは大動物レベルでその分子メカニズムを可視化するということによって、いわゆる前臨床研究の面で創薬に役立つイメージング研究ができるのではないかと考えています。

このように、分子機能イメージング、構造イメージング、生体分子イメージングの3つをあわせて推進することによって、分子標的治療、テーラーメイド医療の基盤創製に資するものと考えます。

菅 ■ありがとうございます。何か、ご質問などありますでしょうか。

馬場 ■最初の構造イメージングのところですが、あれはやはりシンクロトロン放射光のような光でなければできないのでしょうか。

盛 ■蛋白の結晶をつくり、シンクロトロン放射光を用いた X 線回折法によって構造解析をするというのが主流だと思います。

最近では、核磁気共鳴法を用いた構造解析法も可能になってきました。この方法の場合には、分子量が2万ですとか2万5千ぐらいのものが上限になります。大きな蛋白の構造解析や、あるいは複合体の構造解析などでは、核磁気共鳴法は放射光を使った結晶構造解析法にまだ一歩劣るところがあるのではないかと考えています。

杉町 ■やはり複合体の結晶をみるというのが、かなり大事なのですね。

盛 ■創薬をするうえでは、複合体の結晶をみることが大事です。一部の蛋白は非常に硬い構造をしていますので、複合体をつくってもつくらなくてもあまり形が変わらないというものがあります。ところが、先ほど紹介したような、Ca²⁺センシタイザーが結合するカルモジュリンなどの蛋白は非常に柔らかい構造をしています。リガンドに対して自分自身の形を変えるという特性をもっています。このようなことを考えますと、やはり複合体の構造解析はどうしても必要になると思います。

菅 ■これは国際的な競争力という観点では、わが国は今どのくらいの位置にいますでしょうか。

盛 ■米国では「蛋白 5000」、わが国では「蛋白 3000」という、網羅的に蛋白の構造を解析しようというプロジェクトが動いています。これらは医療応用に特化していません。ヒト以外の蛋白や疾患に関連していない蛋白も対象となります。われわれのプロジェクトは、医療機関のなかで疾患に関連した蛋白を標的にして構造解析を試みています。このような研究活動は国内にはほとんどないでしょうし、海外でもそれほどの数があるとは思えません。医療に特化した構造解析、構造に基づく創薬という意味では、まだ十分闘う条件が残っているのではないかと思います。

菅 ■ありがとうございます。

■ ナノデバイス (バイオニック) の目的、進捗状況、具体的成果

菅 ■では、次は「ナノデバイス (バイオニック) の目的、目標、進捗状況、具体的成果の説明」を杉町先生、ご解説いただけますでしょうか。



杉町 勝先生

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、生体医用工学。
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 〇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。

ナノを推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。

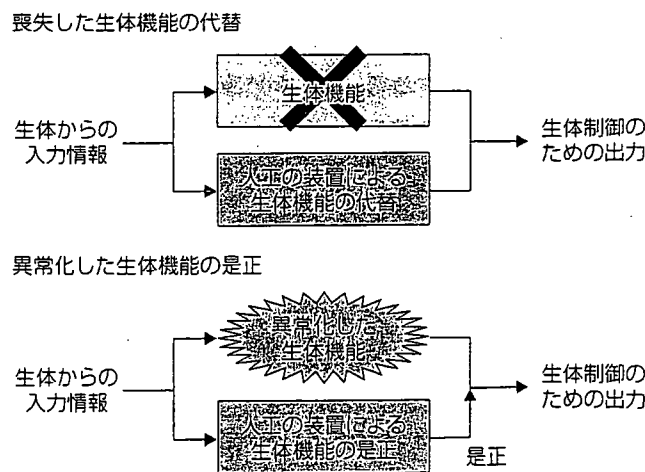
なぜデバイス治療が必要かといいますと、重症慢性疾患の治療には、薬に加えて、治療機器を植え込んで長期間持続的な治療をおこなうことが必要になるであろうということが、1つのポイントです。

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 〇実は、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、起きる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



図② バイオニック医学
(杉町勝先生よりご供与)

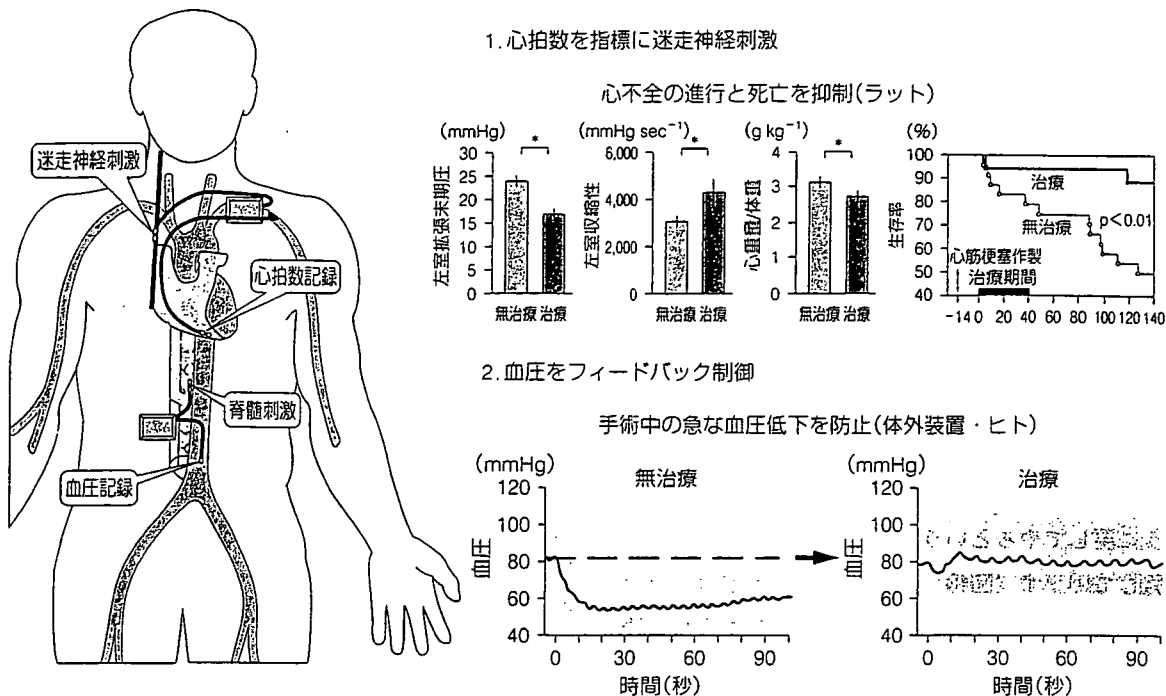


図3 ナノ化すべきデバイス；循環治療バイオンックデバイス (杉町勝先生よりご供与)

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から。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、5cm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、ペーシ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、ナノ材料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材料が、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ということになってくるのかもしれませんが。

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積極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いただけますでしょうか。

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できるよう



- 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, パリティの非保存
- 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。1μm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、800nm以下になってまいりますと、通常の、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、800nm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、800nm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うような、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200~500nm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

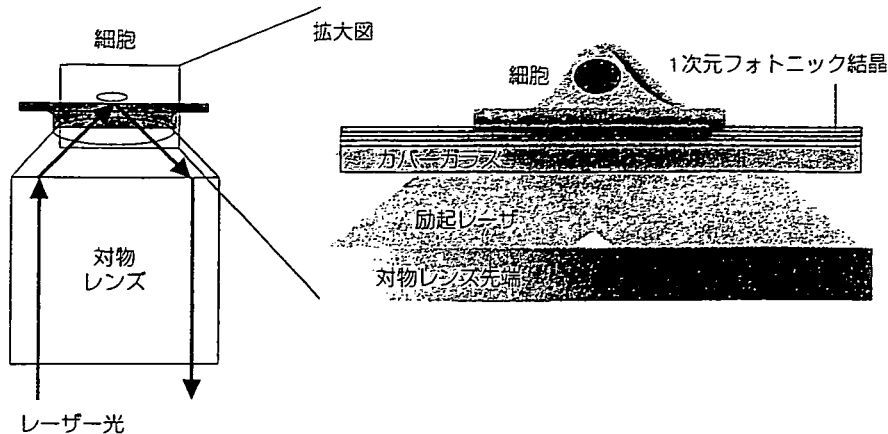


図6 1次元フォトニック結晶—エバネセント光顕微鏡の原理
(馬場嘉信先生よりご供与)

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⁴⁾。

さらに小さくなってきますと、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、量子ドットの材料は、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のやはり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・エネルギー・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といことなのですが、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⁹⁾。

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⁹⁾。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⁹⁾。

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、お話しいただきました。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 ■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 ■杉町先生、ご質問はございますか。

杉町 ■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、そういうふうな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 ■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 ■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 ■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 ■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えます。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、ますます発展が望まれますね。

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

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

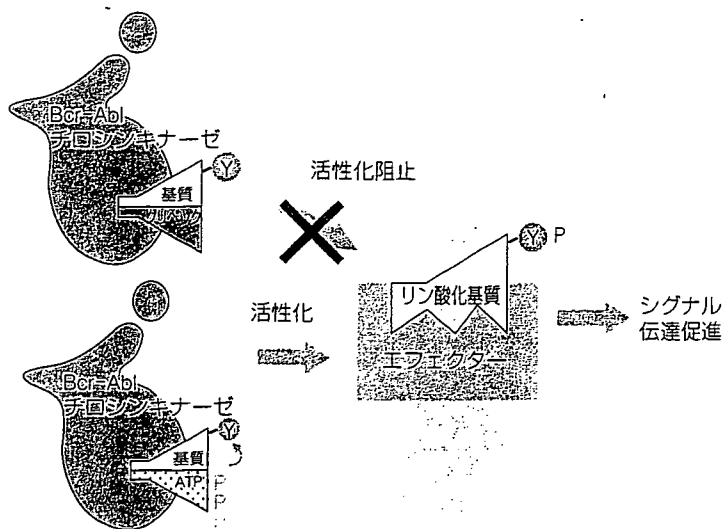


図1 慢性白血病治療薬(グリベック®)の蛋白構造に基づく作用機構

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線の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

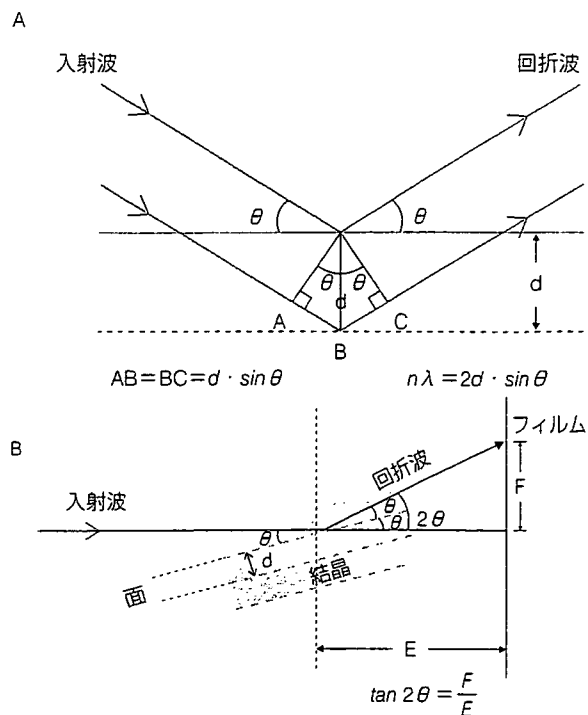
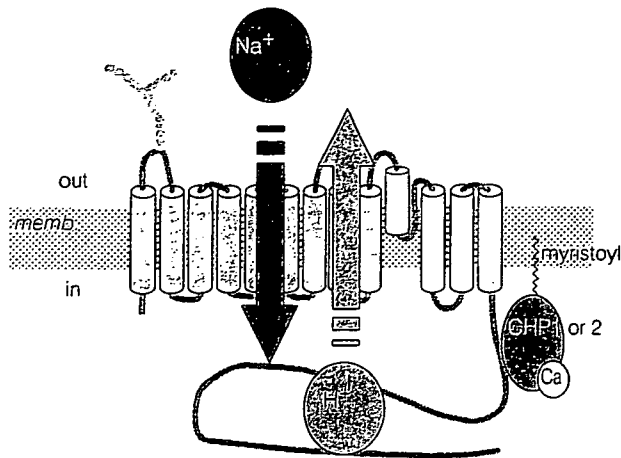
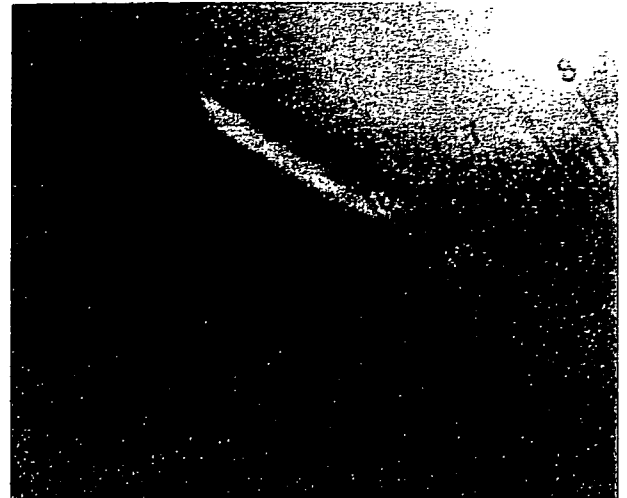


図2 X線回折法による蛋白構造解析の原理
A: Bragg 反射. B: 回折角の決定.

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2A)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・sinθ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(nλ=2d・sinθ)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2B)。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3C④C)。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)

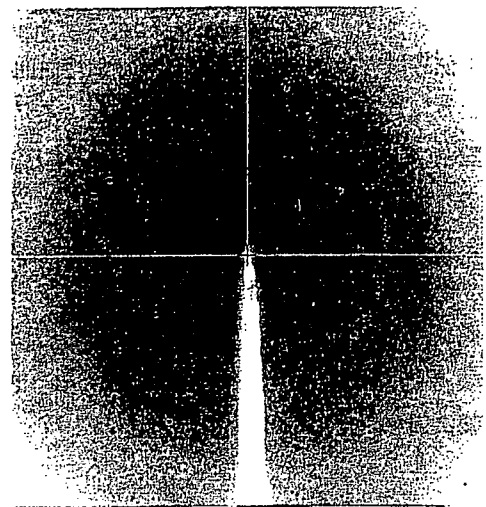


図③ B 複合体の蛋白結晶

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⑥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(Ca²⁺)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)、

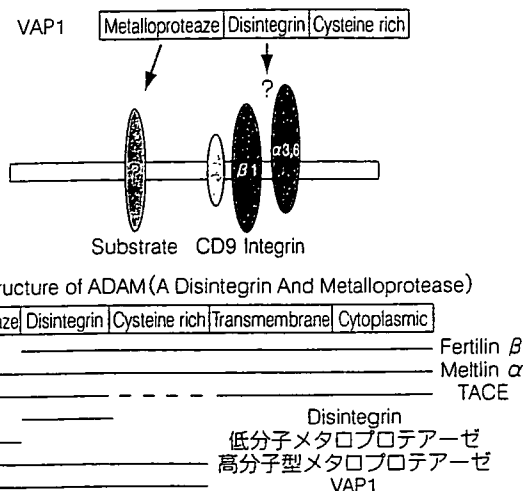


図4 A 血管内皮アポトーシス誘導因子
(Takeda S et al, 2006⁹⁾より引用)

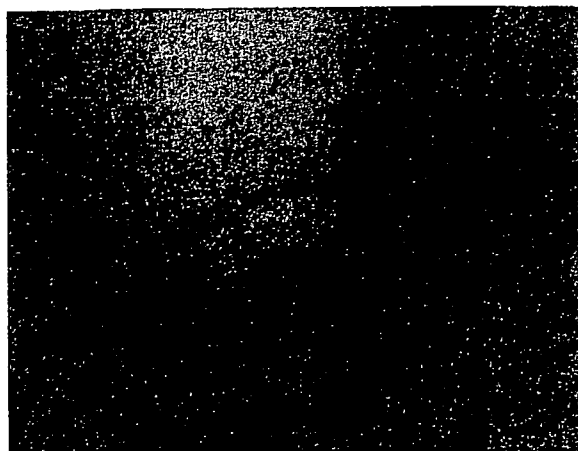


図4 B 蛋白結晶

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⁾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

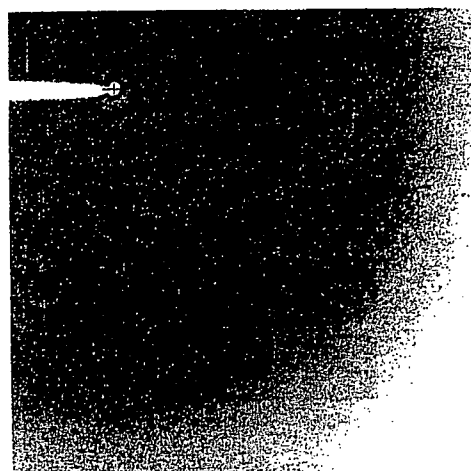


図4 C X線回折像

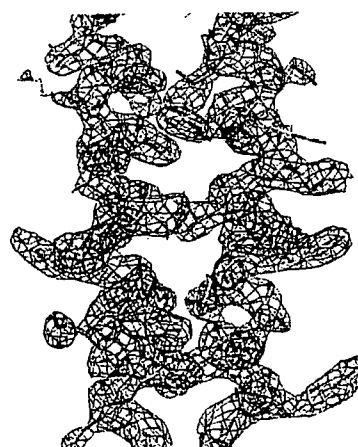


図6 放射光 X線回折像から得られた電子密度図
ヒト心筋トロポニン複合体の電子密度図 2.6 Å 分解能。

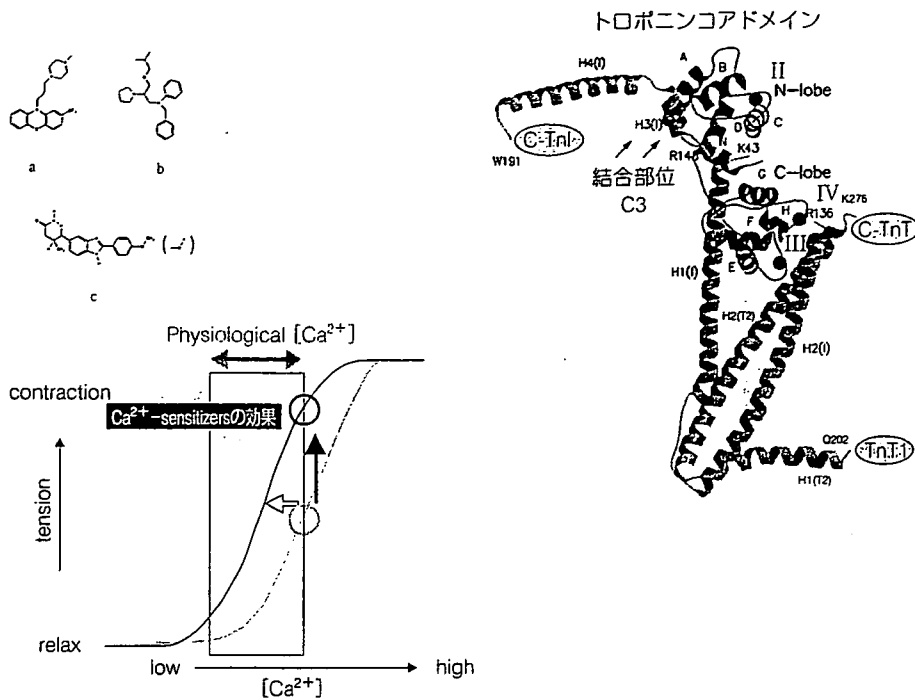


図6 トロポニンCドメインの構造とCa²⁺センシタイザー

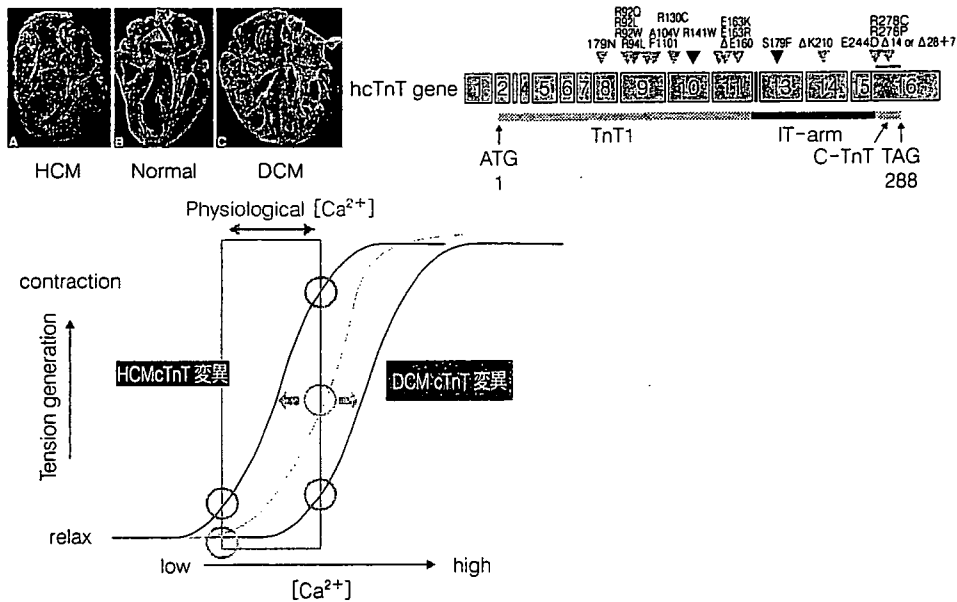


図7 心筋症におけるトロポニンの遺伝子変異と筋Ca²⁺感受性

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⁸⁾。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 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⁾、それらの分子機構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