

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度

課題番号：18510184

研究課題名 (和文) 癌治療を目指したアポトーシス関連タンパクの光機能化と応用

研究課題名 (英文) Photofunctionalization of apoptotic enzymes for targeting cancer therapy and its applications

研究代表者

遠藤 政幸 (ENDO MASAYUKI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：70335389

研究成果の概要：

アポトーシスの誘導による癌細胞の細胞死を誘導することでその除去を目的とし、その間連酵素である caspase-3 と DNA 断片化因子に光応答性分子を組み込み、光照射によって活性化することで人工的なアポトーシスの誘導を検討した。光分解性の 2-nitrophenylglycine 4, 5-dimethoxy-2-nitrophenylglycine (DMNpg) を DNA 断片化因子の阻害タンパク (ICAD) の切断位置に導入し、細胞外転写翻訳反応で光機能化 ICAD が高収率で発現され、精製した。精製した光機能化 DNA 断片化因子へ光照射を行うと ICAD の分解が起こり、光機能化 DNA 断片化因子複合体への光照射によって、DNase 活性の発現を行えることを見出した。さらに細胞内導入のために HIV 由来の TAT 配列の導入した光機能化 DNA 断片化因子を合成した。これによって細胞導入と光照射によるアポトーシスの誘導を検討できる系を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	1, 800, 000	540, 000	2, 340, 000
19 年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
20 年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
年度			
年度			
総計	3, 600, 000	1, 080, 000	4, 680, 000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：アポトーシス、カスパーゼ-3、DNA 断片化因子、光化学、非天然アミノ酸、胞外翻訳反応、癌治療、細胞導入

1. 研究開始当初の背景

アポトーシス (プログラムされた細胞死) の制御機構が近年、分子レベルで理解できるようになり、生体は癌細胞のような修復不能な細胞を除去するため、アポトーシスを誘導して行うことが明らかになってきた。癌治療を

行なう上で、多くの薬剤は DNA に損傷を与え、癌細胞を死滅させる。しかしながら、癌治療に用いる抗癌剤や制癌剤の多くは正常細胞と癌細胞の両方に作用し、副作用の面で困難が多い。これに対して、作用機構が明らかにされつつあるアポトーシスに関与した酵素

を機能化し利用することで、選択的な癌細胞の死滅を狙うことができると考えられる。これに加え、光学機器の精密化、特に短パルス高ピークパワーのレーザーの開発により、細胞透過性の良い長波長の光照射でも2光子反応を起こすことが可能になり、細胞内小器官程度の大きさのターゲットに対して空間的及び時間的に光反応の制御を行うことが現実のものとなってきた。これらの作用機構が明らかにされつつあるアポトーシスに關与した酵素を制御し、選択的な癌細胞の死滅を狙うことができる新規な癌治療法が必要とされる。

2. 研究の目的

本研究ではアポトーシスの情報伝達経路の最終段階で作用する caspase-3 及びヌクレアーゼの複合体である DNA fragmentation factor (DFF) に着目し、これらのアポトーシス関連タンパクをその反応機構に応じて光機能化し、癌細胞に導入することで、光反応によるアポトーシスの誘導を人為的かつ強制的に行い、癌治療への応用を目指す。アポトーシスの最終段階で染色体を分解するヌクレアーゼ CAD (caspase activated DNase; DFF40) の活性化を厳密に光化学反応で制御できれば、より直接的なアポトーシスの誘導が可能となる。CAD はヌクレアーゼである CAD とそれに結合し阻害するタンパク ICAD (inhibitor of caspase activated DNase; DFF45) からなる複合体で、caspase-3 が ICAD を分解し、活性化したヌクレアーゼ CAD が核内に移行し染色体の断片化を行い、アポトーシスが誘導される。この caspase-3 による位置選択的な ICAD のペプチド鎖切断を行うため、光切断性アミノ酸 2-nitrophenylglycine (Npg) を ICAD の 117, 224 番目に導入した光機能化 ICAD を合成し、光照射によって ICAD の位置選択的な切断とそれに伴うヌクレアーゼ CAD の活性化を検討する。

さらに光機能化した ICAD を含む DFF 複合体を細胞内に導入し、光照射によって DFF45 の分解と CAD の活性化を行う。活性化された DFF は多量体を形成し核内へ移行し、染色体の切断を行い、最終的にアポトーシスを誘導する。これによって、今までにないアポトーシス関連酵素の人工的な活性化によって癌細胞の除去の方法を検討する。

3. 研究の方法

DNA 断片化因子は Caspase activated DNAase (CAD) その阻害タンパク (ICAD) からなりアポトーシスシグナル伝達の上流にあるプロテ

アーゼ caspase-3 による ICAD の位置特異的な切断(117 と 224 残基)により CAD が活性化される。このため、この ICAD 特異的な切断位置に光分解性の 4,5-dimethoxy-2-nitrophenylglycine (DMNpg) をペプチド主鎖に導入し光化学反応により ICAD の切断と CAD の活性化を試みた。哺乳類細胞であるウサギの網状赤血球細胞抽出物を用いて、PCR で増幅した ICAD と CAD の cDNA から細胞外転写翻訳反応で共発現を行った。ICAD の 117 番目への位置特異的な DMNpg 基の導入を 4 塩基コドンと細胞外翻訳反応によって行った。DMNpg は有機化学的手法で合成し、核酸 2 量体である pdCpA と結合し、さらに 4 塩基アンチコドンをもつ tRNA(-CA) に RNA ligase によって結合し、目的とする DMNpg-tRNA を合成した。これを用いて、ICAD の 117 番目を 4 塩基コドン CGGG に変異させた cDNA を PCR で増幅し、上記の細胞外転写翻訳反応で発現を行った。これらの活性と光機能化した酵素の光照射による活性化を DNA の切断によって測定した。

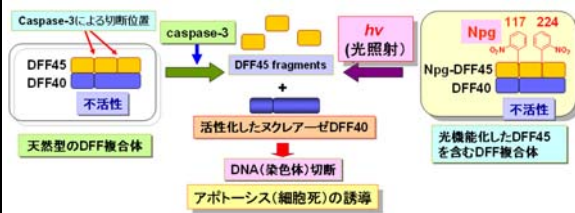


図 1. DFF 複合体の模式図と活性化の機構。(左側)天然型の DFF 複合体と caspase-3 による DFF45 (阻害タンパク) の切断と DFF40 (ヌクレアーゼ) の活性化。(右側) Npg の導入で光機能化した DFF45 と光照射による DFF45 の切断と DFF40 の活性化。

4. 研究成果

第一に、天然型のヒト由来 ICAD/CAD の細胞外翻訳反応による発現と酵素活性の保持については報告がないため、その活性化方法について検討した。細胞外翻訳反応を用いて、PCR で増幅した ICAD と CAD の cDNA から細胞外転写翻訳反応で共発現を行うと、目的の ICAD と CAD の発現が見られた。この ICAD と CAD を共発現した複合体を精製し、caspase-3 を添加し、ICAD の切断を行うと特異的な切断が見られ、λ DNA と反応させると DNA の分解が見られた。

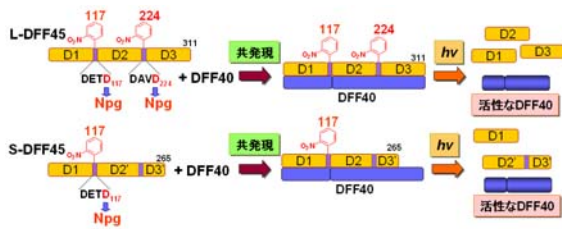


図 2. ICAD (DFF45) の光機能化。全長の L-DFF45 (ICAD-L) と C 端が短い S-DFF45 (ICAD-S) にそれぞれ Npg を導入し、DFF40 と共発現を行う。光機能化した Npg-ICAD を含む DFF 複合体に光照射を行い、DFF40 (CAD) 活性化の発現を行う。

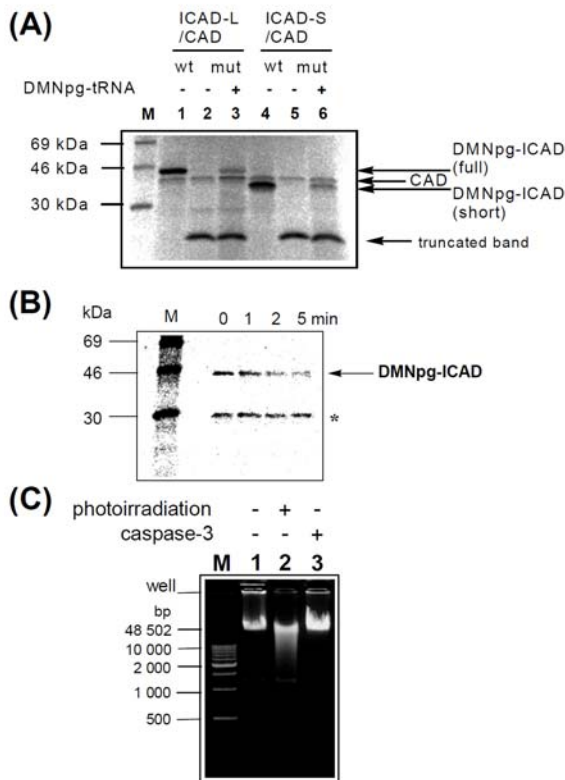


図 3. 光機能化 DFF 複合体の合成と反応性。(A) DMNpg-ICAD/CAD 複合体の共発現による細胞外翻訳反応 (SDS-PAGE)。DMNpg-tRNA 存在下でのみ全長の ICAD が合成される (lane 3, 6)。ICAD-L は全長、ICAD-S は C 端を短くしたもの。(B) 光機能化 ICAD の光反応性 (SDS-PAGE)。366 nm の水銀ランプの照射により、DMNpg-ICAD の分解が似られる。(C) 光機能化 DFF 複合体による光照射依存的な DNA 切断活性化 (agarose gel)。光機能化 DFF 複合体は光照射によってのみ DNA 切断活性を回復する。

よって、この実験系で天然型の ICAD/CAD 複合体が合成でき、活性を保持させることが可能であることが明らかとなった。

次に、ICAD の 117 番目への位置特異的な DMNpg 基の導入を拡張コドンと細胞外翻訳反応によって行った。ICAD/CAD の共発現系で DMNpg を導入し、DMNpg-ICAD/CAD 複合体の合成が 30-40% の収率で行なえる系を確立した。合成した DMNpg モノマーへ光照射 (366 nm, 0 °C) を行うと速やかに、DMNpg の分解が見られた。合成・精製した DMNpg-ICAD へ光照射 (366 nm) を行うと ICAD の分解が見られ、光反応性を有することが明らかとなった。

DMNpg-ICAD/CAD 複合体は、同様に細胞外翻訳反応で合成し、精製を行った。精製された DMNpg-ICAD/CAD 複合体は DNA の切断活性を有していなかったが、同条件での光照射によって、DNA 切断活性を発現できることが明らかとなった。また、DMNpg-ICAD/CAD 複合体は caspase-3 による活性化を受けず、内在性の caspase-3 による活性化を受けないことも明らかとなった。これによって、DMNpg-ICAD/CAD 複合体を使用し、光照射によってのみ DNA 分解を制御できる人工酵素の構築に成功した。

光機能化したアポトーシス関連酵素を細胞内に導入するための研究を行った。細胞内導入のために HIV (ヒト免疫不全ウイルス) の TAT 配列 (YGRKKRRQRRR) を caspase-3 へ導入することを試みた。N 末端または C 末端に TAT 配列を cDNA に組み込み、光機能化した caspase-3 の合成を行った。細胞に侵入可能にするための TAT ペプチドを結合した光機能化 caspase-3 を Npg-tRNA と拡張したコドンを用いて細胞外翻訳反応で合成した。

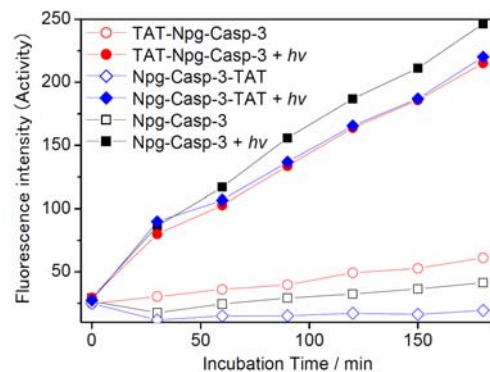


図 4. TAT を導入した光機能化 caspase-3 への光照射による活性化。照射前後の活性を時間依存的に測定。Rhodamine110-DEVD を基質に使用し切断反応物を蛍光強度で測定。

TAT を導入した光機能化 caspase-3 の光照射による活性化を試みた。Npg 導入による caspase-3 活性の抑制及び光照射による活性化は、光照射を行わない状態では不活性であるのに対し、光照射によって活性が時間依存的に上昇することが明らかとなった。また、TAT 配列を導入していないものと同様の活性を持ち、光によって酵素活性の誘導ができることを明らかにした。TAT を導入した光機能化 DNA 断片化因子の合成と光照射による活性化も同様の方法を用いて行い、活性の誘導が可能であった。以上のように、光機能化した DFF 複合体及び caspase-3 の細胞導入と光照射によるアポトーシスの誘導を検討が可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. M. Endo, T. Majima, "DNA Supramolecular Structures and Nanostructures for the Creation of Functional Nanomaterials", *Soft Nanomaterials*, (2009) in press.
2. M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Diastereochemically Controlled Porphyrin Dimer Formation on a DNA Duplex Scaffold", *J. Org. Chem.* **73**, 1106-1112 (2008).
3. M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Programmable conformational regulation of porphyrin dimers on geometric scaffold of duplex DNA", *Tetrahedron*, **64**, 1839-1846 (2008).
4. M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Porphyrin Light-Harvesting Arrays Constructed in the Recombinant Tobacco Mosaic Virus Scaffold", *Chem. Eur. J.* **13**, 8660-8666 (2007)
5. K. Nakayama, M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Monitoring of Three Distinct Structures of Restriction Enzyme Complexes Using Characteristic Fluorescence from Site-selectively Incorporated Solvatochromic Probe", *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 836-841 (2007).
6. M. Endo, T. Majima, "Photochemical control of enzymes using photoresponsive compounds on the basis of the interaction mechanism", *Photomed. Photobiol.* **29**, 14-15 (2007).
7. M. Endo, T. Majima, "Thermodynamic properties of branched DNA complexes with full-matched and mismatched DNA strands", *Chem. Commun.* 2329-2331 (2006).
8. M. Endo, H. Wang, M. Fujitsuka, T. Majima, "Pyrene-Stacked Nanostructures Constructed in the Recombinant Tobacco Mosaic Virus Rod Scaffold", *Chem. Eur. J.* **12**, 3735-3740 (2006).
9. K. Nakayama, M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Detection of the Local Structural Changes in the Dimer Interface of BamHI Initiated by DNA Binding and Dissociation Using a Solvatochromic Fluorophore", *J. Phys. Chem. B*, **110**, 21311-21318 (2006).

[学会発表] (計 12 件)

1. 遠藤政幸・藤塚守・真嶋哲郎, ポルフィリンを導入したタバコモザイクウイルス超分子の光機能性, 日本化学会第88回年会, 2008年3月29日, 立教大学・東京.
2. 遠藤政幸「生体超分子を使った機能性分子の自己集積化」京都大学大学院理学研究科 2007年12月22日 (招待講演)
3. 遠藤政幸「活性化機構を基にした酵素の光化学的制御」第29回光医学光生物学会 シンポジウム「光とバイオテクノロジー」富山国際会議場 2007年7月12日. (招待講演)
4. 遠藤政幸・藤塚守・真嶋哲郎「光機能化タバコモザイクウイルス超分子」第29回光医学光生物学会 富山国際会議場 2007年7月12日.
5. 遠藤政幸「光応答性生体超分子の創成」 「光と生命」立命館大学草津キャンパス 2007年5月18日. (招待講演)
6. M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "Pyrene-Assembled Nanostructures Constructed in the Tobacco Mosaic Virus Scaffold", 3rd Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul, Korea, Nov. 3-6, 2006. (招待講演)
7. M. Endo, M. Fujitsuka, T. Majima, "DNA Nano-Structures Controlled by Branched DNA Connectors", 3rd Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul, Korea, Nov. 3-6, 2006.
8. 遠藤政幸「精密な分子配列を指向した DNA ナノテクノロジー」シンポジウム「ゲノム化学の最先端—医学・分子生物学への応用と展開—」郡山 2006年10月15日—10月16日(招待講演).
9. 遠藤政幸・藤塚守・真嶋哲郎「ピレンを導入したタバコモザイクウイルス超分子の光化学的性質」光化学討論会 仙台 2006年9月10日—9月12日.
10. 遠藤政幸・N. C. Seeman・真嶋哲郎「分岐型 DNA による DNA チューブ構造形成の制御」第86回日本化学会春季年会 千葉 2006年3月27日—3月30日.
11. 中山公志・遠藤政幸・真嶋哲郎「アゾベンゼン誘導体を導入した制限酵素BamHI活性の光異性化による制御」第86回日本化学会春季年会,千葉,2006年3月27日—3月30日.
12. 遠藤政幸「生体分子高次構造の構築と機

能化」 「ナノバイオテクノロジーの最先端と新展開」兵庫、2006年2月24日—2月25日。（招待講演）

〔図書〕（計1件）

7. 遠藤政幸 “DNA ナノテクノロジー” 化学フロンティア「ゲノム化学」化学同人、18巻、169-177（2007）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 政幸 (ENDO MASAYUKI)

京都大学・物質—細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：70335389