

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	カプサイシンによるアポトーシス誘導機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	倉森見典
Author(English)	Chikanori Kuramori
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7510号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:半田 宏,山口 雄輝
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7510号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:;
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

カプサイシンによる
アポトーシス誘導機構の解析

生 命 情 報 専 攻
倉 森 見 典

要約

【緒言】

白血病は、ガン化した造血細胞が無制限に増殖して血液中に出現する疾患の総称であり、血液に乗って身体全体に広がる。そのため抗ガン剤による全身治療が求められ、白血病治療において抗ガン剤は不可欠である。1950年代には不治の病であった白血病も抗ガン剤開発や骨髄移植により治療可能な病となった。だが、依然として死亡率4割の重篤な病である。

世界中の製薬企業が抗ガン剤開発を行うも、ガン細胞にのみ効果を示す副作用のない抗ガン剤の開発は困難を極めている。約2万分の1の確率で生み出される新薬。合成化合物・天然物・バイオ医薬品など、ありとあらゆる可能性が試みられている。

日頃我々が摂取している天然物、唐辛子の辛み主成分カプサイシンに抗ガン作用が認められた。そもそもカプサイシンは、辛さや熱さといった感覚を引き起こす作用が知られている。一方で、カプサイシンは白血病細胞に対して、細胞が自ら死のうとする現象”アポトーシス（細胞自殺）”を誘導し、細胞増殖抑制をもたらす事が報告された。カプサイシンは未知のタンパク質と結合することでアポトーシスを誘導する可能性が見出された。化合物が効用を示す際には、その標的因子への結合が必要不可欠である。また、化合物標的因子を見出し、化合物との関わりを解明することは、作用機構の解析や新たな薬剤開発へとつながる。そこで本研究では、カプサイシン細胞内標的因子の探索を行い、その因子の機能解析を通じ、カプサイシンによるアポトーシス誘導機構を解明することを目的とした。

【カプサイシンによるアポトーシス誘導モデル】

カプサイシンの細胞内標的因子として、ミトコンドリアに存在するタンパク質

Prohibitin (PHB) 2 が得られた。ミトコンドリアとは細胞内エネルギーの生産所であり、またアポトーシスの制御中心としての役割も持つ。カプサイシンが PHB2 と結合すると、ミトコンドリアに機能障害および物理的傷害を与えることが明らかとなった。このようなミトコンドリアストレスがアポトーシスを誘導する。

だが、カプサイシンによるアポトーシス誘導はミトコンドリアストレスのみに起因するものではなかった。カプサイシン処理された細胞では、ミトコンドリアに存在する PHB2 が細胞核へ移動することが明らかとなった。核には遺伝子情報である DNA が存在し、生命活動を支えるために DNA から遺伝子情報が読み出されている。PHB2 は核へ移行し、アポトーシスを起こす遺伝子情報を読み出す p53 というタンパク質と結合することで、その働きを促進した。

すなわち、カプサイシンは PHB2 の核移行を促し、p53 を活性化することでアポトーシスを誘導することも明らかとなった。

【結言】

本研究では、カプサイシンという化合物を用いて PHB2 の機能解析を行った。今回新たに PHB2 がミトコンドリア機能を制御すること、p53 活性化機能を有することを見出した。これは PHB2 の持つ新たな機能を示した点で大変興味深い。また、ガン抑制遺伝子 p53 を有する白血病細胞に対して、ミトコンドリアストレスによるアポトーシス、また p53 活性化によるアポトーシスの 2 つのアポトーシス経路を介して、カプサイシンが抗ガン作用を示すことを明らかにした。このような作用機序を利用した、新たな抗ガン剤開発の可能性を示した本研究は大変意義深い。

目次

要約	2
1. 序論 ―白血病治療と capsaicin―	7
1.1. はじめに	7
1.2. 背景	8
1.2.1. 悪性腫瘍（ガン）と化学療法	8
1.2.2. 白血病	10
1.2.3. カプサイシン	12
1.2.4. アフィニティー磁性担体 FG 粒子と自動化精製マシン「Target Angler 8」 13	
1.3. 本研究の目的	18
2. Capsaicin 標的因子探索	25
2.1. はじめに	25
2.2. 材料および方法	26
2.2.1. 細胞培養試薬	26
2.2.2. 細胞株と培養条件	27
2.2.3. 細胞傷害性検出実験用試薬	28
2.2.4. 細胞増殖抑制効果測定	28
2.2.5. NB4 細胞タンパク質ライブラリーの調整	29
2.2.6. Wistar/ST ラット の飼育	30
2.2.7. ラット肝ミトコンドリアおよびミトコンドリアタンパク質ライブラリ の調整	30
2.2.8. Capsaicin 固定化粒子材料および薬剤固定化試薬	31
2.2.9. Capsaicin アミノ基誘導体固定化 FG 粒子の作製	33
2.2.10. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE）	33
2.2.11. アフィニティー磁性粒子 FG 粒子による精製	35
2.2.12. プラスミドベクターの構築	36
2.2.13. C 末 FLAG タグ融合 PHB1 および PHB2 タンパク質の調整	37
2.2.14. ウェスタンブロッティング	38
2.3. 結果および考察	40
2.3.1. FG 粒子固定化用 capsaicin アミノ基誘導体合成	40
2.3.2. Capsaicin アミノ基誘導体の細胞増殖抑制効果検討	40
2.3.3. NB4 細胞質タンパク質ライブラリーからの capsaicin 固定化 FG 粒子によ	

る精製	41
2.3.4. Capsaicin 結合因子の同定	42
2.3.5. ミトコンドリアタンパク質ライブラリーからの capsaicin 固定化 FG 粒子による精製	43
2.3.6. 組換えタンパク質 PHB1 および PHB2 を用いた capsaicin 固定化 FG 粒子による精製	44
2.4. 本章のまとめ	45
3. Capsaicin によるミトコンドリア傷害	55
3.1. はじめに	55
3.2. 材料および方法	56
3.2.1. 試薬	56
3.2.2. プラスミドベクターの構築	57
3.2.3. 免疫沈降法による PHB2-ANT2 相互作用の解析	58
3.2.4. [³ H]-ADP を用いた ANT による ADP 取込み活性測定	59
3.2.5. フローサイトメトリーを用いたミトコンドリア膜電位の測定	60
3.2.6. ミトコンドリアからの cytochrome c および PHB2 放出の解析	60
3.3. 結果および考察	61
3.3.1. 細胞内 PHB2-ANT2 相互作用の阻害	61
3.3.2. 試験管内 PHB2-ANT2 相互作用の阻害	62
3.3.3. Adenine Nucleotide Transporter (ANT) 活性の非競合的阻害	63
3.3.4. ミトコンドリア膜電位の消失	64
3.3.5. Capsaicin によるミトコンドリア傷害	65
3.4. 本章のまとめ	67
4. Capsaicin による p53 活性化	74
4.1. はじめに	74
4.2. 材料および方法	75
4.2.1. 試薬	75
4.2.2. プラスミドベクターの構築	76
4.2.3. 免疫染色法による PHB2 細胞内局在変化の解析	77
4.2.4. 細胞分画による PHB2 細胞内局在変化の解析	78
4.2.5. 免疫沈降法による PHB2-p53 相互作用の解析	79
4.2.6. レポーターアッセイによる p53 依存的転写活性測定	79
4.3. 結果および考察	80
4.3.1. Capsaicin 処理による PHB2 の核移行	80
4.3.2. Capsaicin 処理による PHB2-p53 相互作用の誘導	81

4.3.3. Capsaicin 処理による p53 依存的な転写活性化	82
4.4. 本章のまとめ	84
5. 結論 ―総括および今後の展望―	89
5.1. 本研究のまとめ	89
5.2. 考察	90
5.3. 今後の展望 ～PHB2 を介したミトコンドリア安定性と p53 活性化機構の解 明～	91
参考文献	95
謝辞	99
付録資料	エラー! ブックマークが定義されていません。

1. 序論 —白血病治療と capsaicin—

本研究が対象とする白血病および capsaicin について、その概要を述べると共に本研究の目的を述べる。

1.1. はじめに

生命が誕生して以来約 40 億年を経た。それ以来生命は環境に順応して行く中で突然変異を繰り返し新たな能力を獲得して生き続け、現在地球上には単細胞生物をはじめとして種々の異なる機能を有した細胞からなる多細胞生物まで多種多様な生命が満ち溢れている。だが多細胞生物への進化は「悪性腫瘍（ガン）」との共存の歴史の始まりとも言える。ガンは細胞 DNA の幾重もの突然変異が積み重なって発生する。単細胞生物であればそれは新たな機能の獲得または致死となるが、多細胞生物においてそれは恒常性を乱す異物の発生である。

ヒトの歴史はガンとの闘いの歴史と例えることができる。古代エジプト時代のミイラには、ガンにより死亡した者、外科療法によりガンを取り除いた者なども見られる。現代においても、ガン克服が医療における大きな目標となっている。ガン研究はあらゆる生命現象の理解を深める中で解明への道を進んでいる。中でも「プログラムされた細胞自殺」とも言われるアポトーシスに関する研究はガン治療において重要なトピックである。生命はアポトーシスによる細胞の死によって維持されていると言っても過言ではない。個体から不要となった細胞や有害となる細胞を除去することがアポトーシスの機能である。この観点からもガン治療において如何にアポトーシスの分子機構と制御機構を理解し活用するかが重要となる。

ガン治療方法の中で、抗ガン剤による化学療法は広く行われている。抗ガン剤は莫大なヒト・モノ・カネを費やし基礎研究段階から始まり、治験を経た末に、やっ

と実際医療現場で使用される。これまで多くの医薬品は天然物をヒントにして生み出されてきた。更に、ヒト・モノ・カネの効率的な運用のために合成低分子化合物へと移行し、また生命科学・生命工学の発展に伴い現在ではバイオ医薬品も登場している。このように画期的な新薬開発のためにあらゆる可能性が試されている。

ポストゲノム時代に入りヒトの遺伝情報が全て読み解かれ、遺伝子産物であるタンパク質の機能解析が精力的に研究されている。薬剤の作用機序を分子レベルで解明することが薬剤開発の近道となると考えられ、薬剤標的因子を探索して、その因子が関与するシグナル経路、または代謝経路などの生体内ネットワークを明らかにする試みが行われている。薬剤の標的因子を明かにすることは、新たな抗ガン剤開発や治療方法の確立の足がかりとなり、今後の新薬開発に要する時間が短縮されることが期待されている。

本研究では近年下火となっている天然物化合物に注目した。それは唐辛子の辛み成分として知られる **capsaicin** である。この **capsaicin** に抗ガン活性・アポトーシス誘導活性が存在することが知られるようになった。**Capsaicin** によるアポトーシス誘導機構の解析が新たな抗ガン剤開発の可能性を示すことを期待し、その標的因子探索を行うことから複雑な生体制御機構の一端を解明することを目指した。

1.2. 背景

1.2.1. 悪性腫瘍（ガン）と化学療法

我が国の平成 19 年度死因別の割合は、悪性新生物（悪性腫瘍またはガンと呼称。以後ガンとする）が構成比 30.3%で最も多く、次いで心疾患 15.8%、脳血管疾患 11.5%などの順となっており、三大生活習慣病による死因が全体の 57.6%を占めている¹⁾。厚生労働省の報告によると、ガンは 1981 年以来日本人の死亡原因の第 1 位

となり、疾病対策上の最重要課題として対策が進められてきた。同省は、「対がん 10 年総合戦略（昭和 59 年度～平成 5 年度）」及び「がん克服新 10 年戦略（平成 6 年度～15 年度）」を展開してきた。そして平成 16 年度においては厚生労働省の科学技術基本方針として、「最先端科学を活用した予防・治療法の開発」が掲げられている。

このように国をあげてガンに対する予防・治療方法の開発が行われている。画期的な進歩は見られないのが現実ではあるが、ガン克服に向けてガンの早期発見・早期治療、新薬の開発、新たな治療方法確立が行われている。特に新たな検査技術の開発や診断薬は早期発見に非常に貢献している。例えば CT や MRI などの検査機器の精度向上、検査技術の機能を補助し、より精度を上げるための診断薬の開発などがいい例であろう。

今日のガン治療は大きくいくつかの形態（またはその複合）になる。

- 外科療法：腫瘍の外科的摘出
- 化学療法：抗ガン剤を用いてガン細胞を死滅させる
- 放射線療法：放射線を照射してガン細胞を死滅させる
- 免疫療法：免疫細胞（T 細胞）が抗原を認識する能力を用いて特定の細胞（ガン）を死滅させる
- その他

このうち最初の 3 つ「外科療法」、「化学療法」、「放射線療法」は現在のガン治療の 3 大療法である。この 3 大療法の一つ、化学療法について簡単に以下に述べる。

化学療法とは、主として抗ガン剤を用いた全身療法になる。抗ガン剤の歴史は新しく、1950 年代に毒ガスの一種であるナイトロジェンマスタードによる悪性リンパ

腫の治療実験から抗ガン剤治療が始まった。これが成功を収めたため、種々のガンに試されるとともに、数多くの抗ガン剤が開発され現在に至る。特に、肉腫、急性白血病や悪性リンパ腫に対する化学療法はめざましい進歩があり、効用が高く、副作用の低い薬剤の開発、副作用を軽減する投与方法が確立されている。

抗ガン剤の特徴は、全身に存在するガンを攻撃することにある。そのため、身体のどこにガンがあろうとも効果を示すことができる。だが、欠点としては「ガン細胞のみに効果がある抗ガン剤はまだない」という点である。特殊なガンの分子構造にのみ反応する抗ガン剤の開発も行われているが、まだまだ研究段階である。ガン細胞の特徴は無秩序に増殖することであり、この増殖能に注目し増殖を傷害することを目的に開発されたのが抗ガン剤である。このため、増殖する細胞はガンに限らず、どんな細胞でも傷害する。そのため特に増殖が活発な正常細胞を傷害するという副作用を抗ガン剤は内包していることになる。

抗ガン剤を用いた化学療法には副作用という問題があるが、白血病のような全身療法が必要なガンには有効な療法といえる。そのため化学療法の進歩が非常に期待される。抗ガン剤の進歩は目覚ましく、副作用の問題はあるものの 20 年前では治らなかった白血病などが治療可能となってきた。新たに副作用の少ない抗ガン剤の開発がなされ、また副作用を軽減するような多剤併用療法も確立されてきている。今後患者の Quality of Life (QOL) を尊重し、よりガン細胞に選択的な抗ガン剤の開発およびその療法が確立することが期待されている。

1.2.2. 白血病

医学的には、腫瘍化した造血細胞が無制限に増殖して血液中に出現する疾患の総称である。白血球系の細胞の腫瘍であることが多いため白血病と呼ばれるが、実際

には赤血球系や血小板系の細胞が腫瘍化したものもあり、これらも白血病と呼ばれる。白血球の数が増えるだけでなく、増加した白血球は通常とは形態が異なったものとなる。ただし例外的に形態に異常が見られるのみで数が減少することもある。一般的には「白血球の悪性腫瘍」、もしくは「血液の悪性腫瘍」という広い意味合いで使われている。

血液が生成される骨髓に病変の主座があり、固形の腫瘍を形成しないため外科手術の適応ではない。以前は治療が困難であったため、不治の病とのイメージを持ててきた。しかし、1980年代以降、化学療法や末梢血造血幹細胞移植療法（PB SCT; peripheral blood stem cell transplantation）、骨髓移植（BMT; bone marrow transplantation）や臍帯血移植の進歩にともない、治療成績は改善されつつある。とはいえ、依然として重篤な疾患であることに変わりはなく、死亡率は4割と高い。

白血病は悪性腫瘍死因分類において大きな割合を占めるわけではない。平成16年度では胃ガン、肺ガン、大腸ガンが上位を占めており約40%となっているのに対して、白血病は3%に満たない²⁾。だが、他の白血病には見られない特徴がある。多くの悪性腫瘍が中高年に多発するのに対し、白血病は乳児から高齢者まで広く発生し、2～6歳の子供が発症する「小児白血病」という分類が存在する。白血病には大きく分けて、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病があり、小児の白血病患者の70%は急リンパ性白血病、30%は急性骨髄性白血病に罹患する。なかでも急性骨髄性白血病はほとんど子供が罹患する³⁾。

白血病の中でも最も緊急性の高いものであった急性前骨髄性白血病は、ビタミンA製剤であるオールトランスレチノイン酸（ATRA）が著効する（分化誘導療法）ことが発見されて以来、白血病の中では治療成績が良好な疾患となった。

以上のように、白血病は数的には決して多くはないが4割と高い死亡率を示し、

小児において発症するという特徴を有する。未来を担う子供の命を救うべく、これからも抗ガン剤や治療方法の開発が求められる。

1.2.3. カプサイシン

カプサイシン (capsaicin) は、アルカロイドのうちカプサイシノイドと呼ばれる化合物のひとつである (図 1-1 (a))。唐辛子の辛味をもたらす主成分である。

摂取すると受容体活性化チャネルのひとつである TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) を刺激し、実際に温度が上昇しないものの激しい発熱感を引き起こす (図 1-2)。この TRPV1 は後根神経節細胞に特異的に発現し、43 度以上の熱および H^+ によって活性化する⁴⁾。Capsaicin は TRPV1 を介して、痛覚神経を刺激し、局所刺激作用あるいは辛味を感じさせる。また体内に吸収された capsaicin は、脳に運ばれて内臓感覚神経に働き、副腎のアドレナリンの分泌を活発にさせ、発汗及び強心作用を促す。

TRPV1 のアゴニストである capsaicin により TRPV1 を刺激すると痛覚神経は脱感作され、痛み刺激の伝達が抑制され痛みを感じにくくなることが古くから知られており、鎮痛剤として用いられてきた。この作用機序を利用して帯状疱疹後に発生する疼痛治療や糖尿病性神経障害による痛みの改善にカプサイシンクリームが臨床で使用されているが、一日数回の塗布が必要なことに加え、塗布直後の焼け付くような痛みの副作用が知られている。この問題を解決できる可能性が高い鎮痛薬、若しくは炎症性疼痛から神経因性疼痛まで様々な痛みを改善する鎮痛薬として TRPV1 アンタゴニストの創薬研究・臨床開発が 1997 年以降多くの製薬会社でおこなわれている⁵⁾。

このように神経に作用する capsaicin に、近年抗ガン作用があることが報告された

⁶⁻¹¹⁾。神経脱感作に用いるよりも高濃度な capsaicin 処理により、ヒト白血病、胃ガン、前立腺ガン、肝ガン、そして膵臓ガンのような非神経細胞に対して細胞増殖抑制効果が確認された。

木崎らによる報告¹²⁾では、capsaicin はガン抑制遺伝子 p53 を有するヒト急性前骨髄性細胞株 NB4 細胞に対して、p53 を持たないヒト急性前骨髄性細胞株 HL60 細胞や正常細胞よりも低濃度で細胞増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することを示した。この誘導機構として細胞内 ROS (Reactive Oxygen Species、活性酸素) 上昇による p53 活性モデルを示している (図 1-3) が、ROS 上昇の詳細な分子メカニズムは示されていない。また、近年 p53 を持つ、持たない、または変異を持つような前立腺ガンそれぞれにおいても capsaicin がアポトーシスを示すことが報告され、capsaicin によるアポトーシス誘導機構における p53 の位置づけは明確になっていない。

以上のように、capsaicin によるアポトーシス誘導機構、さらにその機構における p53 の存在意義や活性化機構、または細胞内 ROS 上昇機構は未だ明らかとなっていない。

1.2.4. アフィニティー磁性担体 FG 粒子と自動化精製マシン「Target Angler 8」

ヒトのゲノムの全塩基配列を解読するプロジェクト、ヒトゲノム計画が 2003 年に完了してから 5 年。ゲノム情報を活用した「ポストゲノム時代」の到来を迎えた。遺伝子の発現制御や制御ネットワークの研究だけでなく遺伝子産物であるタンパク質の構造・機能に関する情報の獲得が次の課題とされている。これに呼応してゲノミクスやプロテオミクスという研究分野も誕生した。これらの情報の獲得は新規薬剤の開発、再生医療、遺伝子組換え食品の開発などにつながり、大きな産業効果を

もたらすと期待されている。そして引き続いて、先述の分野を統合する形で新たな学際分野“ケミカルゲノミクス／ケミカルバイオロジー（ケムバイオ）”が米国で生まれ、近年、凄まじい勢いで発展している。この分野は化合物（ケミカル）をキーワードとして用い、その作用機序を解き明かす中で生命現象を明らかにする。具体的には、病気の原因となるタンパク質の特定機能を、一連の関連化合物あるいは化合物ライブラリーを用いて、阻害・亢進するなどしてシステムティックに研究することで、タンパク質に関わる生体反応の制御機構やネットワークを解き明かす。そしてこの情報を元に化合物の構造活性相関を明らかにすることができるため、新規薬剤開発のための貴重な情報や知見を得る事ができ、産業に直結する分野として期待がされる¹³⁾。

この分野において化合物標的因子の精製・同定は非常に重要な課題となっている。膨大な化合物ライブラリーに対する標的因子をタンパク質ライブラリーから探し出し、因子の機能解析を行うケムバイオにおいて最も肝となる技術と言えよう。

従来、タンパク質の精製分離を行うために、その電荷（イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性度（疎水クロマトグラフィー）、大きさ（ゲル濾過クロマトグラフィー）という様々な性質の違いを利用したカラムクロマトグラフィーが行われている。しかし、非常に多くのタンパク質が複雑に存在する細胞粗抽出液からでは、1回のカラム精製を行っただけでは目的のタンパク質をきれいに精製することはできず、通常数種類ものカラムクロマトグラフィー操作を併用しなければならない。また、その回数の多さ故に不安定なタンパク質は失活するおそれもあり、効率のよい精製法とは言い難い。

一方、生理活性を持つ任意の物質に対し、直接的な相互作用を持つタンパク質を同定する有効な方法としてアフィニティークロマトグラフィー法がある。物質間の

親和性（アフィニティー）を利用することにより、相互作用しているタンパク質を分離・精製する方法である。この方法を用いれば精製工程は短縮され、またカラム精製でなくバッチ法での精製を用いれば時間短縮になると考えられる。しかし、この方法も細胞粗抽出液から直に目的のタンパク質を単離することは困難を伴うことが多く、その主な理由としてアフィニティー精製に用いられる担体の構造・性能に限界があるためと考えられた。従来、担体として用いられる架橋デキストランやアガロースは、タンパク質が素通りできる内部網目構造を持っており、実際この網目構造内で非特異的タンパク質の吸着や滞留を招き、精製画分に多くの夾雑物が混入すると考えられた。更に架橋デキストランやアガロースは構造上物理的に弱いためバッチ法での強い遠心操作には不向きとされる。

以上を踏まえ、当研究室においてアフィニティークロマトグラフィー精製に用いる担体として、従来の担体をしのぐ優れた機能と性質を有する担体、SG 粒子が開発された¹⁴⁻¹⁸⁾。この SG 粒子の特徴として、以下のことが挙げられる。

- 粒子径が 200 nm と非常に小さいことから単位体積あたりの表面積を大きく確保することができ、また、粒子表面に多量のリガンドを固定化することができる。
- 粒子表面が親水的であり、また無孔性粒子であることからタンパク質の非特異的吸着が減少している。
- 水溶液中において高い分散性・可動性を持つことから、リガンドと結合タンパク質との結合・再結合頻度が高い。
- 有機溶媒耐性粒子であるため、有機溶媒中での反応が可能である。また物理的に安定な粒子であることから、強い遠心操作も可能である。
- バッチ法で精製するため、非常に短時間で分離・精製が可能である。

- 表面処理が容易なことから、DNA およびタンパク質、ペプチドにとどまらず、薬剤までも固定化でき、様々な応用が可能である。

このように、従来の担体がもつ短所を克服し、高い性能を有する SG 粒子は、アフィニティークロマトグラフィー担体としての有効性を示し、様々なリガンド、特に薬剤のような低分子化合物に相互作用するタンパク質の探索において、今までに様々な薬剤標的因子の精製・同定が行われてきた¹⁶⁻²²⁾。旧来の短所を克服した SG 粒子だが、今新たな性能が求められている。それは多検体を高速かつ自動処理ができるというものである。

ケムバイオでは膨大な数の化合物ライブラリーを網羅的に取り扱うため、その化合物ライブラリーから標的因子を探し出し、その機能解析を行う全ての行程を手作業で行うことは不可能に近い。そこでこの問題を解決すべく大きく期待されているのが、アフィニティークロマトグラフィー法に用いることができる新たな担体、磁性粒子である。磁性粒子を用いることで多検体、高速、自動という要素を兼ね備えた多検体同時解析が可能となると考えられている。

現在市販されている磁性粒子の多くはそのコアにフェライト粒子を含有し粒子径が数マイクロメートルと大きく、500 nm を下回る粒子径を有する磁性粒子のほとんどはアガロースやデキストランなどの多糖類によって被覆を成されたものに限られてしまう。現在、粒子径数十～数百ナノメートルのサイズ領域で幅広い化学的環境に適応し、磁気分離の際に被覆が脱離しない安定した有機高分子被覆磁性粒子の開発が世界的に行われているが、実用化レベルにまで至っていない。

磁性担体としての応用に特化した磁性粒子には、次のような特徴が求められる。

- 1) 磁性粒子に均質な粒度分布
- 2) 水溶液中における優れた分散安定性

3) リガンドを固定化するための表面官能基

4) 磁石への優れた応答性

など。これらの条件は磁性体であるフェライトナノ粒子を被覆材料の性質、被覆の厚さなどに大きく依存する。フェライトナノ粒子の被覆材料としては、材料の水溶液中における化学的安定性、材料選択性の自由度、表面改質の簡便さなどからポリスチレンに代表される疎水性合成高分子が最も理想的であると考えられる。また、磁性粒子はリガンドの固定化量を稼ぐため大きな比表面積を得ることのできる粒子径の小さいものが好ましい。しかし、粒子径を小さくすると同時に分散安定性が高まり磁石に対する応答性に優れた磁性粒子を合成することは困難である。

これらの問題を解決すべく当研究室にて新規アフィニティー磁性担体、FG 粒子が開発された¹⁸⁾。これは、旧来より用いられている SG 粒子に磁気分離能を持たせたフェライト含有 SG 粒子である (図 1-4)。図 1-4 パネル (a)には FG 粒子の透過型電子顕微鏡写真を示した。粒子内部に複数のフェライトナノ粒子を含んでいる。また図 1-4 パネル (b)には FG 粒子模式図を示した。コアにフェライトとスチレン・GMA 共重合体を持ち、更にその外層を poly-GMA でコーティングしている。表面には様々な官能基を修飾出来る点は SG 粒子同様である。

さらに、この FG 粒子を用いて全自動多検体同時処理を目的とした自動化精製マシン Target Angler 8 が多摩川精機株式会社により開発された (図 1-5)。

SG 粒子と同様のアフィニティー担体としての性能を持ち、更に多検体同時解析の際に必要とされる磁気分離能を併せ持った FG 粒子、そしてこの FG 粒子の機能を最大限に発揮すべく開発された自動化精製マシン Target Angler 8 がタンパク質の探索にきわめて適した素材であり、今後の基礎研究だけでなく創薬開発に大きく貢献するものと期待される。

1.3. 本研究の目的

第 1.2 節で述べてきたように、抗ガン剤を用いた化学療法において新規薬剤の開発および効果的な多剤併用投与法の確立が期待されている。このためには各抗ガン剤の分子レベルでの作用機序の解明が求められる。

悪性腫瘍の一つである白血病は、確かに割合の大きな悪性腫瘍ではないかも知れない。だが、小児から高齢者まで広くに発症し高い死亡率を示し、また主な治療法として抗ガン剤が用いられ、新たな抗ガン剤およびその治療法の確立が必要不可欠である。

世界中の製薬企業によって抗ガン剤開発が行われているものの、その成功確立は約 2 万分の 1 と言われ、年々研究開発費の増加、研究期間の長期化が進んでいる。薬剤開発のアプローチも低分合成子化合物、天然物由来の化合物、抗体医薬などのバイオ医薬など多様化している。あらゆる可能性を模索しながら新たな抗ガン剤開発が行われている。

天然物由来の化合物である **capsaicin** に近年抗ガン活性・アポトーシス誘導能が認められた。だが、その抗ガン活性機構は未だ不明な点が多く、細胞内標的因子も分かっていない。

そこで本研究では、**capsaicin** によるアポトーシス誘導機構を分子レベルで解明することを目的とした。その足がかりとして **capsaicin** 細胞内標的因子探索を行い、標的因子に対する **capsaicin** 作用機序の解明を通して **capsaicin** の抗ガン活性機構の解明を目指すものとした。

以下に本論文の構成を示す。

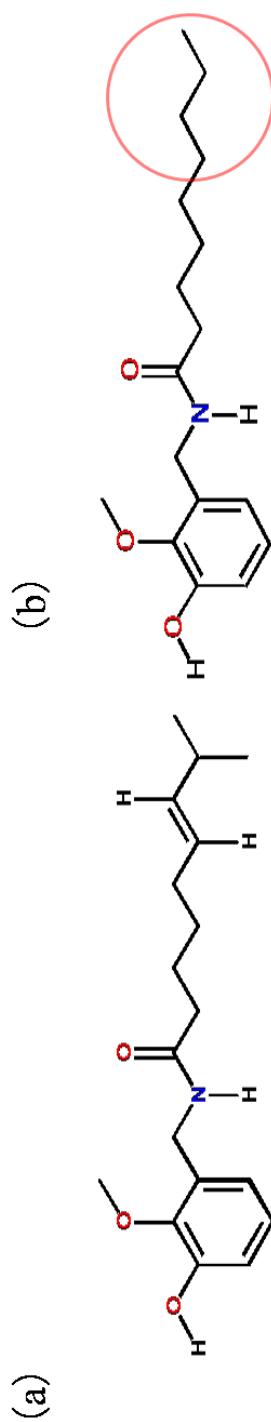
第 1 章では、本研究の背景を述べ、全体の導入部とした。

第2章では、ヒト急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞から、アフィニティー磁性担体 FG 粒子を用いて capsaicin 細胞内標的因子のスクリーニングを行った。

第3章では、capsaicin 標的因子と関わりのあるミトコンドリアに対する影響を調べた。

第4章では、capsaicin による p53 活性化機構の解析を行った。

第5章では、本研究の成果をまとめ、capsaicin によるアポトーシス誘導機構モデルを示し、本研究の意義を述べるとともに今後の展開を考察することで総括とした。



Capsaicin;
N-vanillyl-8-methyl-1-nonenamide
 M_w; 305.41

Psuedocapsaicin;
N-vanillylnonamide
 M_w; 293.40

図 1-1 Capsaicin および psuedocapsaicin の構造式

TRPV1 is an Integrator of Inflammatory Pain Pathways

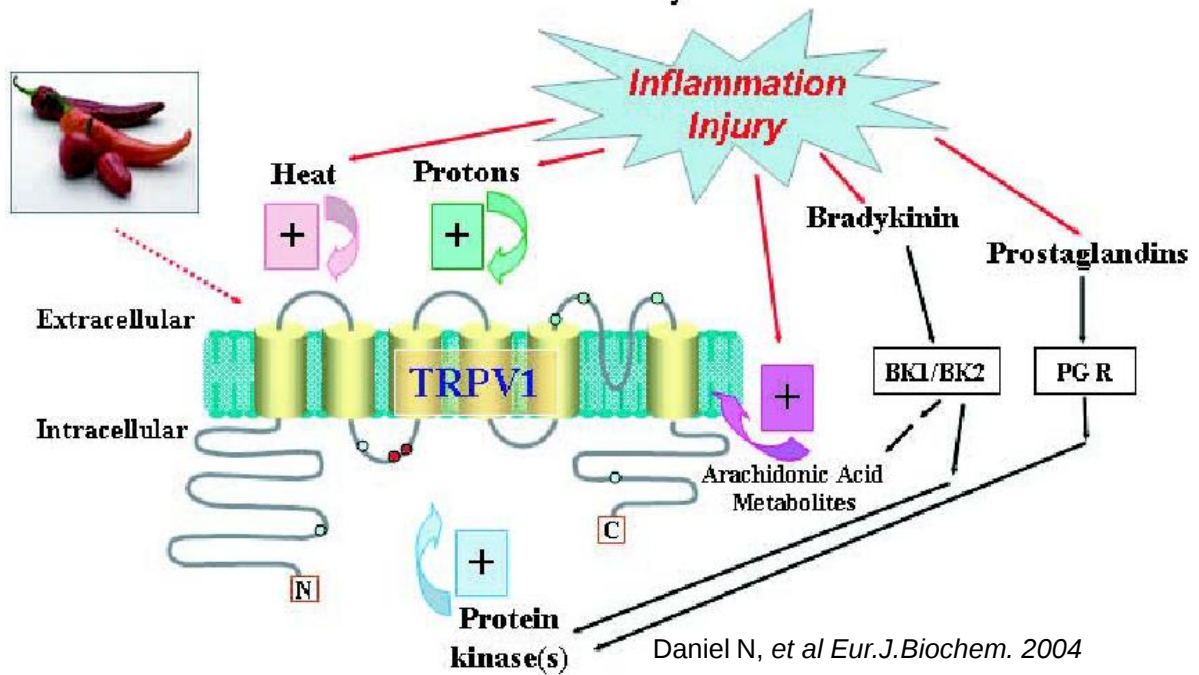


図 1-2 Capsaicin ターゲットタンパク質：TRPV1

Capsaicin 標的タンパク質として知られる受容体活性化イオンチャネルの一つ、TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) は、後根神経節細胞に特異的に発現し、43°C 以上の熱（ケガなどにより生じる熱）および H⁺によって活性化する。

Capsaicin-induced apoptosis model

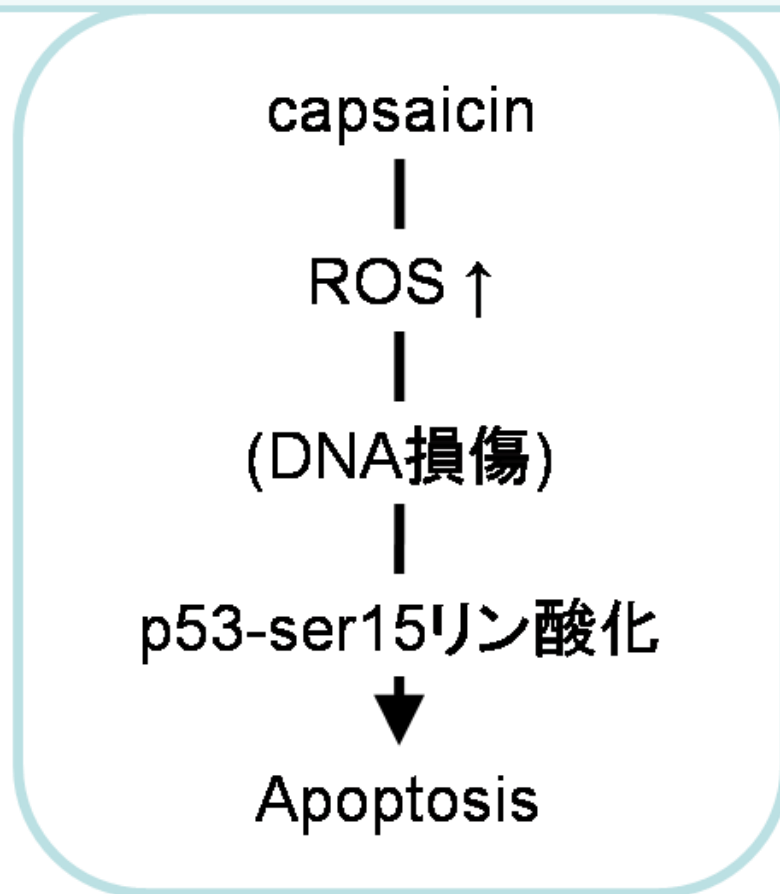
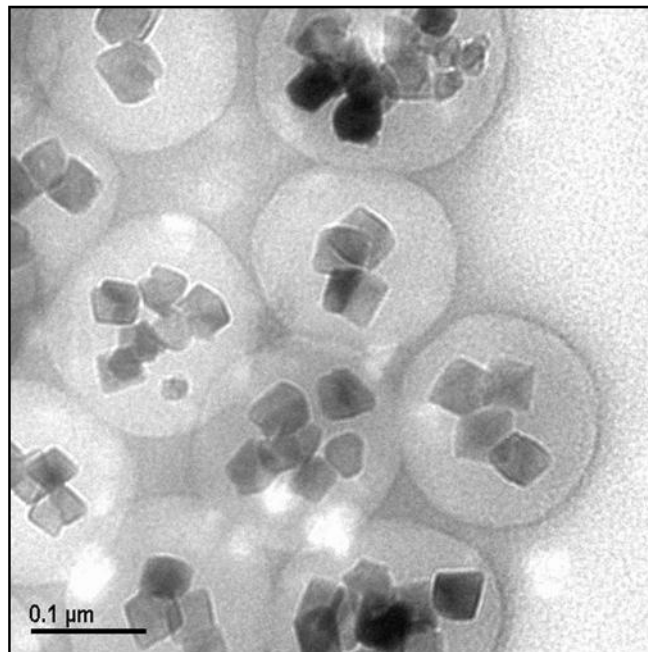


図 1-3 木崎らによる capsaicin のアポトーシス誘導モデル

急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞において現在考えられている、capsaicin 処理によるアポトーシス誘導機構モデルを示した。capsaicin 処理により細胞内活性酸素（ROS）が上昇し、それにより DNA 損傷が入る。DNA 損傷のシグナルが入り p53-Ser15 がリン酸化されアポトーシスが誘導される。

(a)



(b)

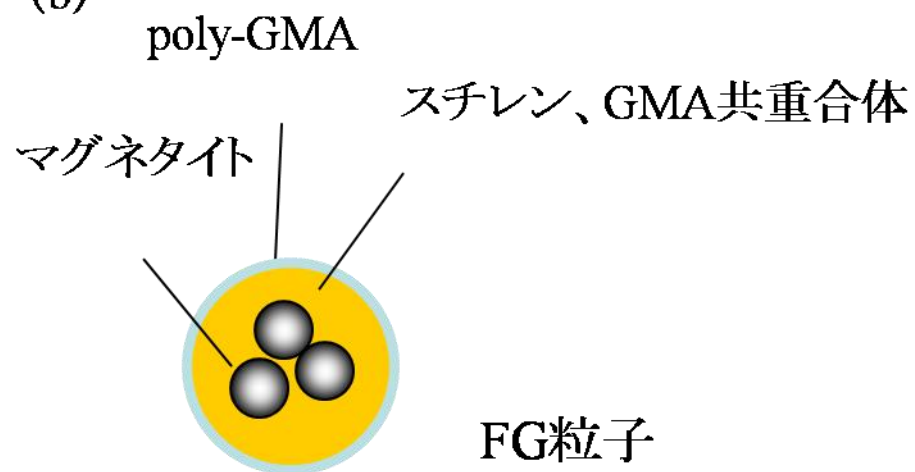


図 1-4 アフィニティー磁性担体 FG 粒子

(a) 磁性体フェライトを含有した SG 粒子である“FG 粒子”の透過型電子顕微鏡写真

(b) アフィニティー磁性担体 FG 粒子の模式図



図 1-5 自動化精製マシン「Target Angler 8」

多摩川精機株式会社が作製した FG 粒子の利用に適した、自動化精製マシン「Target Angler 8」。最大 8 サンプル同時処理が可能。

2. Capsaicin 標的因子探索

薬剤標的因子探索は、薬剤作用機構を分子レベルで解析する際に用いられ、新規薬剤開発へつながる有効な手段である。

2.1. はじめに

薬剤をはじめとした低分子化合物の生体における作用は、化合物特異的な標的因子との結合を介して起こると考えられている。このことから、低分子化合物の生体への影響を解析する有効な手段として、その標的因子を同定することが挙げられる。また、標的因子を同定し、低分子化合物の作用機構を明らかにすることは、生体内標的因子そのものの機能を、低分子化合物をツールとして用いることで明らかにすることにも応用できる。

第 1.2.3 項で述べたように、これまでに capsaicin は白血病細胞をはじめとする多くのガン細胞に対して細胞増殖抑制効果を示すことが報告されてきた。Capsaicin によるガン細胞の細胞増殖抑制効を初めに報告したのは、p53 遺伝子を有する骨髄性白血病細胞の細胞内 ROS 上昇を原因とする p53 活性化によるアポトーシスが生じるとした、木崎ら¹²⁾によるものである。その後 p53 の有無によらず、また前立腺ガンや膵臓ガンでも capsaicin によるアポトーシスが報告された^{10, 11)}。Capsaicin による細胞増殖抑制はアポトーシスを起こすことによって生じる。では capsaicin によるアポトーシスは如何なるメカニズムで起きているのか。Capsaicin による細胞内 ROS 上昇、また p53 有無によらない capsaicin 誘導アポトーシスにはどのような因子が関与し、どのようなメカニズムによるのか。これらは未だ明らかになっていない。

アポトーシスには複数の経路が存在することが、これまでの研究にてわかってきた。なかでもアポトーシスの司令塔とも言われるミトコンドリアに関連したアポト

ーシスの研究が進んでいる。様々な細胞ストレスがミトコンドリアへと伝えられ、アポトーシスを起こそうと cytochrome c を放出が引き起こす。アポトーシスを決行するカスパーゼ経路の一つにカスパー-9 がある。これは cytochrome c 依存的であり、cytochrome c がトリガーとなる。そのため cytochrome c 放出を促す因子（Bax、Bak など）や阻害する因子（Bcl-2、Bcl-x_L など）などにより cytochrome c 放出は厳密に制御されている²⁴⁾。

このようにアポトーシス研究は未だ全貌は明らかになっておらず、capsaicin が既知のアポトーシス因子に関与しているのか、または未知の因子に関与しているか明らかになっていない。

そこで本章では、capsaicin 標的因子を単離・同定することを目的とした。手法として第 1.2.4 項で述べた、アフィニティークロマトグラフィー法を用い、担体は当研究室で新規開発されたアフィニティー磁性粒子 FG 粒子を用いた。

標的因子探索を行うに当たり、次のような手順で研究を進めることとした。

1. FG 粒子固定化用 capsaicin アミノ基誘導体合成および誘導体の細胞増殖抑制効果の測定
2. Capsaicin 固定化 FG 粒子の作製および精製

これにより capsaicin 標的因子を同定し、capsaicin によるアポトーシス誘導機構解析の足がかりとした。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 細胞培養試薬

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 培地)

DMEM は Invitrogen (株) から粉末を購入し、0.2 mg/ml 硫酸ストレプトマイシ

ン（明治製菓）、200 単位/ml ペニシリン G カリウム（萬有製薬）を加えて、蒸留水で 1 x DMEM として調製し、フィルター濾過後、4°C で保存した。

- Roswell Park Memorial Institute 改変 1640 培地（RPMI1640 培地）

GIBCO（株）より購入し、4°C で保存した。

- 牛胎仔血清

GIBCO（株）より購入し、50°C で 30 分間加熱し非働化後、4°C で保存した。

- 25 x PBS (-)

NaCl 200 g、KCl 5 g、リン酸水素ナトリウム 12 水和物 90.7 g、リン酸二水素カリウム 6 g をミリ Q 水で 1 L にし、高圧蒸気滅菌した。

- PBS (-)

25 x PBS (-) 40 ml、1 M MgCl₂ 1 ml を高圧蒸気滅菌したミリ Q 水で 1 L にした。

- PBS (+)

25 x PBS (-) 40 ml、1 M MgCl₂ 1 ml、1 M ジチオスレイトール（DTT）0.5 ml を高圧蒸気滅菌したミリ Q 水で 1 L にした。

2.2.2. 細胞株と培養条件

浮遊細胞であるヒト急性前骨髄性白血病細胞株（APL, acute promyelocytic leukemia）NB4 細胞（埼玉医科大学総合医療センター血液内科木崎昌弘教授より譲渡）を、37°C、

5% CO₂、湿度飽和条件下で、10%牛胎仔血清を含む RPMI1640 培地で培養した。

付着細胞であるヒト腎臓細胞株 293T 細胞およびヒト子宮頸部ガン細胞株 HeLa 細胞は、37°C、5% CO₂、湿度飽和条件下で、10%牛胎仔血清を含む DMEM 培地で培養した。

2.2.3. 細胞傷害性検出実験用試薬

- Capsaicin

シグマ・アルドリッチ・ジャパン株式会社（以下 SIGMA）より購入し、4°C で保存した（図 1-1 パネル (a)）。

- Psuedocapsaicin (*N*-vanillylnonamide)

SIGMA より購入し、4°C で保存した（図 1-1 パネル (b)）。

- Capsaicin アミノ基誘導体 (cap-NH₂、Capsaicin-amino derivative)

東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、細谷孝充准教授により合成され、譲渡された（図 2-1）。

- 生細胞数測定試薬 SF

ナカライテスク（株）より購入し、4°C で保存した。

2.2.4. 細胞増殖抑制効果測定

Capsaicin、psuedocapsaicin および cap-NH₂ による細胞増殖抑制を、生細胞数測定試薬 SF による MTT アッセイで確認する。

NB4 細胞を第 2.2.2 項で示す条件で培養した。浮遊細胞用 96 well マイクロタイタープレート (MTP) に各細胞が 2.5×10^4 cells となるように 10% 牛胎仔血清を含む RPMI1640 培地に播種した。

ここにエタノール (EtOH) で溶解した capsaicin、psuedocapsaicin および cap-NH₂ を、0、50、100、200 μ M または 0、100、300、1000 (EtOH 終濃度 0.1%) になるように培地に加え、これを 24 時間培養する。培養各 well に、生細胞数測定試薬 SF を 10 μ l 加え呈色反応を行った。操作方法は付属説明書に則り行った。約 2 時間呈色反応させ、約 490 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

2.2.5. NB4 細胞タンパク質ライブラリーの調整

Capsaicin 標的因子を探索するに当たり、タンパク質ライブラリーを作製する。タンパク質ライブラリーとして NB4 細胞抽出液を選択し、以下の方法で調整した。

NB4 細胞を第 2.2.2 項で示した条件にて、 $0.4 - 8 \times 10^5$ cells/ml の範囲内で維持し、10 cm non-treated dish にて培養した。培養液の体積が 40 L になるまで継代した。

操作は Dignam²⁵⁾らの方法を用い、操作は全て 4°C で行った。まず培養液を 2,000 rpm、300 ml/min. の速度で連続遠心 (遠心器 : RS-201V (TOMY)、ローター : No.8 (TOMY)) し、細胞を回収した。この細胞を PBS (+) で洗浄し 35,000 rpm、10 分間遠心 (GS-6KR (BECKMAN)) した。遠心後の細胞の湿潤細胞体積 (Packed cell volume : PCV) を測り、PCV 4 倍量の 1.25 x Buffer A (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、10 mM KCl、1 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)) に懸濁した。氷上で 10 分間静置した後、40 ml の B type Dounce homogenizer (岩城硝子) で 20 回ホモジナイズした。ここで細胞が破碎され、核が流出しているのを顕微鏡で確認した。この細胞破碎液を 2,063 rpm、10 分間遠心 (遠心器 : Avanti30 centrifuge

(BECKMAN)、ローター：F650 (BECKMAN)) した。上層を細胞質画分として回収し、さらに 12,033 rpm、20 分間遠心 (Avanti centrifuge、F650 ローター) して上層を取り除いた。この沈殿に PCV 1 倍量の Buffer C (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、420 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.2 mM EDTA (pH 8.0)、25% (v/v) glycerol、0.5 mM DTT、1 mM PMSF) を加え、40 ml の B type Dounce homogenizer で 12 回ホモジナイズし、その懸濁液を 30 分間穏やかに攪拌した。この後、12,033 rpm、30 分間遠心 (Avanti centrifuge、F650 ローター) して得られた上清を回収し、その上清を透析バッグに入れ、1 L の透析 Buffer D (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、100 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.2 mM EDTA (pH 8.0)、10% (v/v) glycerol、0.1% (v/v) NP-40、0.5 mM DTT、1 mM PMSF) で 3 時間の透析を 3 回行った。この後、12,033 rpm、30 分間遠心 (Avanti centrifuge、F650 ローター) し、その上層を細胞核抽出液 (NE) とした。

2.2.6. Wistar/ST ラット の飼育

Wistar/ST ラット (雄、5 週齢) は、三協ラボサービスより購入し、バイオ研究基盤支援総合センターのマウス・ラット室にて飼育した。7 時から 19 時まで明条件下で、19 時から 7 時まででは暗条件下で飼育した。餌と水は自由に摂取出来るようにした。

2.2.7. ラット肝ミトコンドリアおよびミトコンドリアタンパク質ライブラリーの調整

ラットをエーテルで麻酔し、腹部を開き、肝臓を丸ごと摘出した。以後の操作は全て、4°C または氷冷下で行った。摘出した肝臓は、mito-buffer A (0.25 M sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA) に入れ、軽く振り、洗浄した。新しい

mito-buffer A を入れ、ハサミで肝臓をできるだけ細かく切り、mito-buffer A で 50 ml までメスアップした。攪拌機 Mazela Z-2200 ホモジェナイザーで、テフロン内筒を用いて、2 回ホモジェナイズした。遠心 ($80 \times g$ 、7 min、 4°C) した後、上清 20 ml を 25 ml の mito-buffer B (0.35 M sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.1 mM EDTA) の上に静かに重層し、遠心 ($700 \times g$ 、10 min、 4°C) した。上層の 20 ml を 2 ml チューブに移しとり、遠心 ($7000 \times g$ 、10 min、 4°C) した。上清を捨て、ペレット表面を mito-buffer A で軽くリンスした後、500 ml の mito-buffer C (0.25 M sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) で洗浄し、500 ml の mito-buffer C で再懸濁した。ミトコンドリア液が酸素に触れやすいように、表面積を大きくして静置しておいた。調製したミトコンドリア液の一部を NP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、and 1% (v/v) NP-40) で溶解し、タンパク質濃度をブラッドフォード法により測定した²²⁾。

ラット肝ミトコンドリアからタンパク質ライブラリーを作製した。ラット肝ミトコンドリアを、binding buffer (20 mM HEPES-NaOH、100 mM KCl、0.2 mM EDTA (pH 8.0)、10% (v/v) glycerol、0.1% (v/v) NP-40、0.5 mM DTT、1 mM PMSF) に加え、氷上にて 5 分間超音波破碎 (50% interval) した。この後、 $10,000 \times g$ 、30 分間遠心し、その上層をラット肝ミトコンドリアタンパク質ライブラリーとシアフィニティー精製に使用した¹⁹⁾。

2.2.8. Capsaicin 固定化粒子材料および薬剤固定化試薬

- FG 粒子

当研究室で作製したカルボン酸型 FG 粒子 (FG-NEGDENC 粒子) を遮光し 4°C で保存した¹⁸⁾。

- *N*-Hydroxysuccinimide (NHS)

ペプチド研究所（株）で購入し、室温で保存した。

- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide・HCl (EDC)

ナカライテスク（株）で購入し、遮光し 4℃ で保存した。

- 1, 4-dioxane

ナカライテスク（株）で購入し、室温で保存した。

- mono-ethanolamine

ナカライテスク（株）で購入し、室温で保存した。

- demethylformamide (DMF)

ナカライテスク（株）で購入し、室温で保存した。

- メタノール (MeOH)

ナカライテスク（株）で購入し、室温で保存した。

- バイオスクリーニングシステム自動化精製マシン Target Angler 8

多摩川精機（株）より借り受けた。

2.2.9. Capsaicin アミノ基誘導体固定化 FG 粒子の作製

Cap-NH₂ をカルボン酸型 FG 粒子 (FG-NEGDENC 粒子) に固定化した。

5 mg の FG-NEGDENC 粒子を 500 μ l の 1, 4-dioxane で洗う。1, 4-dioxane で溶解した 0.2 M NHS と 0.2 M EDC を 500 μ l 加え 2 時間反応させて粒子上のカルボキシル基を活性化させた。反応後 500 μ l の DMF で粒子を洗浄し、最終的に粒子は 100 μ l の DMF に分散した。その後、粒子に Cap-NH₂ を溶解した DMF 溶液を 400 μ l 加えて室温で 70 分間反応させた。粒子表面にある反応していないカルボキシル基は、1M mono-ethanolamine / DMF を添加し、室温で 2 時間反応させ、マスキングした。50% MeOH で洗浄した後、粒子は 4°C、暗所で保存した。

以上、FG-NEGDENC 粒子への cap-NH₂ の固定化方法を図 2-2 に示す。

2.2.10. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

試薬

● Sol.A

アクリルアミド (モノマー) 146 g、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド 4 g をミリ Q 水で 500 ml にし、Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter (MILLIPORE) で濾過し、4°C で遮光保存した。

● Sol.B

Trizma-Base (SIGMA) 90.75 g を適量のミリ Q 水に溶解し、塩酸によって pH を 8.8 に調整した。その後、ラウリル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS) 2 g を加え、ミリ Q 水で 500 ml とした。これを Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter

で濾過して用いた。

- Sol.C

Trizma-Base 30.25 g を適当量のミリ Q に溶解し、塩酸によって pH を 6.8 に調整した。その後、SDS 2 g を加え、ミリ Q 水で 500 ml とした。これを Stericap-GV 0.22 μ m Bottle Top Filter で濾過して用いた。

- 泳動 Buffer

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 2.4 g、グリシン 11.52 g、10% SDS 8 ml をミリ Q 水で 800 ml にしたものを用いた。

- 4 x SDS サンプルバッファー

Sol.C 20 ml、SDS 3.2 g、glycerol 20 g、 β -ME 1.6 ml、ブロモフェノールブルー (Bromophenol Blue : BPB) 10 mg を混合し、Millex-GP 0.22 μ m Filter Unit (MILLIPORE) で濾過し、分注して-20°C で保存した。

方法

Sol.B 1.5 ml に Sol.A を目的のゲル濃度になるように加え、ミリ Q 水を加えて最終体積を 6 ml とした。これに 10% Ammonium persulfate (APS) 40 μ l と *N,N,N',N'*-Tetramethylenediamine (TEMED) 20 μ l を加え、ゲル装置に注いで分離ゲルを作製した。分離ゲルが固まったら、Sol.A 0.45 ml、Sol.C 0.75 ml、ミリ Q 水 1.8 ml、10% APS 21 μ l、TEMED 8 μ l の混合液を分離ゲル上に流し込んでコームを挿入した（濃縮ゲル）。濃縮ゲルが固まったらコームを抜き、ミニプロテイン泳動装置

(BIO-RAD) に組み込み、800 ml の泳動 Buffer を入れた。泳動条件は濃縮ゲル中では 20 mA の定電流で、分離ゲル中では 30 mA の定電流で泳動を行った。

2.2.11. アフィニティー磁性粒子 FG 粒子による精製

磁気分離可能な FG 粒子を用いた、capsaicin 標的因子探索のためのアフィニティー精製について述べる。

第 2.2.9 項で作製した固定 FG 粒子および第 2.2.5 項で調整した NB4 細胞タンパク質ライブラリー、または第 2.2.7 項で調整したラット肝ミトコンドリアタンパク質ライブラリーを、バイオスクリーニングシステム自動化精製マシン Target Angler 8 にセットし、付属説明書に則り操作を行った。

以下に精製過程を簡単に述べる。1.5 ml 専用チューブに 0.2 mg の固定化 FG 粒子を用意した。ロボットによる自動精製を行うに際し、wash buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、10% (v/v) glycerol、150 mM KCl、0.2 mM EDTA (pH 8.0)、1 mM DTT、0.2 mM PMSF、0.1% (v/v) NP-40)を用いた。Wash buffer による固定化 FG 粒子の平衡化の後に、NP-40 が最終濃度 0.1%になるように調製した細胞抽出液を 200 μ l 加えて、粒子を再分散させた。これを、4°C、4 時間攪拌させ、capsaicin 特異的に結合する標的因子を結合させた。

結合反応後粒子を磁気分離した後に、その上清を素通り画分 (FT) として取った。磁気分離した粒子を 200 μ l の wash buffer で再分散させ、磁気分離、上清の除去という操作を 3 回繰り返し、非特異的結合タンパク質の除去、粒子の洗浄を行った。その後 KCl 濃度を 1 M とした wash buffer を 200 μ l 加え再分散させ、5 分間静置した。その後磁気分離、上清の除去を行い静電的に粒子に結合したタンパク質の除去、粒子の洗浄を行った。

次に、粒子の表面に特異的に結合していると考えられるタンパク質を溶出するために、界面活性剤による溶出を行った。洗浄した粒子に 40 μ l の 1 x SDS サンプルバッファーを加え、粒子を再分散させた。その後、98°C で 5 分間煮沸し 20,000 x *g*、5 分間、室温で遠心分離した後、上清を回収し、これを界面活性剤による溶出画分 (BE: Boil Elution) とした。検出は銀染色法を用いた。

以上のスキームを図 2-3 に示した。

2.2.12. プラスミドベクターの構築

本章では以下プラスミドを構築・使用した。

① p3xFLAG-c-PHB1 ; C 末 FLAG タグ融合 PHB1 プラスミド

NB4 細胞の cDNA library より、PCR 法により prohibitin (PHB) 1 をコードする cDNA を作製した (プライマー: Fwd-*Eco*RI-KOZAK-PHB1 と Rve-*Bgl*III-PHB1)。5'末端を *Eco*RI、3'末端を *Bgl*III で切断し、哺乳類 C 末 FLAG タグ融合タンパク質発現ベクター p3xFLAG-CMVTM14 に組み込んだ。

② p3xFLAG-c-PHB2 ; C 末 FLAG タグ融合 PHB2 プラスミド

NB4 細胞の cDNA library より、PCR 法により PHB2 をコードする cDNA を作製した (プライマー: Fwd-*Eco*RI-KOZAK-PHB2 と Rve-*Bgl*III-PHB2)。5'末端を *Eco*RI、3'末端を *Bgl*III で切断し、哺乳類 C 末 FLAG タグ融合タンパク質発現ベクター p3xFLAG-CMVTM14 に組み込んだ。

使用したプライマー

- Fwd-*Eco*RI-KOZAK-PHB1

5'-aaagaattcgccaccatggctgccaaagtg-3'

- Rve-*Bgl*II-PHB1

5'-aaaagatctctggggcagctggaggagca-3'

- Fwd-*Eco*RI-KOZAK-PHB2

5'-aaagaattcgccaccatggcccagaacttg-3'

- Rve-*Bgl*II-PHB2

5'-aaaagatcttttcttacccttgatgaggct-3'

2.2.13.C 末 FLAG タグ融合 PHB1 および PHB2 タンパク質の調整

293T 細胞を 10cm collagen-coated dish にまき、24 時間後 p3xFLAG-c-PHB1 または p3xFLAG-c-PHB2 を Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を使用し添付の説明書に従って、トランスフェクションした。トランスフェクションしてから 4 時間後培地を交換して、さらに 24 時間 DMEM 培地で培養した後細胞を回収した。

回収した細胞を PBS (-)にて洗浄後 500 µl の NP40-lysis buffer を用いて氷上で 30 分静置することで細胞を溶解した。溶解液を遠心し、上清を抗 FLAG 抗体レジン (SIGMA) 10 µl と 1 時間混合した。その後、500 µl の NP-40 lysis buffer で 5 回洗浄した。洗浄後、50 µl の FLAG ペプチド 0.1 mg/ml を含む NP-40 lysis buffer で沈降物を溶出した。

2.2.14. ウェスタンブロッティング

試薬

- transfer buffer

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 3.0 g、グリシン 14.5 g、MeOH 200 ml、
にミリ Q 水を加えて 1 L にメスアップして使用した。

- 20 x TBS

Trizma-Base (SIGMA) 11.8 g、Tris-HCl (SIGMA) 63.5 g、NaCl 87 g にミリ Q 水
を加えて 500 ml にメスアップし、室温で保存した。

- ブロッキング Buffer

スキムミルク 25 g、20 x TBS 25 ml、10% (w/v) NaN_3 1 ml にミリ Q 水を加え
て 500 ml にメスアップして使用した。

- TBS-T

20x TBS 50 ml、Tween-20 を 1 g にミリ Q 水を加えて 1 L にメスアップして使用
した。

- マウス抗 FLAG 抗体

SIGMA より購入し、 -20°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 1,000
倍希釈した。

- ラビット抗 PHB1 (H-80) 抗体

Santa Cruz (株) より購入し、4°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 1,000 倍希釈した。

- ラビット抗 PHB2 (または REA と呼称) 抗体

Upstate (株) より購入し、-20°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 1,000 倍希釈した。

- 抗 mouse-IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey)

GE ヘルスケアバイオサイエンス (株) より購入し、4°C で保存した。

- 抗 rabbit-IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey)

GE ヘルスケアバイオサイエンス (株) より購入し、4°C で保存した。

方法

サンプルを prestained SDS-PAGE standard (BIO-RAD) と共に SDS-PAGE した後、Mini trans blot module kit (BIO-RAD) を用いて、タンパク質をポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (Millipore : immobilon transfer membrane) に transfer buffer 中でブロッキングした。PVDF 膜は、あらかじめ 1 分間 MeOH に、続いて 15 分以上 transfer buffer に浸しておいた。ブロッキングの条件は、4°C において 100 V で 60 分間とした。

ブロッキングの終わった PVDF 膜を約 30 ml のブロッキング buffer に浸し室温で 30 分間振盪した。次いで、至適倍率にて希釈した各種抗体 (一次抗体) を加えて、室温で 60 分間反応させた。60 分後、抗体を回収し、約 30 ml の TBS-T で 3 回、5

分間振盪して PVDF 膜を洗浄した。次に 10 ml の TBS-T に PVDF 膜を浸し、一次抗体の抗体種に応じた horseradish peroxidase linked 二次抗体を 10 μ l 加えて室温で 30 分間振盪した。これを約 30 ml の TBS-T で 5 回、5 分間振盪することで洗浄した。目的タンパク質の検出は、Chemi-Lumi One（ナカライテスク（株） #05027-20）と ImageMaster VDS-CL（Amersham pharmacia biotech）を用いて行った。使用法は製品添付マニュアルに従った。

2.3. 結果および考察

2.3.1. FG 粒子固定化用 capsaicin アミノ基誘導体合成

Capsaicin 標的因子探索を行うに際してアフィニティー磁性担体 FG 粒子に固定化する官能基を有した capsaicin 誘導の合成が必要である。そこで、東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、細谷孝充准教授に capsaicin アミノ基誘導体の合成を依頼した。

Capsaicin アミノ基誘導体は、capsaicin ベンゼン環上の OH 基を介してアミノ基を導入した(図 2-1)。これにより FG 粒子固定化用 capsaicin アミノ基誘導体(cap-NH₂, capsaicin amino derivative)を得た。

2.3.2. Capsaicin アミノ基誘導体の細胞増殖抑制効果検討

第 2.3.1 節で得た cap-NH₂ に capsaicin 同様細胞増殖抑制効果があるかを検討した。

Capsaicin 感受性細胞である急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞を用い、また capsaicin 誘導体である psuedocapsaicin (*N*-vanillylnonamide)を比較対象とした(図 1-1 パネル (b))。この psuedocapsaicin は、神経における capsaicin ターゲット TRPV1 に対して、capsaicin 同様の効果があることが知られている²⁶⁾。

NB4 細胞に対して、capsaicin、psuedocapsaicin、そして cap-NH₂ の細胞増殖抑制効果を比較した(図 2-4)。Capsaicin は NB4 細胞に対して 100 μ M よりも低濃度で IC₅₀ を示すのに対して、cap-NH₂ は 100 μ M 程度で IC₅₀ を示し、capsaicin よりも若干高い濃度を必要とした。比較としておいた psuedocapsaicin は他二つに比べ細胞増殖抑制効果を示さなかった。

以上の結果より、FG 粒子固定化用 capsaicin アミノ基誘導体 cap-NH₂ は capsaicin とほぼ同様の細胞増殖抑制効果があることが示された。官能基を導入しても細胞増殖抑制効果を保持していることが確認出来た。Cap-NH₂ の細胞増殖抑制効果が capsaicin のそれに比べ多少高濃度となるのは官能基を導入したことで細胞膜透過性が減少したと考えられる。またこの細胞増殖抑制効果に対して cap-NH₂ は効果を示すが psuedocapsaicin が効果を示さないことから、この効果には capsaicin の持つ二重結合が重要であり、ベンゼン環側の構造は大きくは影響しないと考えられる。この構造と活性の情報は今後細胞増殖抑制効果に特化した capsaicin 誘導体を合成していく上で重要な情報となると言える。

2.3.3. NB4 細胞質タンパク質ライブラリーからの capsaicin 固定化 FG 粒子による精製

Capsaicin に結合する因子をタンパク質ライブラリーより単離するために、第 2.2.9 節で作製した capsaicin 固定化 FG 粒子を用いて、アフィニティークロマトグラフィー法によりアフィニティー精製を行った。

薬剤非固定化粒子による精製結果と固定化粒子による精製結果を比較した場合、相違点は粒子上の固定化された薬剤の有無のみである。このことから、どちらの精製結果からも検出されるバンドに関しては、FG 粒子自体に結合しているタンパク

質と考えられるため、非特異的結合タンパク質とした。また、薬剤固定化粒子にのみ検出されるバンドは特異的結合タンパク質と判断した。物質と物質の結合は大きく分けて、静電的な結合と、疎水的な結合が考えられる。静電的な相互作用による結合であれば、高塩濃度によって静電的な相互作用を弱め、溶出させることが可能である。また、疎水的な相互作用による結合は、界面活性剤を含む溶液で熱処理しタンパク質を変性させることで、溶出することができる。よって、高塩濃度 (1 M KCl) 処理によって静電的な相互作用によって結合している因子を洗浄・除去する。次いで界面活性剤による溶出を行うことで高塩濃度処理でははずせないほど強力な静電的相互作用によって結合している因子と疎水的な相互作用で結合している因子を溶出した。

Capsaicin 感受性細胞である NB4 細胞から得た細胞質タンパク質ライブラリーから capsaicin 固定化 FG 粒子による精製結果を図 2-5 に示した。精製結果を銀染色法で検出した。レーン 1 は NB4 細胞質タンパク質ライブラリーのインプットである。レーン 2 は薬剤非固定化粒子、レーン 3 は capsaicin を固定化した粒子を用いた。

レーン 2 と比べるとレーン 3 で 30 kDa と 37 kDa の 2 本 (矢印) のバンドが得られ、それ以外にはレーン 2 のみに見られるバンドはなかった。このバンドは再現性よく capsaicin 固定化 FG 粒子によって精製された。

2.3.4. Capsaicin 結合因子の同定

第 2.3.3 節にて、NB4 細胞質タンパク質ライブラリーから capsaicin 固定化 FG 粒子特異的に精製されたタンパク質を、質量分析計により解析した。その結果、30 kDa のタンパク質は Prohibitin (PHB) 1 に含まれる 3 つのポリペプチドが検出された。また 37 kDa のタンパク質は PHB2 に含まれる 5 つのポリペプチドが検出された (表

1) 。この結果、capsaicin 結合因子として PHB1 および PHB2 が同定された。FG 粒子を用いて、capsaicin 結合因子を同定することができた。

同定されたタンパク質 PHB1 および PHB2 は 53.3%程度の高い相同性を持ち、PHB domain、Coiled coil domain、そして Hydrophobic stretch という共通の保存された領域を持つ。それぞれがヘテロダイマーを形成し、ミトコンドリアミトコンドリア内膜に局在すると言われている^{27,28)}(図 2-6)。そこで次に PHB が局在するとされるミトコンドリアタンパク質ライブラリーから capsaicin 結合因子を探索し確認することとした。

2.3.5. ミトコンドリアタンパク質ライブラリーからの capsaicin 固定化 FG 粒子による精製

第 2.2.11 項で示した手法同様にミトコンドリアタンパク質ライブラリーから FG 粒子を用いたアフィニティー精製にて精製サンプルを得た。その精製結果を図 2-7 に示した。

図 2-7 パネル (a) は精製結果を銀染色法で検出した結果である。レーン 1 はミトコンドリアタンパク質ライブラリーのインプット、レーン 2 では非固定化粒子、レーン 3 で固定化した粒子を用いた。

NB4 細胞質タンパク質ライブラリーと同様にレーン 2 と比べるとレーン 3 で 30 kDa および 37 kDa の 2 本のバンドが得られた (矢印)。

これら 2 本のバンドが PHB1 および PHB2 であるかを確認するために、抗 PHB1 特異抗体および抗 PHB2 特異抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果を図 2-7 パネル (b) に示した。レーン 1 から 3 ではミトコンドリアタンパク質ライブラリーのインプット量を変えて示した。レーン 4 は薬剤非固定化粒子、

レーン 5 は薬剤固定化粒子による精製サンプルである。その結果レーン 5 では PHB1 および PHB2 が検出された。このことから NB4 細胞質タンパク質ライブラリー同様ミトコンドリアタンパク質ライブラリーからも capsaicin 固定化 FG 粒子により特異的に PHB1 および PHB2 を単離できた。

2.3.6. 組換えタンパク質 PHB1 および PHB2 を用いた capsaicin 固定化 FG 粒子による精製

Capsaicin 固定化 FG 粒子により得られた PHB1 および PHB2 はヘテロダイマーを形成することが知られている（図 2-6）。今回の精製よりそれぞれが得られたが、1) それぞれが単独に capsaicin に結合し精製されたのか、2) 片方が capsaicin に結合し、もう一方は共精製されてきたのかわからない。そこで、組換えタンパク質をそれぞれ単独で作製しそれぞれのタンパク質を含むタンパク質溶液中から FG 粒子による精製を行った。

第 2.2.13 節で述べた方法により C 末 FLAG タグ融合 PHB1 および PHB2 を得た。これを capsaicin 固定化 FG 粒子により精製を行い精製の銀染色結果を図 2-8 パネル (a) に示した。レーン 1 および 4 に組換えタンパク質 PHB1-FLAG または PHB2-FLAG 精製サンプルを示した。それぞれ単一バンドのみ得られた。レーン 2 および 5 は薬剤非固定化粒子、レーン 3 および 6 は capsaicin を固定化した粒子による精製結果を示した。レーン 2 および 3 では PHB1-FLAG を精製した。その結果 capsaicin 固定化 FG 粒子によって PHB1-FLAG は精製されなかった。これに対してレーン 5 および 6 では PHB2-FLAG を精製した。その結果 PHB2-FLAG が精製された。

次に、同じ精製サンプルを抗 FLAG 特異抗体によりを用いてウェスタンブロッティングを行った（図 2-8 パネル(b)）。

レーン 1 および 2 は組換えタンパク質のインプットを、量を変えて示した。レーン 3 は薬剤非固定化粒子、レーン 4 は薬剤固定化粒子による精製サンプルである。その結果レーン 4 では PHB2 が検出された一方 PHB1 は検出されなかった。量的には PHB2 インプット 10%未満であることが示された。

このことから capsaicin には PHB2 が直接結合していることが考えられる。また PHB1 が直接精製されなかったことから、PHB1 は capsaicin には直接結合せず、PHB2 と共精製されてきたと考えられる。Capsaicin 固定化 FG 粒子よる PHB2 の回収効率が 10%以下と低いことは、膜貫通タンパク質である PHB がすべて構造を維持したまま可溶化および精製できているとは限らないことに起因すると考えられる。

PHB1 と PHB2 の間には高い相同性があり、アミノ酸配列的には非常に似通ったタンパク質である。にも関わらず PHB2 のみに capsaicin が結合し単離・精製されてきた。薬剤とタンパク質との結合様式は薬剤のタンパク質への作用機序解析には重要な情報であり非常に興味をもたれる点である。

2.4. 本章のまとめ

本章をまとめる。本章では、capsaicin 固定化 FG 粒子を用いて、capsaicin 結合タンパク質の精製、同定を行った。

- 1) Capsaicin アミノ基誘導体 cap-NH₂ を合成した。
- 2) Cap-NH₂ は、NB4 細胞に対して capsaicin 同様細胞増殖抑制効果があることを示した。また capsaicin 誘導体 psuedocapsaicin は他二つに比べ細胞増殖抑制効果を示さなかった。

- 3) Capsaicin 固定化 FG 粒子を用いて、NB4 細胞質タンパク質ライブラリーから capsaicin 結合タンパク質 Prohibitin (PHB) 2 を単離・同定した。
- 4) Capsaicin が PHB2 に直接結合し、PHB1 は PHB2 を介して共精製されることが示された。

Capsaicin 結合因子として PHB2 を特異的に単離・同定した。今まで capsaicin が PHB2 に結合する、または影響を与えるという報告はなかった。続いて、この因子の機能解析を行い、capsaicin との関わりを通して、capsaicin によるアポトーシス誘導機構を PHB2 で説明できるかを検討する。

次章ではまず、PHB2 が局在していると言われるミトコンドリアを用いて、ミトコンドリアへの capsaicin の影響を調べた。

Synthetic route of amino derivative of capsaicin

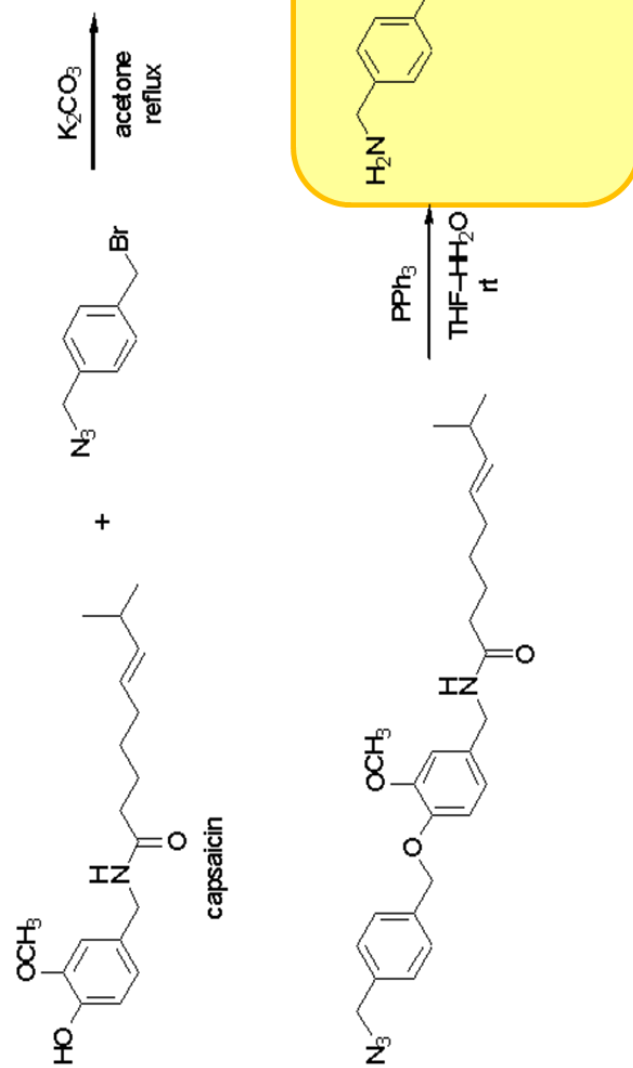
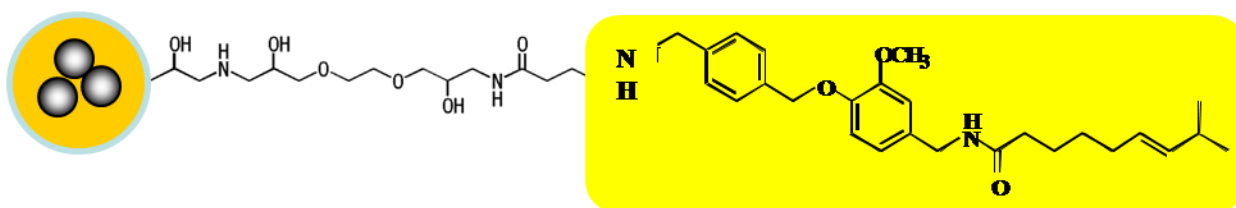
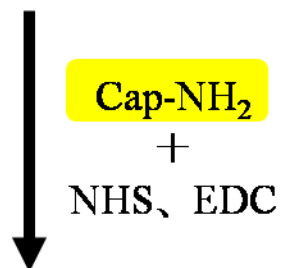
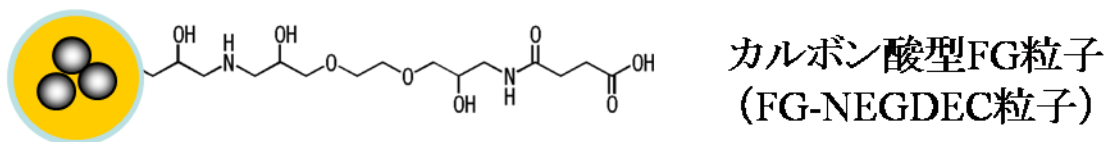


图 2-1 Capsaicin amino derivative 合成 scheme



Capsaicin固定化FG粒子

図 2-2 Capsaicin 固定化 FG 粒子作製 scheme

アフィニティー磁性担体 FG 粒子表面に修飾されたカルボキシル基を介して、capsaicin アミノ基誘導体を固定化。Capsaicin 固定化 FG 粒子を得た。

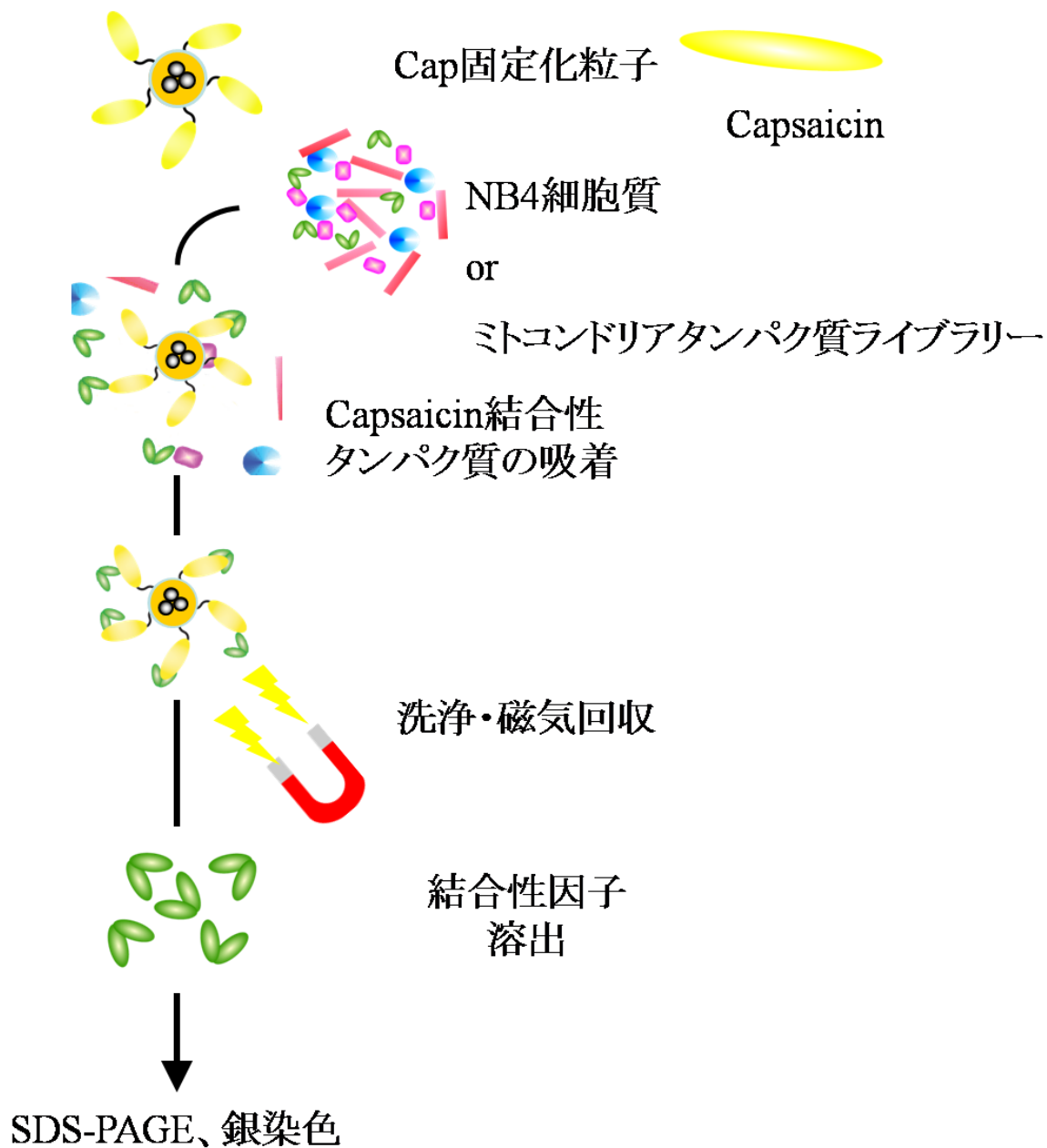


図 2-3 FG 粒子による精製 scheme

Capsaicin 固定化 FG 粒子を用いたアフィニティー精製スキーム。自動化精製マシン Target Angler 8 により磁気分離による精製が行われた。

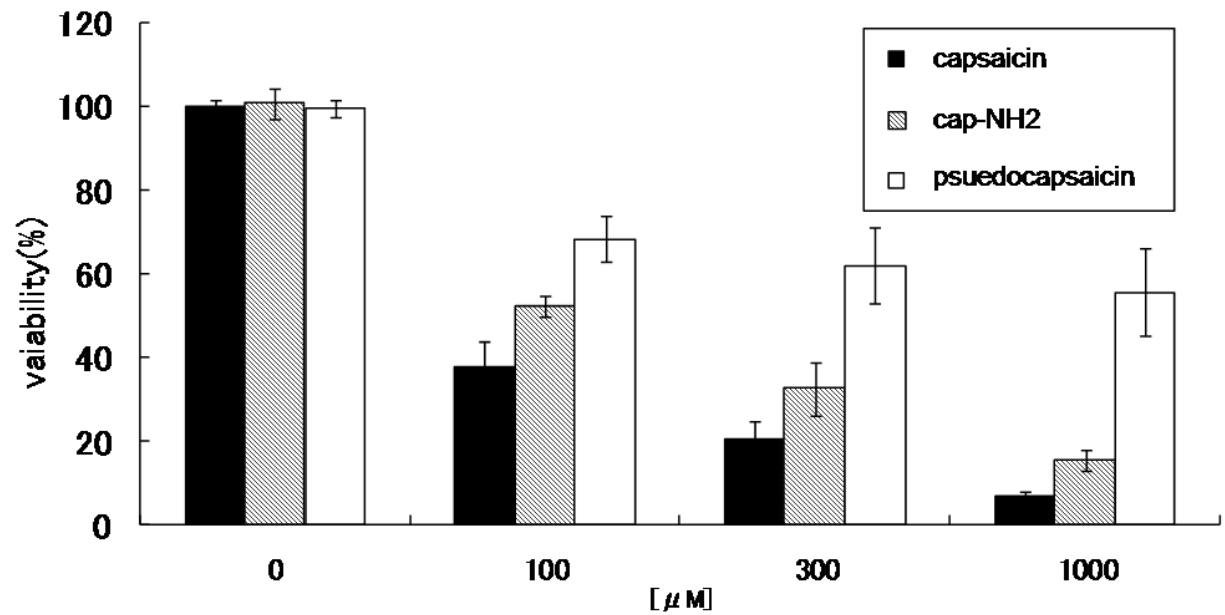


図 2-4 NB4 細胞に対する capsaicin 誘導体による細胞増殖抑制

ヒト急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞に capsaicin、cap-NH₂、および psuedocapsaicin を 24 時間処理した。その後生細胞数測定試薬 SF を用いて capsaicin 誘導体による細胞増殖抑制効果を測定した。

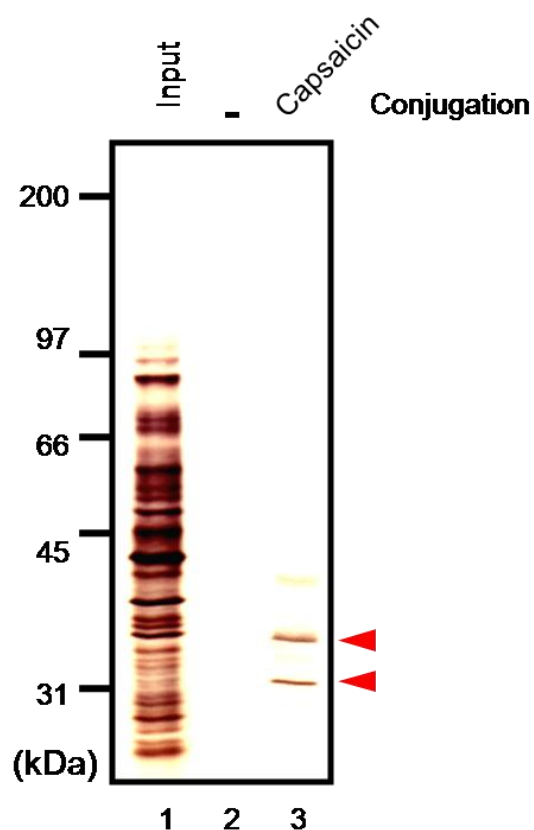


図 2-5 NB4 細胞質タンパク質ライブラリーを用いた capsaicin 固定化 FG 粒子による精製 NB4 細胞質タンパク質ライブラリーより精製を行い、SDS-PAGE 後に銀染色を行った。レーン 1 ではタンパク質ライブラリーインプット、レーン 2 では薬剤非固定化 FG 粒子（コントロール粒子）による精製サンプル、そしてレーン 3 では capsaicin 固定化 FG 粒子による精製サンプルを示した。

表 1 Capsaicin 結合因子の同定

Protein	Peptide sequence	Match
kDa		
37	DLAGRLPAGPRGMGTALK FNASQLITQRAQVSLIRRELTERAKDFSLILDDVAITELSFYSREYTAAVEAKQVAQQAQRAQLVEK QEQRQKIVQAEGEAEAAK NPGYIK IRAAQNISK	Prohibitin 2
31	VFESIGK EFTEAVEAKQVAQQAERARFVVEK AAIISAEGDSKAAELIANSLATAGDGLIELRKLEAAEDIAYQLSRSRNITYLPAGQSVLLQLPQ	Prohibitin 1

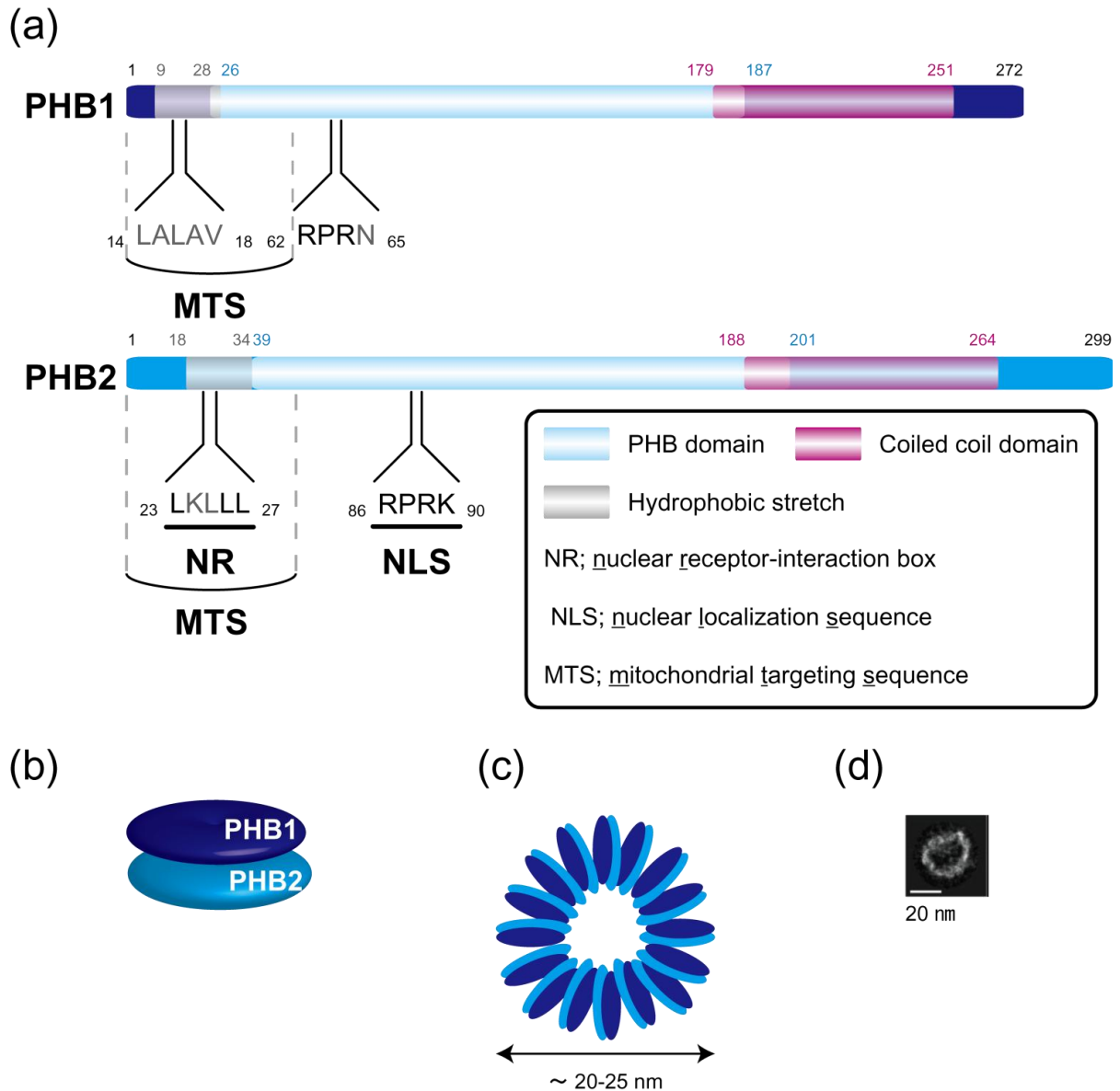


図 2-6 PHB1 および PHB2 の模式図

(a) PHB1 および PHB2 のアミノ酸配列から予測された各ドメインの模式図。PHB2 には NR および NLS が確認されている。(b) PHB 複合体を構成するヘテロダイマー。(c) ミトコンドリア内膜上でヘテロダイマーがリング状複合体を形成。約 20 nM 程度のリングを形成。(d) 酵母由来 PHB によるリング状複合体電子顕微鏡写真²⁸⁾ (参考文献 28 を改編)。

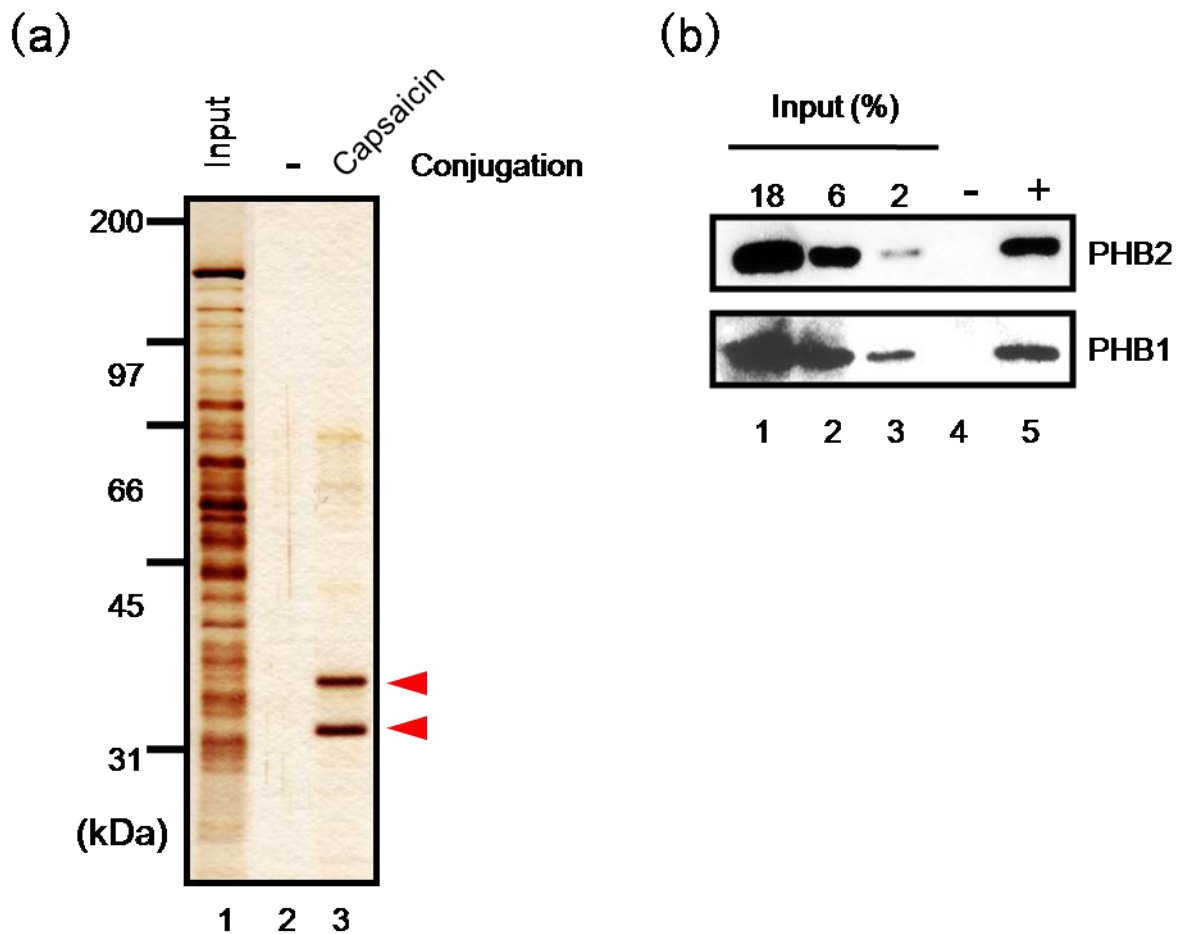
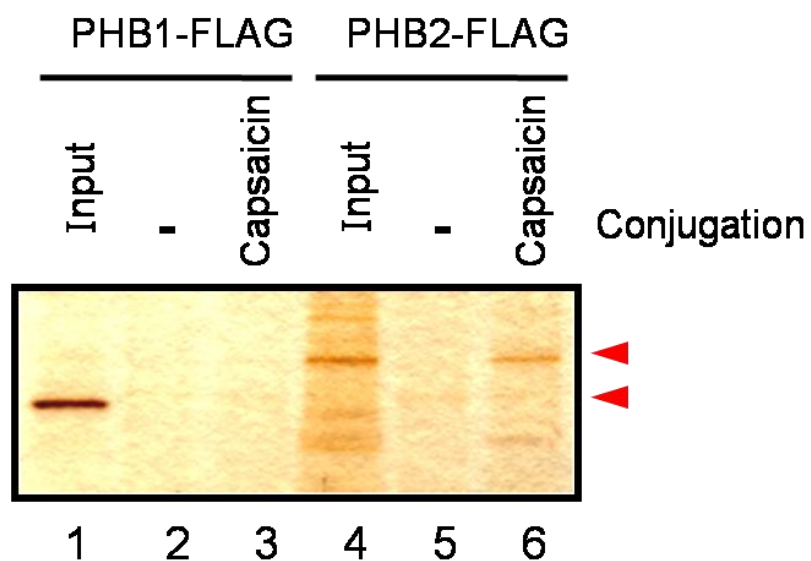


図 2-7 ミトコンドリアタンパク質ライブラリーを用いた capsaicin 固定化 FG 粒子による精製

(a) ラット肝ミトコンドリアタンパク質ライブラリーより精製を行い、SDS-PAGE 後に銀染色を行った。レーン 1 ではタンパク質ライブラリーインプット、レーン 2 ではコントロール粒子による精製サンプル、そしてレーン 3 では capsaicin 固定化 FG 粒子による精製サンプルを示した。(b) 抗 PHB1 および PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(a)



(b)

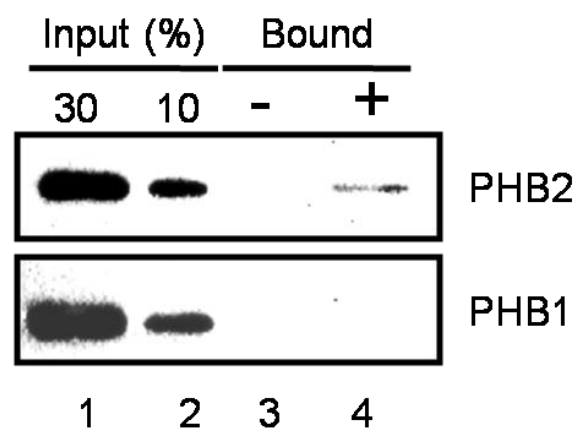


図 2-8 組換え PHB1 および PHB2 の作製および capsaicin 固定化 FG 粒子による精製

(a) FLAG タグ融合組換え PHB1 および PHB2 を作製・精製した。レーン 1 では PHB1、レーン 2 では PHB2 の抗 FLAG 特異抗体による精製結果を示した。それらを capsaicin 固定化 FG による PHB1 の精製結果をレーン 3、PHB2 をレーン 6 に示した。(b) 抗 FLAG 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

3. Capsaicin によるミトコンドリア傷害

Capsaicin 結合因子としてミトコンドリア内膜局在タンパク質 PHB2 が得られた。次にミトコンドリアを用い、capsaicin によるミトコンドリアへの影響を検討した。

3.1. はじめに

第 2 章にて capsaicin 結合因子としてミトコンドリア内膜タンパク質 PHB2 が得られた。

ミトコンドリアは細胞内小器官であり、独自の DNA、リボソームを持つ。細胞内での主な役割は、酸化リン酸化による ATP 産生、アミノ酸代謝、ケトン体代謝、脂肪酸代謝、コレステロール代謝、ヘム代謝、アポトーシスにおけるシグナル増幅などが挙げられ、生命現象において重要な役割を果たしている。本研究ではアポトーシスに注目しており、アポトーシス制御の中心としての役割を担うミトコンドリアに関わるタンパク質 PHB2 が得られたことは大変興味深い。

PHB2 はミトコンドリア内膜にて足場機能としての働き、またミトコンドリア形態安定化への寄与など複数の機能が報告されている²⁸⁾。PHB2 は、PHB1 とヘテロダイマーを形成し、内膜にてリング状に多量化していることが知られている（図 2-6）。また複数のミトコンドリアタンパク質とも複合体を形成している²⁹⁾。これまでに PHB2 との結合因子として、voltage-dependent anion channel (VDAC) 2、adenine nucleotide translocator (ANT) 2、そして抗アポトーシス因子 HS-associate protein X-1 (Hax-1) が知られている。だがこれらのタンパク質機能への関与は報告されていない。

ほかにも、ミトコンドリア形態制御において融合に関与する OPA1 のタンパク質レベルでの発現制御に PHB2 が影響を与えることが知られている³⁰⁾。PHB2 を siRNA

によるノックダウンを行うことでミトコンドリア形態異常を起こす。PHB2 ノックダウンはミトコンドリア融合に関与する OPA1 のタンパク質レベルでの安定化を減少させる。つまり PHB2 は OPA1 を制御することでミトコンドリア形態維持に寄与していると考えられている。

以上のように PHB2 はミトコンドリアへの関与が示唆されている。そこで次に、capsaicin が PHB2 に結合することでミトコンドリアを傷害すると仮説を立てた。本章では、ラットの肝臓からミトコンドリアを単離し、そのミトコンドリアを用いて、capsaicin のミトコンドリアへの影響を解析した。

ミトコンドリアの活性を調べる方法には、ANT を介したミトコンドリア内への ADP 取り込み活性（ANT 活性）を $[^3\text{H}]$ -ADP を用いて測定²¹⁾、Rhodamine 123 を用いた膜電位の測定²²⁾、を用いた。さらにミトコンドリア傷害を cytochrome c および PHB2 放出の検出により確認した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 試薬

第 2 章にて記載した以外の試薬を以下にまとめた。

- Cycloheximide (CHX)

SIGMA より購入し、DMSO で 100 mg/ml の濃度で溶解し、 -30°C で保存した。

- Carbonyl cyanide 4- (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)

SIGMA より購入した。FCCP は EtOH で 1 mg/ml の濃度で溶解し、パラフィルムを播いて、 -30°C で保存した。

- Atractyloside (Atra)

SIGMA より購入した。Atra は DMSO で 10 mM に溶解し、 -30°C で保存した。

- Rhodamine 123 (Rho123)

和光純薬工業より購入し、DMSO で 100 mM に溶解し、 -30°C で遮光保存した。

- [^3H]-ADP

Perkin Elmer より購入した。

- マウス抗 cytochrome c 抗体

BD Pharmingen (株) より購入し、 4°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 300 倍希釈した。

3.2.2. プラスミドベクターの構築

本章では以下プラスミドを構築・使用した。

- ① pcDNA-PHB2-HA ; C 末 HA タグ融合 PHB2 プラスミド

NB4 細胞の cDNA library より、PCR 法により prohibitin (PHB) 1 をコードする cDNA を作製した (プライマー: Fwd-EcoRI-KOZAK-PHB2 と Rve-XhoI-PHB2)。

5'末端を *EcoRI*、3'末端を *XhoI* で切断し、哺乳類 C 末 HA タグ融合タンパク質発現ベクター pcDNA3.1(+)-HA に組み込んだ。

- ② pCMV-ANT2 ; N 末 FLAG タグ融合 ANT2 プラスミド

当研究室所属、東基記氏より譲渡して頂いた²¹⁾。

使用したプライマー

- Fwd-*Eco*RI-KOZAK-PHB2

5'-aaagaattcgccaccatggcccagaacttg-3'

- Rve-*Xho*I-PHB2

5'-aaactcgagttttcttacccttgatgaggct-3'

3.2.3. 免疫沈降法による PHB2-ANT2 相互作用の解析

293T 細胞を 10 cm collagen-coated dish に撒き、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩静置した。24 時間後 pCMV-ANT2 および pcDNA-PHB2-HA または pCMV-ANT2 および pcDNA-HA (コントロールプラスミド) を Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を使用し添付の説明書に従って、トランスフェクションした。トランスフェクションしてから 4 時間後培地を交換して、さらに 24 時間 DMEM 培地で培養した。細胞内 PHB2-ANT2 相互作用を解析する場合トランスフェクション 24 時間後に EtOH (終濃度 0.1%、コントロール)、300 μM capsaicin、または 50 μg/ml CHX を培地に加え更に 24 時間培養し回収した。また、PHB2-ANT2 相互作用を試験管内で解析する場合は薬剤処理をせず細胞を回収した。

回収した薬剤処理細胞を PBS (-)にて洗浄後細胞ミトコンドリア画分を分画²⁹⁾し、IP buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8)、150 mM NaCl、1% sodium deoxycholate、1% Triton X-100) を加えて氷上で 30 分静置することでミトコンドリア画分を溶解した。溶解液を遠心し、上清を抗 HA 抗体レジン (SIGMA) 10 μl と一晩混合した。その後、500 μl の IP buffer で 3 回洗浄した。

細胞内 PHB2-ANT2 相互作用解析を行う場合は、洗浄後、50 μ l の 1 x SDS サンプルバッファーに懸濁し、98°C で 5 分間煮沸して結合タンパク質を溶出した。

次に、PHB2-ANT2 相互作用を試験管内で解析する場合は、洗浄後 capsaicin を加え更に 4°C で 2 時間混合した。その後 500 μ l の IP buffer で 3 回洗浄し 50 μ l の 1 x SDS サンプルバッファーに懸濁し、98°C で 5 分間煮沸して結合タンパク質を溶出した。

溶出された結合タンパク質を、SDS-PAGE により分画した。抗 FLAG 特異抗体、抗 HA 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングにより PHB2-HA または FLAG-ANT2 を検出した。

3.2.4. [3 H]-ADP を用いた ANT による ADP 取込み活性測定

第 2.2.7 節に記載した手順により調整したラット肝ミトコンドリアを ANT buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.25 M sucrose、5 mM succinate、10 μ M EGTA) で 4 mg/ml に希釈し、50 μ l をエッペンドルフチューブに入れ、氷上に置いた。4 x drug 溶液 (capsaicin、FCCP、Atra を各々の濃度で ANT buffer を用いて調整した。DMSO または EtOH 4%) を 50 μ l 加えて混ぜ、氷上で静置した。5 分後、10 μ M [3 H]-ADP を 100 μ l 加え、反応を開始させた。30 秒後、1 mM Atra を 200 μ l 加え、反応を停止させた。遠心 (10,000 x g、2 min、4°C) 後、上清を取り除き、ANT buffer を 500 μ l 加え、ミトコンドリアペレットを洗浄した (ペレットをほぐさず、表面を洗うようにした)。この洗浄操作を計 3 回行った後、50 μ l の 1% SDS を加え、よく攪拌し、ミトコンドリアを溶解した。溶解液を Scintillation cocktail (Perkin Elmer 社) 5 ml と混ぜてよく攪拌し、液体シンチレーションカウンターで測定した。

Lineweaver-Burk plot を作製する際には、[3 H]-ADP の終濃度を 3.3、5、10、20 μ M に調整して実験を行った。

3.2.5. フローサイトメトリーを用いたミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア 50 μ l (1 mg/ml) を 950 μ l の buffer E (0.15 M sucrose、10 mM phosphate (pH 7.4)、20 mM KCl、5 mM MgCl₂、5 mM succinate) に再懸濁した。その後、終濃度 1% EtOH、1 mM capsaicin、30 μ M ATRA、または 1 μ g/ml FCCP で加え、30°C で 5 分間静置した。DMSO に溶解した Rhodamine 123 を最終濃度が 10 μ M になるように添加し、やさしく攪拌した。30°C で 15 分間反応させた後、遠心 (7,000 x g、10 min、4°C) し、上清を捨てた。Rhodamine 123 を取り込んだミトコンドリアを 500 μ l の buffer E で再懸濁、遠心 (7,000 x g、10 min、4°C) し、洗浄した。洗浄操作をもう一度行い、500 μ l の buffer E で再懸濁し、FACS Aria (Becton Dickinson) を用いて、解析を行った。

3.2.6. ミトコンドリアからの cytochrome c および PHB2 放出の解析

ミトコンドリア 60 μ l (5 mg/ml) を 140 μ l の cyto c buffer (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、1 mM phosphate (pH 7.4)、300 mM mannitol、5 mM succinate、0.1% BSA。また PHB2 放出解析時には 100 μ M CaCl₂ を加えた) に再懸濁した。その後、終濃度 1% EtOH、0.1、0.3、1 mM capsaicin、30 μ M ATRA、または 1 μ g/ml FCCP で加え、30°C で 30 分間振盪した。振盪反応させた後、遠心 (10,000 x g、10 min、4°C) し上清を回収した。上清を、SDS-PAGE により分画した後に、抗 cytochrome c 特異抗体、抗 PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングにより cytochrome c または PHB2 を検出した³¹⁾。

3.3. 結果および考察

3.3.1. 細胞内 PHB2-ANT2 相互作用の阻害

PHB2 による免疫沈降により ANT2 が共沈降することが知られている²⁹⁾。だが PHB2 と ANT2 との相互作用が ANT 活性に対して影響を示すかどうかは知られていない。

そこでまず、PHB2-ANT2 相互作用に対する capsaicin の影響を、第 3.2.3 節にて述べたように細胞内および試験管内にて検討した。

PHB2-HA および FLAG-ANT2 を共発現させた 293T 細胞に capsaicin またはアポトーシス誘導タンパク合成阻害剤 CHX を処理した後、免疫沈降法を用いてそれぞれのタンパク質の結合を確認した。その結果を図 3-1 に示した。

レーン 1 では PHB2-HA および FLAG-ANT2 発現サンプルのインプット、またレーン 2 では FLAG-ANT2 のみ（コントロール）を発現サンプルのインプットを示した。共に FLAG-ANT2 が同程度発現していることが確認された。

レーン 3 から 6 では PHB2-HA にて免疫沈降を行った結果が示されている。薬剤無処理、capsaicin、または CHX 処理において PHB2-HA の量は同程度である。次に、共沈降されてくる FLAG-ANT2 を確認した。薬剤無処理では FLAG-ANT2 を検出したのに対して、capsaicin 処理では FLAG-ANT2 のバンドが消失した。アポトーシスのコントロールとしておいた CHX においては FLAG-ANT2 のバンドは薬剤無処理のそれと変わらないことが示された。コントロールであるレーン 6 では HA レジン非特異的に FLAG-ANT2 が沈降してきていないことを示した。

以上から、細胞に capsaicin を処理することで PHB2-ANT2 相互作用を阻害する可能性を示した。

3.3.2. 試験管内 PHB2-ANT2 相互作用の阻害

第 3.3.1 節にて細胞内における PHB2-ANT2 相互作用が capsaicin により阻害される可能性が示された。確かに、アポトーシス誘導剤として用いた CHX 処理により相互作用阻害が見られなかったことから、アポトーシスが起きた結果タンパク間相互作用が阻害されたのではなく、capsaicin 特異的な現象として、またアポトーシスの原因として PHB2-ANT2 相互作用阻害が生じると考えられる。だが、これが capsaicin による直接的なタンパク間相互作用阻害が原因で生じているのか、アポトーシスが起こった結果相互作用が阻害されているのかはつきりは言えない。

そこで、次に PHB2-ANT2 相互作用を試験管内で解析することで、このタンパク間相互作用阻害が capsaicin 特異的かどうかを検討した。その結果を図 3-2 に示した。

レーン 1 では PHB2-HA および FLAG-ANT2 発現サンプルのインプット、またレーン 2 では mock (コントロール) のインプットを示した。レーン 1 では FLAG-ANT2 が発現していることが確認された。

レーン 3 から 6 では PHB2-HA にて免疫沈降を行った結果を示した。細胞溶解液に HA レジンを加え、IP buffer により洗浄したので HA レジン上には PHB2-HA およびその結合因子が結合して残っていると考えられる。そこに capsaicin を加え反応後洗浄した。これにより capsaicin 処理により PHB2-HA から解離したタンパク質を除くことが出来る。レーン 3 は薬剤無処理であり FLAG-ANT2 が共沈降されていることが確認出来た。レーン 4 および 5 には capsaicin を加えた。Capsaicin 濃度依存的に FLAG-ANT2 が共沈降されなくなったことが示された。コントロールであるレーン 6 では HA レジン非特異的に FLAG-ANT2 が沈降しないことを示した。

以上試験管内においても PHB2-ANT2 相互作用阻害が capsaicin により生じることが示された。このことから PHB2-ANT2 相互作用阻害は、capsaicin 特異的かつ直接

的なタンパク間相互作用阻害により起こる現象だと示された。タンパク間相互作用を阻害する低分子化合物は非常に希であることから、この結果は大変興味深い。

3.3.3. Adenine Nucleotide Transporter (ANT) 活性の非競合的阻害

第 3.3.1 節および第 3.3.2 節にて、capsaicin による PHB2-ANT2 相互作用阻害が示された。この相互作用阻害が ANT、そして更にはミトコンドリアそのものへの機能阻害につながると考え、次にラット肝ミトコンドリアを用いて capsaicin による ANT 活性への影響を解析した。

ANT はミトコンドリア内膜に存在する ADP/ATP のアンチポーターであり、ミトコンドリア外からミトコンドリア内へ ADP を取込み、同時にミトコンドリア内からミトコンドリア外へ ATP を排出する。この働きを ANT 活性と定義する。

第 3.2.4 節で述べた ANT 活性測定法の結果を図 3-3 に示した。Capsaicin は濃度依存的に ANT 活性を阻害することが示された（図 3-3 パネル(a)）。コントロールとして膜電位脱分極剤であるプロトンイオノフォア、FCCP を用いたが、ANT 活性には影響を与えなかった。またポジティブコントロールとして ANT 特異的阻害剤 Atractyloside (Atra) を用い、ほぼ 100% ANT 活性を阻害することを確認した。

次に、capsaicin による ADP のミトコンドリアへの取り込み阻害が、競合的な阻害かどうかを明らかにするために、Lineweaver-Burk plot を作製した（図 3-3 パネル(b)）。その結果、各 capsaicin 濃度におけるプロット交点が、x 軸近傍に得られた。通常、y 軸上にて交わる場合を「競合阻害」、x 軸上にて交わる場合を「非競合阻害」と言う。今回得られた capsaicin による阻害様式は、「混合阻害」と定義されるものであった。混合阻害とは、阻害剤が単独の酵素と酵素-基質複合体の両方に結合する様式を言い、競合阻害と非競合阻害の和からなる、と考えられている。

ANT 活性における ADP の K_m 値は約 $3.1 \mu\text{M}$ であった。これに対して、酵素と阻害剤による K_i 値は $242.73 \mu\text{M}$ 、酵素-基質複合体と阻害剤による K'_i 値は $444.46 \mu\text{M}$ であり、各プロットの交点から見かけ上の capsaicin の K_i 値は $176 \mu\text{M}$ であることがわかった。概して K_m 値と K_i 値をそのまま比較することができ、capsaicin による ANT 活性阻害は 2 桁の濃度差があることが示された。

一般的に酵素活性の競合阻害の場合、酵素基質結合部位ポケットにリガンドが結合する。これに対して非競合阻害の場合はポケットと異なる部分に結合し、不可逆的ないしはアロステリックに酵素活性を阻害する。ANT は ADP/ATP 結合部位を持つ膜貫通タンパク質である。ANT の X 線結晶構造解析から、ADP/ATP 結合部位以外にはリガンド結合ポケットを有さないと考えられる³²⁾。

これまでに、capsaicin による PHB2-ANT2 相互作用阻害と ANT 活性の非競合的に阻害を明らかにした。Capsaicin による ANT 活性阻害が非競合であることから ANT の ADP/ATP 結合部位以外に capsaicin は結合をしていると考えられる。だが、capsaicin と ANT2 との直接結合は見られていなかった（データは示さず）。

以上のことをふまえると、capsaicin による ANT 活性阻害は、capsaicin が PHB2 に直接結合し、PHB2-ANT2 相互作用阻害に起因すると考えた。そして ANT2 が PHB2 との結合を失うと足場を失い、その結果 ANT 活性阻害が生じ、間接的、つまり非競合的阻害が生じると考えた。PHB2 は ANT 活性をタンパク間相互作用により制御している、ANT 活性調節能を有すると考えられる。

3.3.4. ミトコンドリア膜電位の消失

Capsaicin は PHB2 に直接結合し、ANT2 からの乖離を誘導、また ANT による ADP 取り込み活性を阻害した。これらの結果から capsaicin がミトコンドリア活性に直接

影響を与えていることを示した。

これまでに **capsaicin** が神経系および非神経系の両細胞種のミトコンドリア膜電位の消失を引き起こすことが報告されている³³⁾。そこで次に単離ミトコンドリアを用いて **capsaicin** が直接ミトコンドリア膜電位に影響を与えるかを調べることにした。

細胞内の活性ミトコンドリアの膜電位は通常 -180 mV に保たれており、その膜電位の崩壊は、細胞のアポトーシスの引き金となったり、アポトーシスを促進したりする。これらのことから、ミトコンドリアの膜電位の変化はミトコンドリア活性を検討するためによく用いられている。そこで、**capsaicin** が単離ミトコンドリアの膜電位に及ぼす影響を検討した。**Rhodamine123** は細胞膜透過性の陽イオン性蛍光色素であり、ミトコンドリア膜を容易に通過し、負電位を持つミトコンドリアに蓄積する。この **Rhodamine123** を用いて、**capsaicin** 及び ANT 特異的阻害剤 **Atra** のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を FACS によって解析したところ、 1 mM **capsaicin** ではほぼ完全に、また $100\text{ }\mu\text{M}$ **Atra** は5割強ミトコンドリア膜電位を崩壊させた(図 3-4)。

以上から **capsaicin** はミトコンドリアそのものにも障害を与えていると考えられる。

3.3.5. Capsaicin によるミトコンドリア傷害

ミトコンドリアはアポトーシスにおいて中心的な役割に担い、「アポトーシスの司令塔」とも言われる。ミトコンドリア膜間には、アポトーシス経路の一つであるカスパーズ-9 経路に必須の因子 **cytochrome c** が存在する。様々なアポトーシスシグナルがミトコンドリアに入ること、またはミトコンドリアそのものの機能障害、または物理的傷害が加わることで **cytochrome c** がミトコンドリア外膜を経て細胞質へ放出される。このステップは **cytochrome c** 依存的アポトーシスに必須である。

今回 **capsaicin** は **PHB2** に結合し、**PHB2** と **ANT2** との結合を阻害した。この結果

から capsaicin 処理により PHB の足場構造は破壊され、ミトコンドリアそのものに物理的傷害を加えているのではないかと考えた。ミトコンドリアそのものに傷害を与えるのであればその膜間にある cytochrome *c* が細胞質に放出される可能性がある。そこで単離ミトコンドリアに対して capsaicin を処理しミトコンドリア膜間に局在する cytochrome *c* がミトコンドリア外に放出されるかを確認することとした。

図 3-5 パネル(a) に薬剤処理によりミトコンドリアから放出された cytochrome *c* を示した。レーン 1 は薬剤無処理（コントロール）、レーン 2 から 4 では capsaicin を 0.1、0.3、そして 1.0 mM で加えた。Capsaicin 処理により濃度依存的に cytochrome *c* 放出が確認された。これに対して、レーン 5 にて FCCP を加えた。ミトコンドリア膜電位を消失させる FCCP では cytochrome *c* は放出されなかった。レーン 6 で示した ATRA は、cytochrome *c* 放出が生じることが知られており³¹⁾、本実験でも確かに放出された。

Capsaicin は PHB2-ANT2 結合阻害を引き起こしたので、cytochrome *c* 放出同様に PHB2 もミトコンドリアから放出されるのではないかと考えた。実際 PHB2 は様々な刺激に対してその局在を変化させることが知られており^{28, 29, 34-36)}、PHB2 がミトコンドリアから放出されることは十分にあり得る。よって図 3-5 パネル(b) にて PHB2 放出を検出した。

レーン 1 は薬剤無処理（コントロール）、レーン 2 から 4 では capsaicin を 0.1、0.3、そして 1.0 mM で加えた。Capsaicin 処理により濃度依存的に PHB2 放出が確認された。これに対して、レーン 5 にて FCCP、レーン 6 で ATRA を加えたが PHB2 放出は確認できなかった。

以上から、capsaicin 処理によりミトコンドリアから cytochrome *c* および PHB2 放出が引き起こされる。ミトコンドリア膜電位を消失させる FCCP では cytochrome *c*

および PHB2 の放出が確認されなかった。また ANT 特異的阻害剤 ATRA では、cytochrome c 放出は生じるが PHB2 放出が起きないことが示された。

Capsaicin と ATRA ではミトコンドリアに対して、1) ANT 活性阻害、2) 膜電位消失、3) cytochrome c 放出誘導、と薬効として似た点が多い。ATRA による ANT 活性阻害が cytochrome c 放出を誘導することは知られており、capsaicin による cytochrome c 放出も ANT 活性阻害の結果生じたとも考えられる。だが、capsaicin は PHB2 放出を誘導した。この点に関しては ATRA と異なっていた。このことから capsaicin は ANT 活性阻害による cytochrome c 放出誘導もあるかもしれないが、PHB2 に結合することでなんらかの影響を与え cytochrome c および PHB2 の放出を誘導していると考えられる。

3.4. 本章のまとめ

本章をまとめる。本章では、capsaicin によるミトコンドリアへの影響を検討した。

- 1) Capsaicin は細胞内および試験管内で PHB2-ANT2 相互作用を直接阻害した。
- 2) Capsaicin は、ANT を介したミトコンドリアへの ADP 取り込み活性を濃度依存的かつ非競合に阻害した。
- 3) Capsaicin はミトコンドリア膜電位消失を誘導した。
- 4) Capsaicin がミトコンドリアから cytochrome c および PHB2 放出を直接誘導した。

これまでに **capsaicin** が細胞内 ROS 上昇、ミトコンドリア膜電位消失を誘導することが知られており、ミトコンドリアに何かしら影響を与えていることが予測された。そして更に今回 **capsaicin** 結合因子としてミトコンドリアタンパク質 **PHB2** を得たことから、**capsaicin** がミトコンドリアに影響を与えることが予測された。実際ミトコンドリア機能の一つ、呼吸に関わる ANT 活性を阻害することが新たに示され、またミトコンドリアからミトコンドリア内に含まれる因子の放出が確認され、ミトコンドリアへの直接的な傷害が示唆された。

そこで続いて、**capsaicin** により **PHB2** のミトコンドリアから細胞質への放出がアポトーシス誘導機構にどのような意義を持つのかを検討する。次章では細胞を用いて、**PHB2** 局在およびアポトーシスへの関与を調べた。

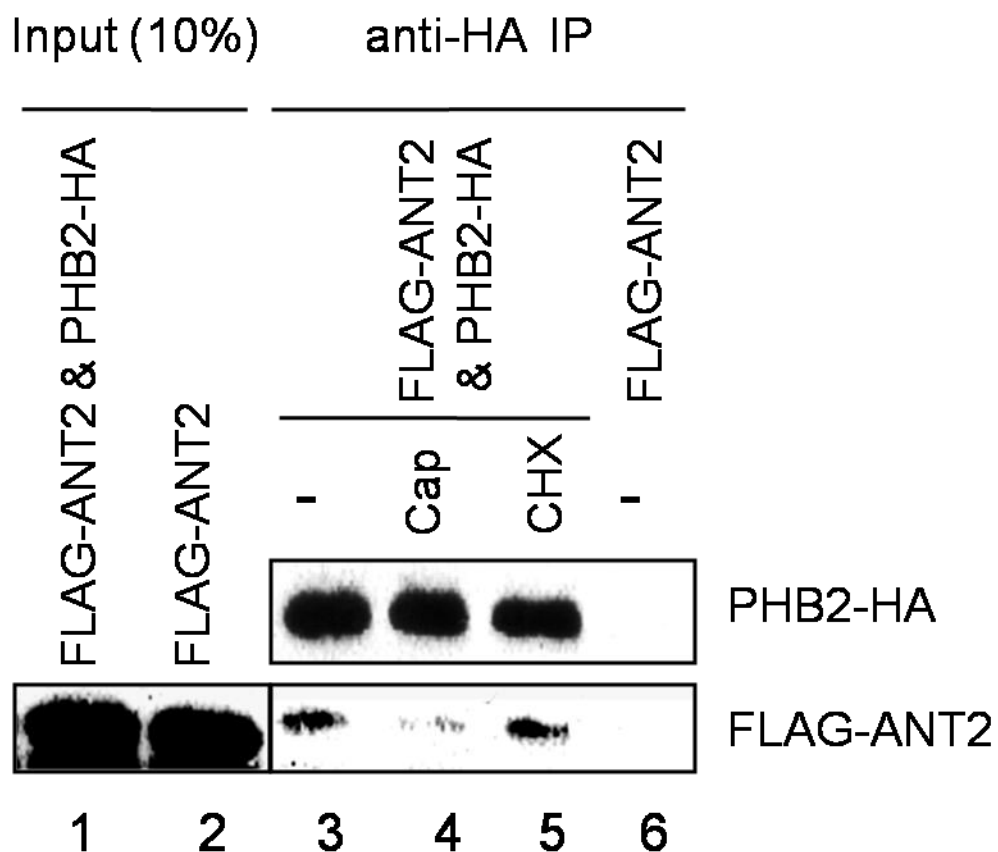


図 3-1 免疫沈降法を用いた細胞内での PHB2-ANT2 相互作用の解析

FLAG-ANT2 および PHB2-HA を共発現させた 293T 細胞に、300 μ M capsaicin または 50 μ g/ml CHX を 24 時間処理した。その後溶解し抗 HA 抗体レジンにて免疫沈降を行った。抗 HA 特異抗体にて PHB2 を、抗 FLAG 特異抗体にて ANT2 をウェスタンブロッティングにて検出した (Cap, capsaicin、CHX, cycloheximide)。

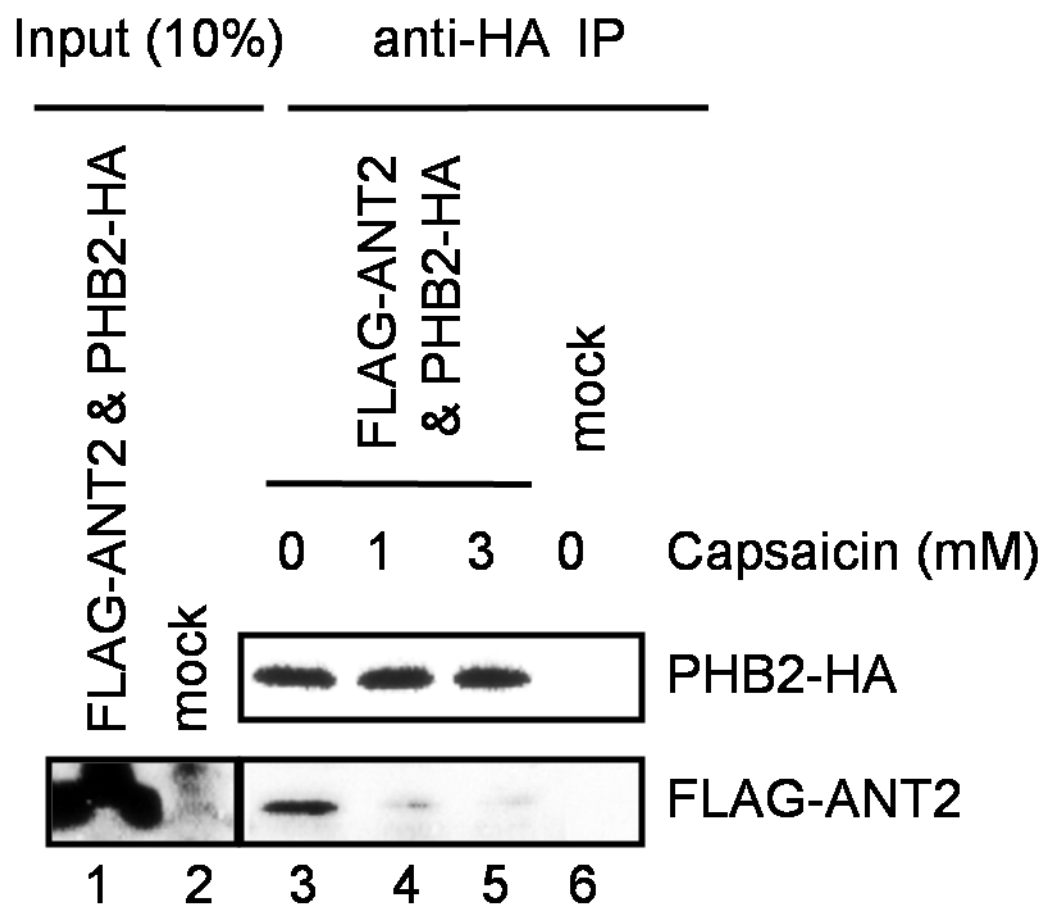
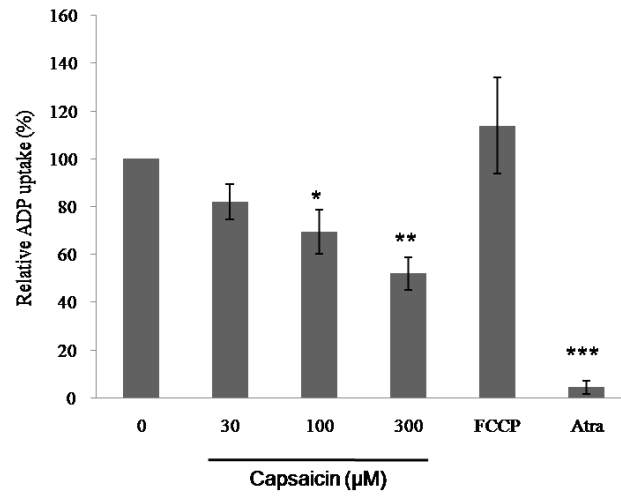


図 3-2 免疫沈降法を用いた試験管内での PHB2-ANT2 相互作用の解析

FLAG-ANT2 および PHB2-HA を共発現させた 293T 細胞を溶解し抗 HA 抗体レジンにて免疫沈降を行った。レジン上に PHB2-ANT2 複合体が形成されている中に、capsaicin を加え 4°C で 2 時間混合した。その後抗 HA 特異抗体にて PHB2 を、抗 FLAG 特異抗体にて ANT2 をウェスタンブロッティングにて検出した。

(a) CapsaicinのADP取り込み阻害



(b) Lineweaver-Burk プロット

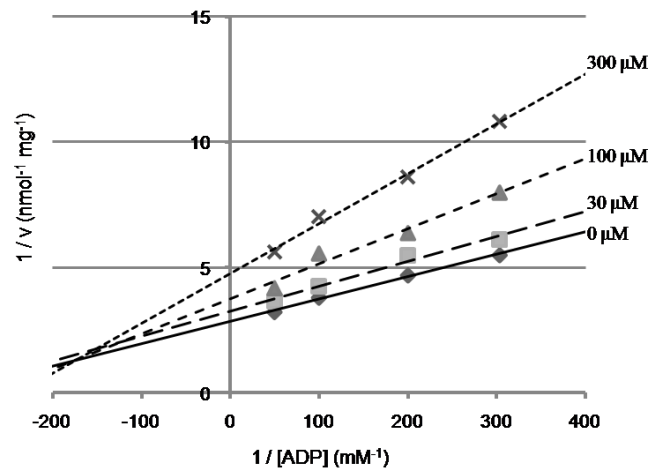


図 3-3 Capsaicin による ANT を介した ADP 取り込み活性阻害

(a) ラット肝ミトコンドリアに、30-300 μM capsaicin、1 μg/ml FCCP、または 100 μM ATRA を加え 5 分した後、³H-ADP を 30 秒取り込ませた。取り込み反応は 1 M ATRA を加えて停止させた (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。 (b) 各濃度の capsaicin を加えたミトコンドリアへの ADP 取り込み活性における Lineweaver-Burk プロット。

$K_i = 176 \mu\text{M}$ 。

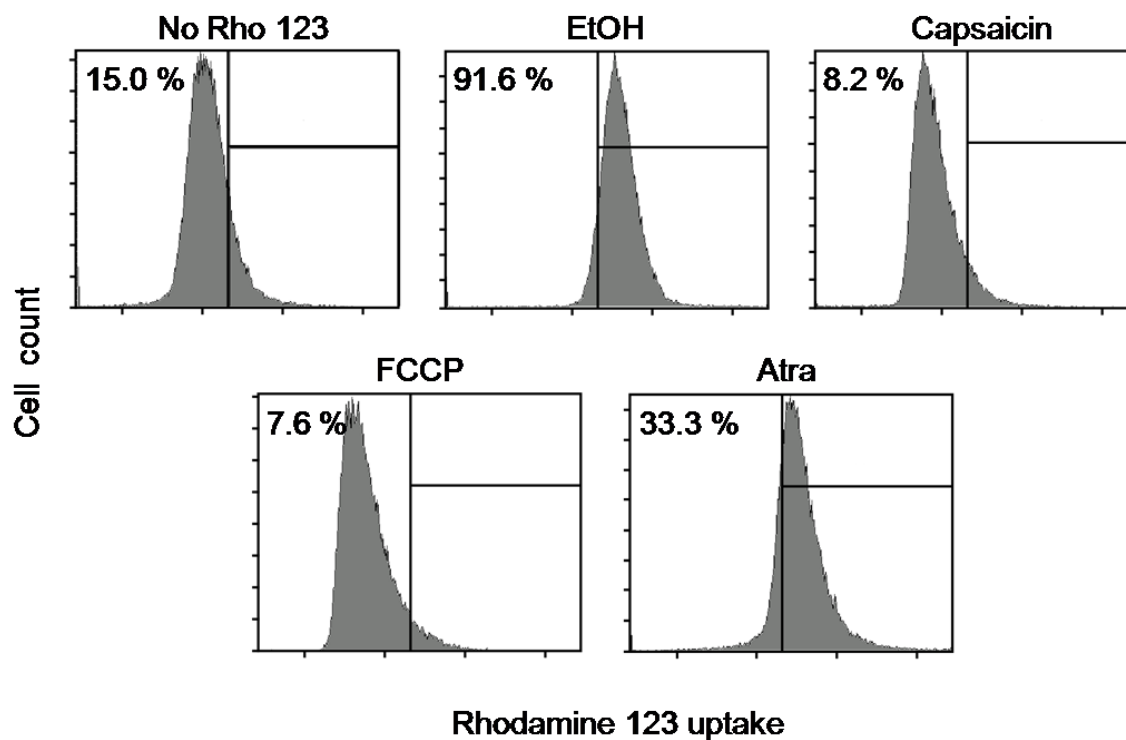
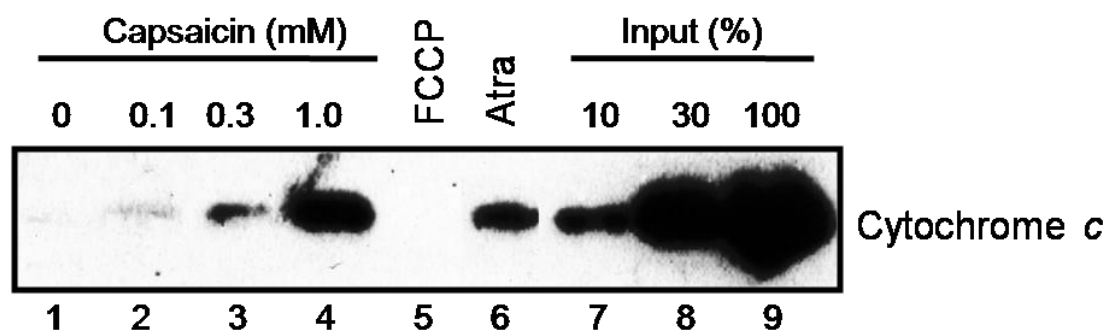


図 3-4 Capsaicin によるミトコンドリア膜電位への影響

ラット肝ミトコンドリアに 1 mM capsaicin、1 μ g/ml FCCP、または 100 μ M Atra を加え 5 分間 30°C で前処理をした。その後に Rhodamine (Rho) 123 を加え 15 分間処理した。Rho123 により染色の後 FACS を用いて解析を行った。各パネル左上端に示したパーセンテージは Rho123 で染色されたミトコンドリアの割合を示した。

(a)



(b)

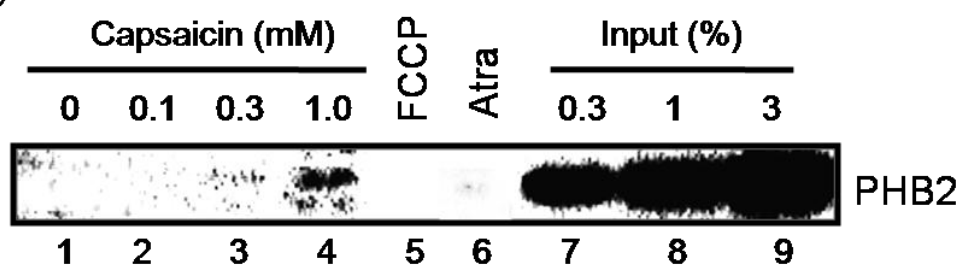


図 3-5 Capsaicin によるミトコンドリアからの cytochrome c および PHB2 放出

ラット肝ミトコンドリアを第 3.2.6 節に述べたように、0.1 - 1 mM capsaicin、1 μ g/ml FCCP、または 100 μ M Atra を 30 分処理した。遠心により回収した後上清の一部を抗 cytochrome c 特異抗体または抗 PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングによって検出した。

4. Capsaicin による p53 活性化

Capsaicin はミトコンドリアから PHB2 を放出させた。この PHB2 の放出がアポトーシス誘導機構にどのような意義を持つのかを検討する。本章では細胞を用いて、PHB2 局在を調べた。さらに p53 との関わりに注目しアポトーシスへの関与を調べた。

4.1. はじめに

第 3 章にて capsaicin がミトコンドリアを直接傷害することを示した。また膜貫通部位を持つ PHB2 がミトコンドリアから放出されるという、きわめて希な現象が観察された。

PHB1 および PHB2 はミトコンドリア内膜に局在すると言われる。アミノ酸配列からミトコンドリア・ターゲティング配列 (mitochondrial targeting sequence, MTS) と膜貫通ドメイン (Hydrophobic stretch) をそれぞれ N 末に存在すると予測されており²⁷⁻¹⁹⁾ (図 2-6 パネル(a))、実際に GFP 融合 PHB1 および PHB2 を用いてその局在を示している²⁹⁾。これに対して、PHB は核にも存在することが知られている^{29, 34-36)}。アミノ酸配列から、nuclear receptor-interaction box (NR, LxxLL) および核移行シグナル配列 (nuclear localization sequence, NLS) の存在が示され、実際に様々な刺激に応答しミトコンドリアから核へ移行すること、核内タンパク質、特に核内転写因子群との結合が知られている。PHB との相互作用が報告されている転写因子の中には、Estrogen Receptor、Androgen receptor、またはガンに関係する Retinoblastoma protein、E2F、そして p53 などがある。局在に関しては、一般的には無刺激状態ではミトコンドリアに局在しているとされる一方、無刺激状態でも核に局在しているとする報告もあり、未だ諸説ある。

このように PHB と p53 の関係が報告されており、また第 1.2.3 節にでも述べたように capsaicin 処理による p53 活性化が報告されている¹²⁾。Capsaicin と p53 活性化、そして capsaicin と PHB2 の結合、PHB と p53 の相互作用。これら 3 つの間に関わりが見受けられる。そこで、capsaicin が PHB2 の核移行を誘導し、PHB2 と p53 との結合および p53 依存的転写の活性化を促すと仮説を立てた。本章では、細胞を用いて capsaicin による PHB2 の局在変化および PHB2-p53 相互作用を解析した。

PHB2 局在変化調べる方法には、免疫染色法および細胞分画を用いた。さらに PHB2-p53 相互作用を免疫沈降法、p53 依存的転写の活性化をレポーターアッセイにて解析を行った。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 試薬

第 2 章および第 3 章にて記載した以外の試薬を以下にまとめた。

- MitoTracker Red CM-H₂XRos

Molecular Probes より購入し、DMSO で 10 μ M の濃度で溶解し、-30°C で保存した。

- Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG

Molecular Probes より購入した。使用時は TBS-T にて 100 倍希釈した。

- ラビット抗 hSpt5 抗体

当研究室所属、山口雄輝氏より譲渡して頂いた³⁷⁾。使用時は 1% BSA Buffer にて 10,000 倍希釈した。

- マウス抗 GAPDH 抗体

Chemicon（株）より購入し、4°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 3,000 倍希釈した。

- マウス抗 VDAC（31HL）抗体

Calbiochem（株）より購入し、-20°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 1,000 倍希釈した。

- マウス抗 p53 (Ab-1)抗体

Oncogen（株）より購入し、-20°C で保存した。使用時はブロッキング Buffer にて 1,000 倍希釈した。

- Protein G セファロースビーズ

GE Healthcare（株）より購入し、4°C で保存した。

- Dual-Luciferase Reporter Assay System

Promegay（株）より購入し、-20°C で保存した。

4.2.2. プラスミドベクターの構築

本章では以下プラスミドを構築・使用した。

- ① pHyg-HA-p53 ; N 末 HA タグ融合 p53 プラスミド

NB4 細胞の cDNA library より、PCR 法により p53 をコードする cDNA を作製し

た（プライマー：Fwd-*Bam*HI-p53 と Rev-*Xho*I-p53）。5'末端を *Bam*HI、3'末端を *Xho*I で切断し、哺乳類 N 末 HA タグ融合タンパク質発現ベクターpHygEF2-HA に組み込んだ。

② pGV-P-p53 ; p53 結合配列含有レポータープラスミド

p21 遺伝子プロモーター由来 p53 結合配列をオリゴヌクレオチド（sense strand, 5'-tttacgcgtaagcttggaacatgttcttgacatgtctctcgagttt-3'; antisense strand, 5'-aaaactcgagagacatgtcaagacatgttccaagcttacgcgtaaa-3'）をアニーリング後に 5'末端を *Mlu*II、3'末端を *Xho*I で切断し、ホタルルシフェラーゼ遺伝を持つレポータープラスミドベクターpGV-P に組み込んだ。

③ pHygEF2-Rluc ; レニラ由来ルシフェラーゼ遺伝子含有レポータープラスミド
当研究室所属、平尾聡氏より譲渡して頂いた³⁸⁾。

使用したプライマー

● Fwd-*Bam*HI-p53

5'-aaaggatccatggagccgcagtcaga-3'

● Rev-*Xho*I-p53

5'- aaactcgagtcagtcctgagtcaggcccttc-3'

4.2.3. 免疫染色法による PHB2 細胞内局在変化の解析

12 well MTP に 35 mm ポリリジン被覆カバーガラスを置き、そのカバーガラス上

に 1×10^5 個の HeLa 細胞を撒き 37°C の CO₂ インキュベーター内で一晩静置した。

24 時間後 300 μ M capsaicin、または 50 μ g/ml CHX を加え更に 24 時間培養した。

薬剤処理後の細胞に MitoTracker Red CM-H₂XRos を終濃度 200 nM で加え 30 分間ミトコンドリアを染色した。ミトコンドリア染色後 PBS (-) で 3 度洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド-PBS (-) にカバーガラスを室温で 15 分間浸し、HeLa 細胞を固定した。PBS (-) で 2 回軽く洗浄後、50 mM NH₄Cl-PBS (-) に浸し室温で 10 分間反応させて、残存したパラホルムアルデヒドを不活性化した。PBS (-) で 2 回軽く洗浄し、0.2% Triton-X-100-PBS (-) に浸して室温で 20 分間反応させて、膜透過処理を行った。PBS (-) で 2 回軽く洗浄し、2% BSA-PBS (-) に浸して室温で 30 分間反応させた。PBS (-) で 3 回洗浄し、抗 PHB2 抗体溶液 (PBS (-) にラビット抗 PHB2 抗体を 100 倍希釈) に浸し、37°C の CO₂ インキュベーター内で 1 時間反応させた。その後、TBS-T で 3 回洗浄し、Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG 溶液に浸し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、水で塩を洗い落とし、このカバーガラスをスライドガラス上の VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.) に置いた。オリンパス社蛍光顕微鏡を用いて、緑色の蛍光を発する PHB2、赤色の蛍光を発するミトコンドリア、そして青色の蛍光を発する核の局在を観察した。蛍光画像は OpenLab™ ソフトウェアにより解析した。

4.2.4. 細胞分画による PHB2 細胞内局在変化の解析

NB4 細胞を 10 cm non-treated dish にまき、capsaicin を終濃度 0、30、100、300 μ M で加え 24 時間培養後細胞を回収した。

回収した細胞を PBS (-) にて洗浄後 500 μ l の CP lysis buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8)、150 mM NaCl、0.1% NP40、1 mM PMSF) を用いて氷上で 20 分静置することで細胞

を溶解した。溶解液を 400 x g、15 分、4°C で遠心し、上清を細胞質およびミトコンドリア抽出画分として保存した。遠心後のペレットを 500µl の CP lysis buffer で 1 回洗浄後した。遠心後上清を除きペレットに NE lysis buffer (40 mM Tris-HCl (pH 8)、400 mM NaCl、0.1% NP40、1 mM PMSF) を加え更に氷上で 20 分静置した。溶解液を 10,000 x g、15 分、4°C で遠心し、上清を核画分として保存した。それぞれの画分を、SDS-PAGE により分画した後に、核画分のマーカーとして抗 hSpt5 特異抗体、細胞質画分のマーカーとして抗 GAPDH 特異抗体、ミトコンドリア画分マーカーとして抗 VDAC 特異抗体、そして抗 PHB2 抗体を用いてウェスタンブロッティングによりそれぞれのタンパク質を検出した。

4.2.5. 免疫沈降法による PHB2-p53 相互作用の解析

NB4 細胞を 10 cm non-treated dish にまき、終濃度 300 µM capsaicin を 0、1、3、6 時間で処理した後細胞を回収した。細胞を第 3.2.3 項で用いた IP buffer にて溶解し細胞抽出液を作製した。細胞抽出液に 1µg の抗 PHB2 特異抗体を加えて、4°C で一晩反応させた。予め IP buffer で 3 回洗浄しておいた Protein G セファロースビーズに、抗 PHB2 特異抗体と反応させた細胞抽出液を混合し、4°C で 2 時間反応させた。その後、IP buffer で 3 回洗浄し、SDS サンプルバッファーに懸濁し、98°C で 5 分間煮沸して結合タンパク質を溶出した。溶出された結合タンパク質を、SDS-PAGE により分画し、抗 p53 特異抗体、抗 PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングにより p53 または PHB2 を検出した。

4.2.6. レポーターアッセイによる p53 依存的転写活性測定

1 x 10⁵ 個の 293T 細胞を 24well MTP にまき、翌日 0.02 µg pHyg-HA-p53、0.01 µg

pHygEF2-Rluc、さらに pGV-P-p53、または pGV-P（コントロールベクター）を Lipofectamine™ 2000（Invitrogen）を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、4 時間後に DMEM 培地に培地を交換し、24 時間培養した。その後、capsaicin を終濃度 0、30、100 μ M で加え更に 24 時間培養した。PBS で 2 回洗浄した後 Dual-Luciferase Reporter Assay System を使用し添付の説明書に従って、レポーターアッセイを行った。

4.3. 結果および考察

4.3.1. Capsaicin 処理による PHB2 の核移行

第 3 章ミトコンドリアへの capsaicin 処理によって PHB2 放出が確認された。次にミトコンドリアから放出された PHB2 がどのような挙動を示すのかを HeLa 細胞を用いて調べた。HeLa 細胞に対して capsaicin 処理による PHB2 の局在を図 4-1 に示した。MitoTracker はミトコンドリアを染め、細胞質部位の指標とした。DAPI は核を染めて核部位の指標とした。

無刺激においては HeLa 細胞内で PHB2 は細胞全体に広がって存在することが示された。核における PHB2 の蛍光は、細胞質のそれに比べて強いが細胞質全体へ広がって見えるように見える。これに対して capsaicin 処理において PHB2 の核への集積が確認された。細胞質に見られた PHB2 の蛍光が消え、核に集積した。またアポトーシス誘導剤である CHX では PHB2 局在変化は見えなかった。

第 3.3.1 節で述べたように CHX はアポトーシスを誘導するものの、PHB2-ANT2 相互作用を阻害することはなかった。また CHX による PHB2 局在変化は生じなかった。このことは capsaicin による PHB2-ANT2 相互作用の阻害およびミトコンドリアからの PHB2 放出の特異性を示唆する。アポトーシスの結果生じる現象ではなく

capsaicin が PHB2-ANT2 相互作用を特異的に阻害した結果ミトコンドリアからの PHB2 放出、それに続く核移行が生じることを強く示唆する。

次に、PHB2 局在変化を定量的に調べるために、NB4 細胞を用いて細胞分画を行った。NB4 細胞に capsaicin 処理を行い、細胞質とミトコンドリアを含む画分 (CP) と核画分 (NE) とに分画した。核画分のマーカーとしてヒト転写伸長因子 DSIF のサブユニット hSpt5 と、細胞質画分は GAPDH、ミトコンドリア画分はミトコンドリア外膜局在の VDAC を用いた。

結果を図 4-2 に示した。Capsaicin 100 μ M 以上において核での PHB2 集積が見られた。レーン 1、2 は薬剤無処理を示し、主に細胞質に PHB2 の局在が見られた。若干ではあるが核画分にも PHB2 が見られる。レーン 3、4 は capsaicin 30 μ M 処理を示すが、薬剤無処理と同様に PHB2 は主に細胞質に局在した。レーン 5、6 は capsaicin 100 μ M 処理、レーン 7、8 は capsaicin 300 μ M 処理を示し、PHB2 の核への集積が確認された。

以上より、子宮頸ガン細胞株 HeLa 細胞と急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞という異なる細胞種においても、また免疫染色による定性的分析および細胞分画とウェスタンブロッティングによる定量的分析においても、capsaicin 処理による PHB2 の核移行は確認された。

4.3.2. Capsaicin 処理による PHB2-p53 相互作用の誘導

Capsaicin 処理の細胞において PHB2 の核への集積が示唆された。PHB には MTS が存在すると同時に NLS も存在し、ミトコンドリアから放出された PHB は核への移行が予測された。また PHB はこれまでに多くの核内タンパク質との結合が報告されてきた^{29, 34-36)}。この核移行と核内タンパク質との結合に関する報告から、次のよう

な仮説を立てた。Capsaicin による PHB2 の核移行は核内での p53 との結合を誘導し、p53 依存的転写の活性化を引き起こす。p53 に注目した理由としては、NB4 細胞のような p53 を有する骨髄性白血病において capsaicin が、より低濃度でアポトーシスを誘導する点にある。実際 PHB1 は p53 との結合が報告されており、p53 依存的転写の活性化に作用することも分かっている。PHB1 の相同体である PHB2 にも同様な働きがあると考え、capsaicin による PHB2 と p53 の相互作用誘導が起こるかどうかを免疫沈降法により検討した。

Capsaicin 処理した NB4 細胞を溶解し、抗 PHB2 特異的抗体により免疫沈降を行った。結果を図 4-3 に示したように、capsaicin 処理時間依存的に、抗 PHB2 特異抗体によって p53 が共沈降されてくることが示された。ゆえに capsaicin 処理により核移行した PHB2 は p53 との結合を誘導する可能性が示唆された。これまで PHB1 と p53 とが結合は報告されている^{35, 36)}。図 2-6 パネル(a) に示したように PHB1 には、その N 末に NR 様配列を有しており、これまでに PHB1 の N 末半分の欠損タンパク質と p53 との結合が報告されている。PHB1 と高い相同性を有し、NR 配列を有する PHB2 にも PHB1 同様の p53 結合能および転写制御機能が存在する可能性がある予測される。

4.3.3. Capsaicin 処理による p53 依存的な転写活性化

Capsaicin によるアポトーシスには p53 の関与が示唆されてきた¹²⁾。実際 capsaicin 処理により細胞内の p21 や Bax といった p53 依存的な転写産物のタンパク質レベルでの増加が確認されている¹¹⁾。よって capsaicin が p53 依存的な転写活性を促進していることが示唆される。今回 capsaicin 処理により PHB2 核移行、そして p53 との相互作用が生じることとの関連から、PHB2 と p53 との相互作用により p53 依存的な

転写活性を促進していることが予測された。そこで、p21 遺伝子由来 p53 認識配列を有するレポータープラスミドを用いて capsaicin による p53 依存的な転写活性を調べた。

結果を図 4-4 に示した。p53 認識配列を含まないコントロールプラスミドでは、capsaicin 有無にてレポーター活性の差はなかった。これに対して p53 認識配列を含むレポータープラスミドでは、capsaicin 濃度依存的に p53 レポーター活性の増強を示した。このことから p53 依存的な転写活性が capsaicin 処理により増加することが示された。

Capsaicin 処理による PHB2 核移行、PHB2-p53 相互作用誘導、そして p53 依存的転写活性の促進という一連の結果から、核内での PHB2 と p53 との相互作用が p53 依存的転写活性を促進している可能性を示した。

もちろん capsaicin による p53 転写活性促進が PHB2 だけによるもの、また PHB2 を介しているとは本結果だけでは言い切れない。Capsaicin 処理により細胞内 ROS 上昇が報告されており¹²⁾、ROS による DNA 損傷、それに続く p53 活性化も起こりうる。本来ならば遺伝子上での PHB2 と p53 との局在をクロマチン免疫沈降法（Chromatin Immunoprecipitation, ChIP）により解析べきである。また PHB の関与を示すためには PHB のノックダウンによる capsaicin の影響の変化を確認することも必要である。ただし、PHB のノックダウンはミトコンドリアに障害を与え、それだけでアポトーシスを誘導してしまい、p53 との関与を見ることが難しい。今後 ChIP およびノックダウンを用いて、より詳細な capsaicin による p53 転写活性促進メカニズムの解析が求められる。

4.4. 本章のまとめ

本章をまとめる。本章では、capsaicin による p53 活性化を検討した。

- 1) Capsaicin 処理 HeLa 細胞において PHB2 の核への集積が生ずるのに対し、アポトーシス誘導剤である CHX では起こさないことを免疫染色法で示した。
- 2) Capsaicin 処理 NB4 細胞において濃度依存的に PHB2 の核への集積が生じることを、細胞分画法を用いて示した。
- 3) Capsaicin 処理 NB4 細胞を溶解し、抗 PHB2 特異抗体を用いた免疫沈降法にて、PHB2 と p53 の相互作用が生じることを示した。
- 4) Capsaicin 処理により p53 依存的転写活性が促進されることを、p53 認識配列含有レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより示した。

これまでに、PHB2 局在は様々な刺激に応答し変化することが知られており、capsaicin による局在変化が生じることが予測された。実際、capsaicin によりミトコンドリアから細胞質へ放出された PHB2 が核集積を起こした。さらに PHB2 と p53 と結合することを示した。Capsaicin 処理による p53 依存的な転写活性化を示したが、この活性化制御において PHB2 がどの程度関与しているかを明確に示すには至らなかったが、PHB2 と p53 の関与が p53 依存的な転写活性を促進する可能性を示した。

p53 依存的な転写産物にはアポトーシス誘導に関わる因子も多く、capsaicin によるアポトーシス誘導機構における p53 の関与を指示する結果を示した。

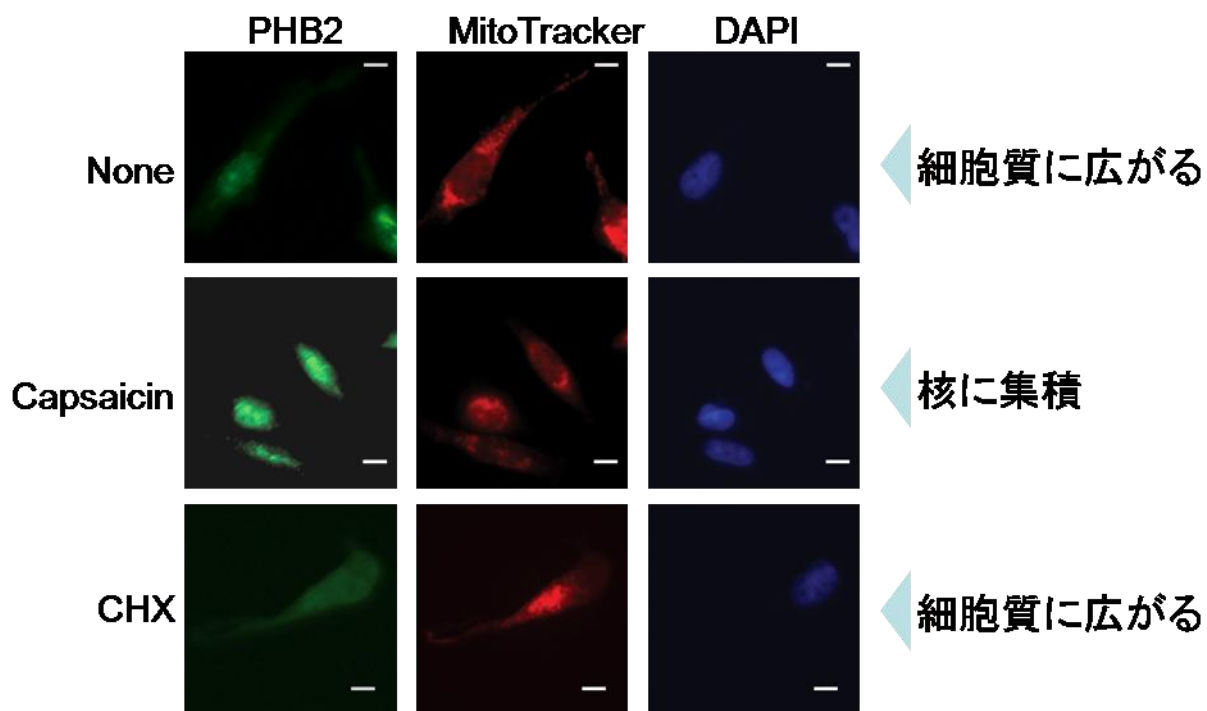


図 4-1 Capsaicin 処理による PHB2 の核移行

HeLa 細胞に 300 μ M capsaicin、または 50 μ g/ml CHX を 24 時間処理した後、抗 PHB2 特異抗体、MitoTracker Red、そして 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて三重染色を行った (Scale bars, 10 μ m)。

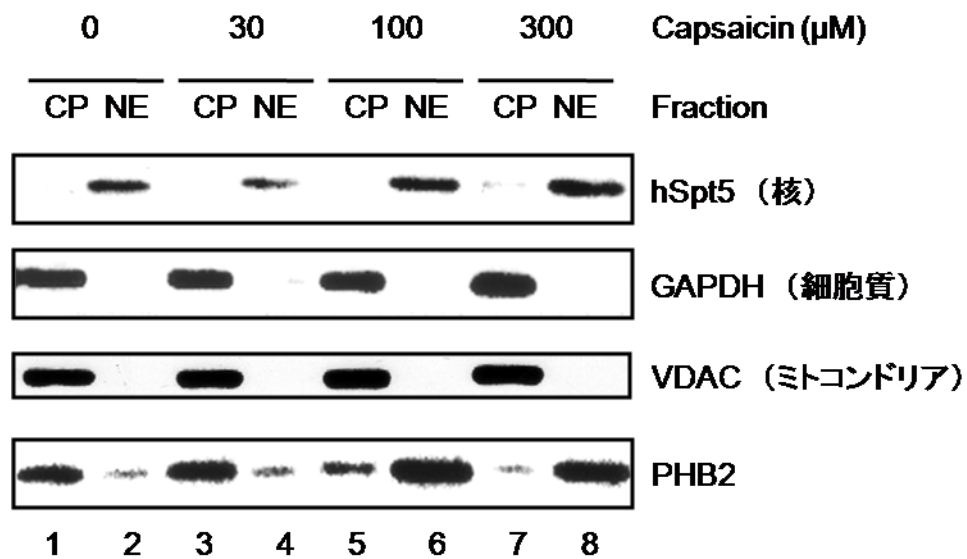


図 4-2 Capsaicin 処理による PHB2 核移行の定量的分析

NB4 細胞を 0-300 μM capsaicin を 24 時間処理した後、ミトコンドリア画分を含む細胞質画分 (CP, cytoplasmic) と核画分 (NE, nuclear) とに分画した。抗 hSpt5、GAPDH、VDAC、そして PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。

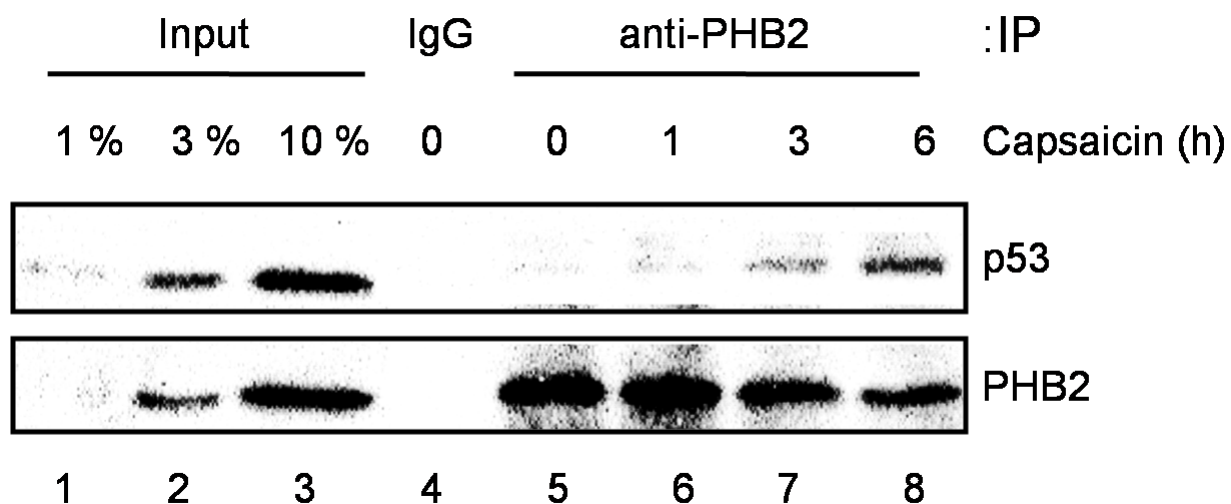


図 4-3 Capsaicin による PHB2-p53 相互作用の誘導

NB4 細胞に対して 300 μ M capsaicin を 0、1、3、6 時間処理した。その後、溶解した細胞にコントロールの抗体であるラビット IgG、または抗 PHB2 抗体を加え、免疫沈降を行った。共沈降したタンパク質を抗 p53 特異抗体および抗 PHB2 特異抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。

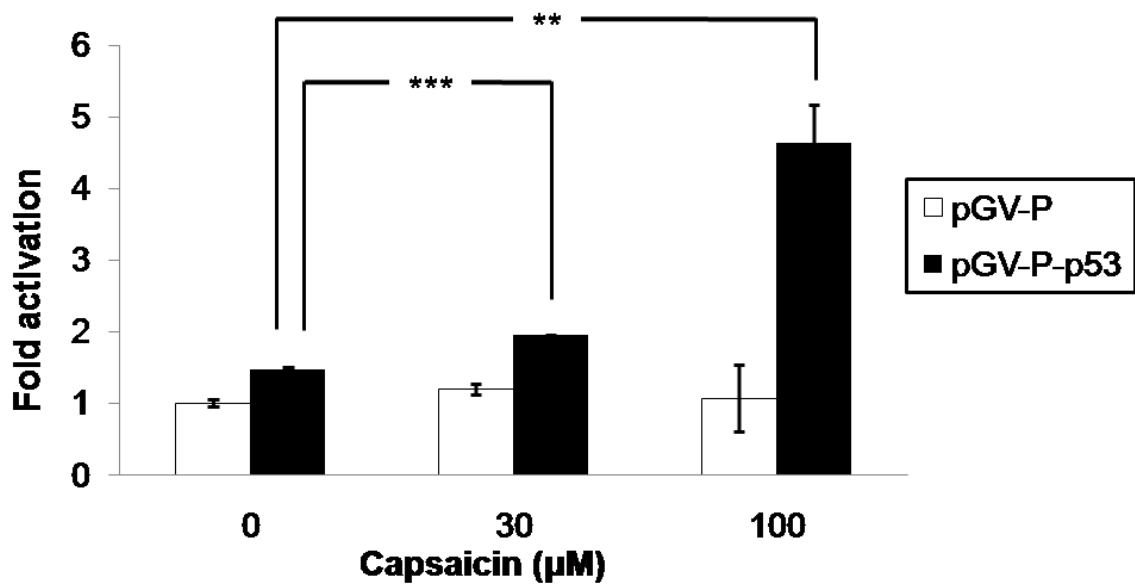


図 4-4 Capsaicin の p53 転写活性の促進

レポーターアッセイを行うために、0.2 μg の p53 (pGV-P-p53) またはコントロール (pGV-P) レポータープラスミド、および 0.02 μg の p53 発現プラスミドを 293T 細胞に共トランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間に 0、30、100 μM capsaicin を加え更に 24 時間培養した。その後回収しルシフェラーゼアッセイを行った (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。

5. 結論 —総括および今後の展望—

本研究の結果をまとめる。結果から得られた capsaicin によるアポトーシス誘導機構を示し、今後の展望を述べる。

5.1. 本研究のまとめ

1. Capsaicin 固定化 FG 粒子を作製した。Capsaicin 固定化 FG 粒子を用いて、capsaicin 結合タンパク質としてミトコンドリアタンパク質 PHB2 を精製・同定した。そして、PHB2 相同体 PHB1 は PHB2 を介して capsaicin 固定化 FG 粒子により共精製されることが明らかとなった。
2. Capsaicin は PHB2-ANT2 相互作用を直接阻害し、また ANT を介したミトコンドリアへの ADP 取り込み活性を非競合に阻害することが示された。更に capsaicin はミトコンドリア膜電位を消失させ、cytochrome c および PHB2 放出を直接誘導した。Capsaicin はミトコンドリアを直接傷害することを示した。
3. Capsaicin 処理により PHB2 細胞内局在に変化を生じ核への集積を明らかにした。Capsaicin 処理により核移行した PHB2 は p53 と結合し、p53 依存的な転写の活性化を促進する可能性を示した。
4. Capsaicin によるアポトーシス誘導機構として、1) ミトコンドリア傷害による cytochrome c 依存カスパーゼ誘導アポトーシス、2) PHB2 核移行および p53 との相互作用による p53 依存的な転写活性化によるアポトーシス、の 2 つの経路によるアポトーシス誘導モデル（図 5-1）を示した。

5.2. 考察

1. これまで capsaicin は、細胞内 ROS 上昇を誘導することが知られてきた。ROS 産生を担う対象としてミトコンドリアが考えられ、capsaicin の作用点としてミトコンドリアの存在が考えられていた。Capsaicin 固定化 FG 粒子による標的因子探索の結果ミトコンドリア内膜局在タンパク質 PHB2 が得られたことから、capsaicin の作用点としてミトコンドリアが有力であることの一つの証明となった。
2. PHB は複数の機能をもつタンパク質であり、未だ謎の多いタンパク質である。その機能として大きく 3 つ、1) ミトコンドリアタンパク質の足場機能、2) ミトコンドリア形態維持、3) 核内転写因子群の制御、が知られている。Capsaicin は PHB2 と ANT2 との結合を阻害し、また capsaicin は ANT 活性を非競合的に阻害した。これらの結果から、capsaicin による ANT 活性阻害は、PHB2 と ANT2 との結合阻害が原因で生じていると考えられる。足場を形成する PHB との結合が ANT 活性の安定化、ひいてはミトコンドリア機能の安定化に関与すると推測できる。また capsaicin はこのようなミトコンドリア機能の障害に加え、膜電位消失や cytochrome c や PHB2 放出といったミトコンドリアに物理的傷害を与えるような現象も見受けられる。PHB2 がミトコンドリア形態維持に関与することからも、PHB2 に capsaicin が作用することでミトコンドリア構造に傷害を与えていることとの関連が見受けられる。
3. PHB はミトコンドリア・ターゲット・シグナル (MTS) を持つと共に NLS を有

しており、ミトコンドリアと核をシャトルしていると考えられている。さらに多くの核内転写因子との結合が報告され、核へのシグナル伝達の任を負うと考えられる。今回は PHB2 と p53 の結合が示され、また capsaicin による p53 依存的な転写活性化が示された。この p53 活性化と capsaicin との間に PHB2 がどのように関わっているの明らかにはなっていない。PHB のノックダウンが解析方法の一つに挙げられるが、PHB の持つ複数の機能がこの手法による解析を困難にさせる。例えば、PHB と ANT との相互作用と ANT 活性との関わり、または p53 との相互作用と p53 転写活性促進との関わりにおいて、PHB ノックダウンを行った場合、PHB の持つミトコンドリア形態維持機能が阻害され、ミトコンドリア傷害、更に細胞死へとつながる。ノックダウンにより細胞そのものへ傷害を示すことからその後の解析を行うことは困難を示す。この問題を解決するためには PHB の持つ様々な機能を更に詳細な解析、そして置換変異等を用いた特定機能活性を失った変異体による解析が必要となる。

5.3. 今後の展望

～PHB2 を介したミトコンドリア安定性と p53 活性化機構の解明～

本研究により、capsaicin が PHB2 を介してミトコンドリア機能に影響していることが示された。だが、PHB2 と ANT2 とのタンパク間相互作用と ANT 活性との間にある分子メカニズムは明らかとなっていない。タンパク間相互作用がタンパク質機能に必須であるのか、何故足場機能を持つ PHB2 との結合が ANT 活性に必要なのか、未だ未解明のままである。さらに、膜電位の消失やミトコンドリア内タンパク質の放出は何故生じるのか、ANT 活性阻害の結果ミトコンドリア機能が障害されるのか。

もっとも不明な点として PHB2 と p53 との関わりが挙げられる。PHB2 による p53 の制御機構の解明はアポトーシス研究において新たな視点になる。これら未解明な分子メカニズムの全貌解明には、以下のような解析が必要である。

1. PHB2 と Capsaicin との結合部位を特定し、ANT2 をはじめとした相互作用因子との結合様式を解明する。これによりなぜ capsaicin により両タンパク質の結合が阻害されるのか、また構造的側面から ANT 活性への影響を調べる。
2. ミトコンドリアに対する capsaicin 処理が引き起こす cytochrome c 放出が、ANT 活性阻害が原因で生じる結果なのか、ミトコンドリア形態維持に関わる PHB 機能を阻害した結果生じたミトコンドリア傷害によるものなのか。ミトコンドリア機能と構造、それぞれの側面からの解析が求められる。
3. Capsaicin 処理による p53 転写活性促進が、PHB2 と p53 との相互作用の結果生じたものか、PHB 関与による p53 転写活性促進がどの程度かを調べる。そのために PHB2 の持つ MTS または NLS に変異を入れ、変異置換体を作製することで核移行のメカニズムの詳細な解析、また ChIP による遺伝子上での PHB2 および p53 との局在の解析が求められる。
4. Capsaicin による細胞内 ROS 上昇と PHB との関わりを調べる。PHB1 ノックダウンによる細胞内 ROS 上昇、逆に過剰発現による ROS 減少が報告されている²⁸⁾。このことから ROS 発生ないし減少に PHB が関与している可能性が示唆される。PHB をキーワードとして細胞内 ROS 上昇メカニズムの解析が求められる。

上記のような様々な PHB 機能の詳細かつ網羅的な解析により、capsaicin によるアポトーシス分子機構の全貌を解明する。PHB を介したアポトーシス制御機構がアポトーシス研究の新たな知見となり、capsaicin の持つアポトーシス誘導機構を利用した新規抗ガン剤開発につながることを期待される。

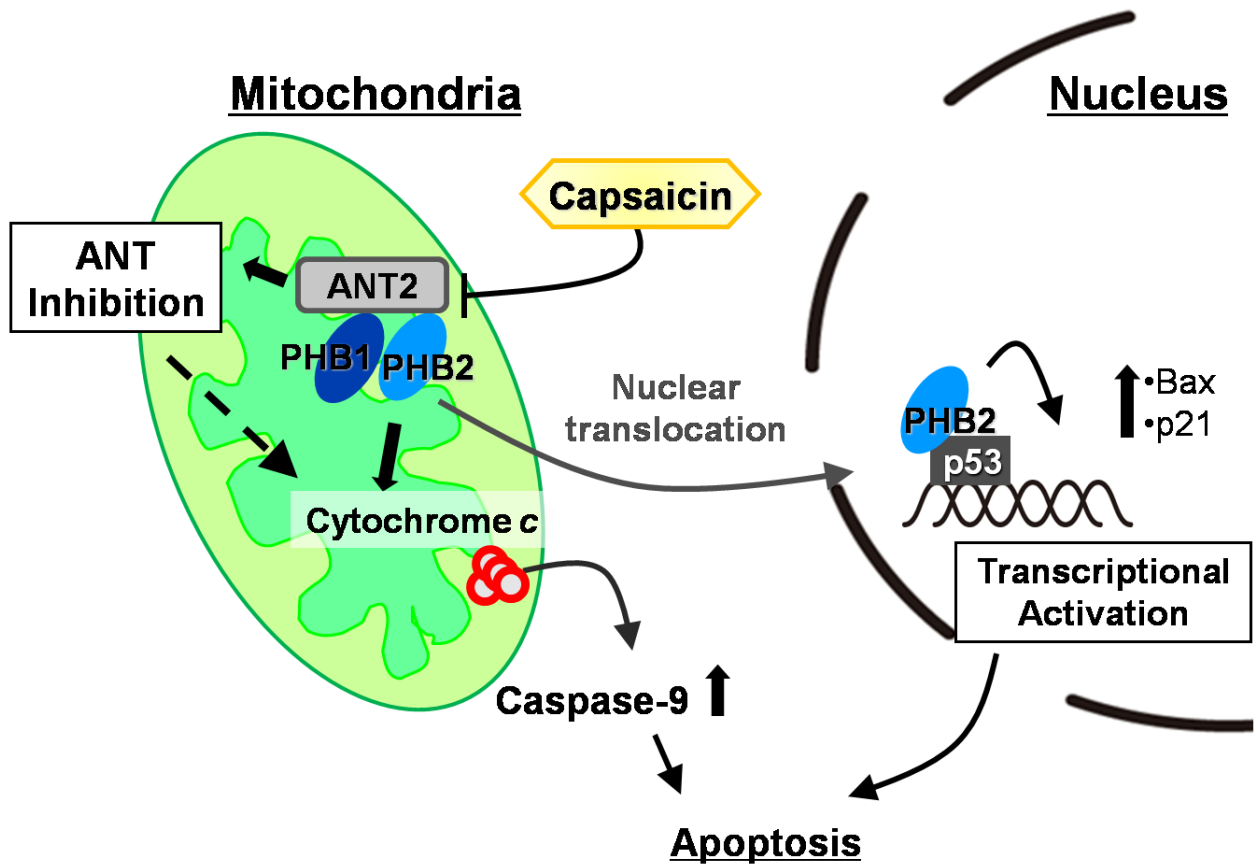


図 5-1 Capsaicin によるアポトーシス誘導機構モデル

参考文献

1. 厚生労働省平成 19 年人口動態統計月報年計（概数）の概要
(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai07/index.html>)
2. 平成 16 年度全国・鹿児島県悪性新生物死因別割合
(<http://www.pref.kagoshima.jp/filemst/6014/h16sibou-180-03-01a.xls>)
3. 財団法人国際医学情報センター：がん Info／小児急性骨髄性白血病
(<http://www.imic.or.jp/cancer/c2017.html>)
4. 富永真琴、"生体はいかに温度をセンスするか—TRP チャネル温度受容体—", *日
生誌*, Vol.65, No.4・5, 130(2003).
5. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin
sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1994; 43:143-201.
6. Kang SN, Chung SW, Kim TS. Capsaicin potentiates 1, 25-dihydroxyvitamin D3- and
ATRA-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Eur J
Pharmacol* 2001; 4230:83-90.
7. Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, Morikawa S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell
leukemia cells. *Leuk Res* 2003; 27:275-83.
8. Kim JD, Kim JM, Pyo JO, *et al.* Capsaicin can alter the expression of tumor
forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean
stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett* 1997; 120:235-4.
9. Jung MY, Kang HJ, Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma
cells involves Bcl-2 down regulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett* 2001;
165:139-45.
10. Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. In vitro and in vivo induction of
apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation
and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 2008; 13:1465-78.
11. Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, *et al.* Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the
growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006;
66:3222-9.

12. Ito K, Nakazato T, Yamamoto K, *et al.* Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res* 2004; 64:1071-8
13. 半田宏 編、"I ケミカルゲノミクスの基礎—1.アフィニティビーズ・テクノロジーの最前線—"、ケミカルバイオロジー・ケミカルゲノミクス、p.3-14、Springer Science & Business、(2005)
14. Kawaguchi, H. *et al.* Purification of DNA-binding transcription factors by their selective adsorption on the affinity latex particles. *Nucleic Acid Res* **17**, 6229-6240(1989).
15. Wada, T., Watanabe, H., Kawaguchi, H. & Handa, H. DNA affinity chromatography. *Methods Enzymol* **254**,595-604(1995).
16. Shimizu, N. *et al.* High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat Biotechnol* **18**, 877-881(2000).
17. Hiramoto, M. *et al.* High-performance affinity beads for identifying anti-NF-kappa B drug receptors. *Methods Enzymol* **353**, 81-88(2002).
18. Nishi, T. *et al.* Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem* **277**, 44548-44556(2002).
19. Kabe Y, Ohmori M, Shinouchi K, *et al.* Porphyrin accumulation in mitochondrial is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J Biol Chem* 2006; 281:31729-35.
20. Uga H, Kuramori C, Ohta A, *et al.* A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads. *Mol Pharmacol* 2006; 70:1832-39.
21. Azuma M, Kabe Y, Kuramori C, *et al.* Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. *PLoS ONE* 2008; 3:e3070.
22. Hase Y, Tatsuno M, Nishi T, Kataoka K, *et al.* Atrazine binds to F₁F₀-ATP synthase and

- inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366:66-72.
23. Nishio K, Masaike Y Ikeda M, *et al.* Development of novel magnetic nano-carriers for high-performance affinity purification. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 64:162-9.
24. 清水重臣、辻本賀英、"Bcl-2 ファミリー：静止を決定する分子"、わかる実験医学シリーズ アポトーシスがわかる、p.56-62、羊土社、(2001)
25. Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., & Roeder, R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 1475-1489
26. Fang JY, Fang CL, Hong CT, *et al.* Capsaicin and nonivamide as novel skin permeation enhancers for indomethacin. *Eur J Pharm Sci* 2001; 3:195-203.
27. Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* 2006; 10:353-63.
28. Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.013
29. Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J Biol Chem* 2006; 281:36401-10.
30. Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, *et al.* Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* 2008; 15:476-88.
31. Machida K, Hayashi Y, Osada H. A novel adenine nucleotide translocase inhibitor, MT-21, induces cytochrome c release by a mitochondrial permeability

- transition-independent mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277:31243-48.
32. Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyattractyloside. *Nature* 2003, 426: 39–44.
 33. Dedov VN, Mandadi S, Armati PJ, Verkhatsky A. Capsaicin-induced depolarisation of mitochondria in dorsal root ganglion neurons is enhanced by vanilloid receptors. *Neuroscience* 2001; 103:219-26.
 34. Wang S, Nath N, Fusaro G, Chellappan S. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7447-60.
 35. Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003; 278:47853-61.
 36. Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, Chellappan S. Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281:2951-9.
 37. Endoh M, Zhu W, Hasegawa J. *et al.* Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Mol Cell Biol* 2004; 24:3324-36.
 38. Ando K, Hirao S, Kabe Y. *et al.* A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 4327-36

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、半田宏教授に心から厚くお礼を申し上げます。

貴重な御指導、御助言を頂戴した東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、和田忠士准教授に深く感謝いたします。

本研究に関して、終始多大なる御指導、御助言を頂いた、東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、山口雄輝助手、ならびに慶應義塾大学医学医学科、加部泰明特別研究講師に心から深い感謝を申し上げます。

本研究において多大なる御助言を頂いた埼玉医科大学総合医療センター血液内科、木崎昌弘教授に深く感謝いたします。

本研究で用いたカプサイシンアミノ基誘導体を合成頂きました、東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、細谷孝充准教授、井上敦氏に深く感謝致します。

本研究で用いたバイオスクリーニングシステム「Target Angler 8」を提供頂きました多摩川精機株式会社、羽生尚広技監および関口健司氏に感謝致します。

本研究の共同実験者である東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻、東基記氏、平尾聡氏に心から感謝します。ならびに実りある研究生活をともにした半田・和田研究室の皆様へ感謝いたします。

大学院での研究生活以外にデュアルディグリー学生として見聞を広めることにお力添え頂きました本学イノベーションマネジメント研究科技術経営（MOT）専攻田辺孝二教授、ならびに多くの MOT を通して知り合った諸先輩・学生の皆様へ感謝します。

貴重な命を提供してくれた多くのネズミたちに感謝いたします。

最後に大学、大学院の9年間を精神的、経済的、様々な点で終始応援し、暖かく支援頂いた家族に心より感謝いたします。