

# 生薬由来化合物，エキスの生細胞中アクチン重合に対する影響の解析

申請代表者 石本 哲也 富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座 助教

## ■背景・目的

細胞骨格蛋白質アクチンは、ミオシンとの相互作用によって筋収縮に関わるだけでなく、細胞分裂、エンドサイトーシス、細胞移動、アポトーシス、癌浸潤、シナプス可塑性など多岐にわたる細胞活動において重要な働きをしている。つまりアクチンの重合脱重合を計測することで、細胞機能の変化を検出することが可能である。さらにアクチン重合に変化を与える分子を探索することで、細胞活動に影響を与える新たな分子の発見と創薬につながる知見となる。

cAMP response element binding protein(CREB)は記憶形成に関係が深いと考えられている転写因子である。神経細胞の興奮に伴い、CREBの133番目のセリンがリン酸化され、CREB binding protein (CBP)に結合することによって、CREB結合部位の下流の遺伝子発現が上昇することが知られている。つまりCREBのリン酸化を制御する化合物が同定できれば、将来的に記憶障害等の治療薬に発展することも考えられる。今回の計画ではこれらアクチン重合、CREBリン酸化に影響を与える化合物を探索することを目的とする。

今回の探索のために生物発光を応用した方法を用いることとした。ホタルの発光蛋白質であるルシフェラーゼは、基質であるルシフェリンを分解する際に発光を呈する。このルシフェラーゼをN末端とC末端を分割（スプリットルシフェラーゼ）した場合、もはや発光は示さない。しかしN末端、C末端にそれぞれ蛋白質A、蛋白質Bを融合させた場合、蛋白質AとBが相互作用したときルシフェラーゼのN末端とC末端が近傍に位置して再会合し、ルシフェラーゼとしての活性を取り戻し発光する（図1）。申請者はこのスプリットルシフェラーゼの原理を利用してアクチン重合とCREBリン酸化を計測する新規プローブを作製した。アクチンとスプリットルシフェラーゼの融合蛋白質がアクチンフィラメントに取り込まれた場合、近傍に位置した融合蛋白質同士がルシフェラーゼの活性を復活

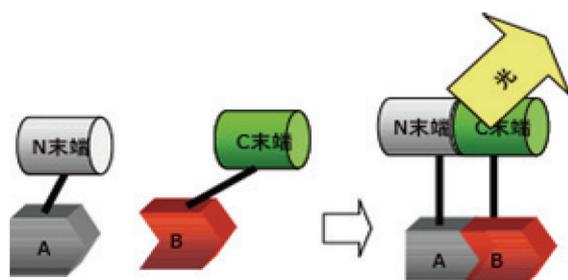


図1 スプリットルシフェラーゼの発光原理。融合蛋白質として発現させた蛋白質AとBが結合することで、ルシフェラーゼのN末端とC末端が会合し、発光する。

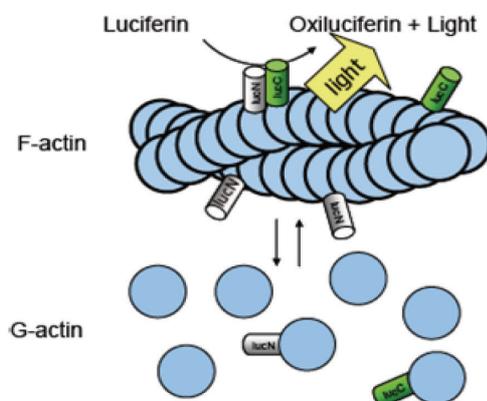


図2 アクチンとスプリットルシフェラーゼの融合蛋白質がアクチンフィラメントに取り込まれることで、隣り合ったスプリットルシフェラーゼが会合し発光する。発光量は重合量に比例する。

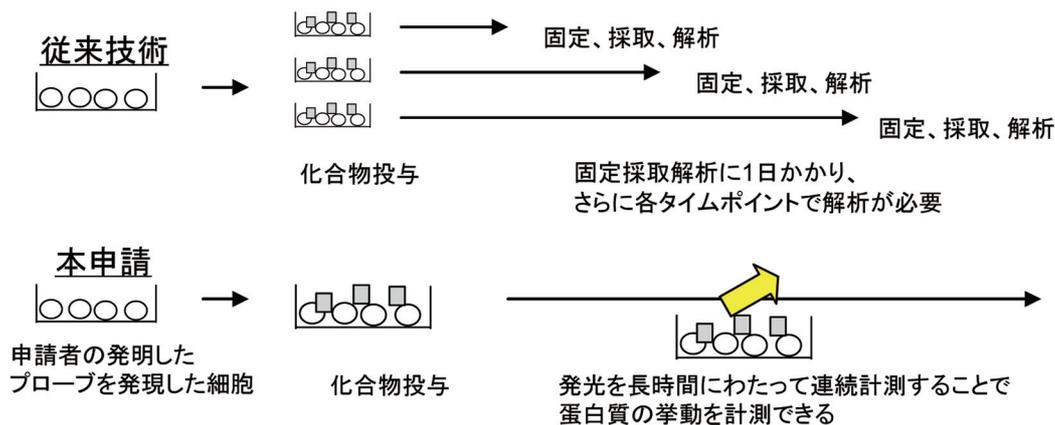


図3 本申請の技術では従来法に比べ、操作の煩雑さを大幅に削減し、多検体長時間の計測を可能にする。

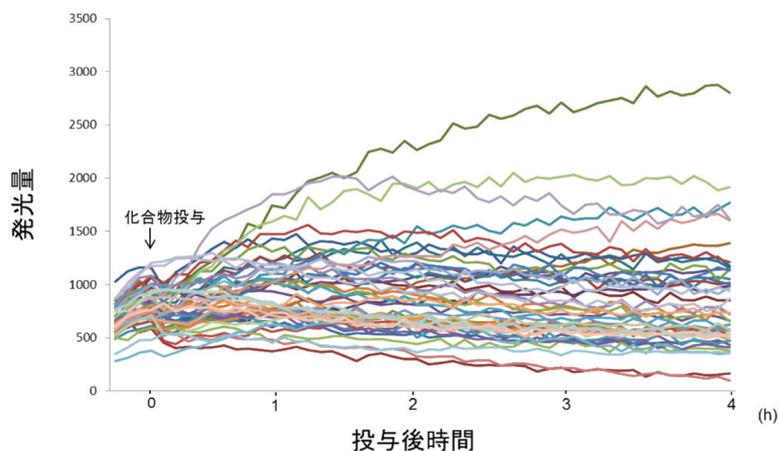


図4 アクチン重合を検地するプローブ蛋白質を発現した細胞株に、化合物ライブラリーを投与した場合の発光量変化。各トレースが一つの化合物に対応している。いくつかの化合物は発光量を増大させる。

させ発光する。この発光量はアクチンフィラメントの量に比例すると考えられる (図2)。CREB リン酸化プローブに関しては、CREB のリン酸化部位である KID ドメインと、その結合ドメインである KIX をそれぞれスプリットルシフェラーゼに融合させることで、KID と KIX のリン酸化に依存した結合を検出することができる。

今回の計画ではこれらプローブ蛋白質を発現した HEK293T 細胞からの発光を計測しつつ、和漢薬抽出液や化合物を投与し、発光の変化を計測することで、アクチン重合や CREB リン酸化に影響を与える化合物を同定することを試みた (図3)。

## ■結果・考察

96 well プレートを用いて HEK 293 T 細胞を培養し、翌日アクチン重合計測用プローブ、もしくは CREB リン酸化計測プローブをコードするプラスミドを遺伝子導入した。その2日後に細胞から発せられる発光量を計測した。その際各々の well に生薬由来化合物、抽出液を投与し、その後の発光強度の変化を観察した。図4では発光強度の推移の一例を示す。また図5は、図4のトレースを棒グラフにまとめたものである。このようなスクリーニングをすべての化合物、抽出液を用いて行った。

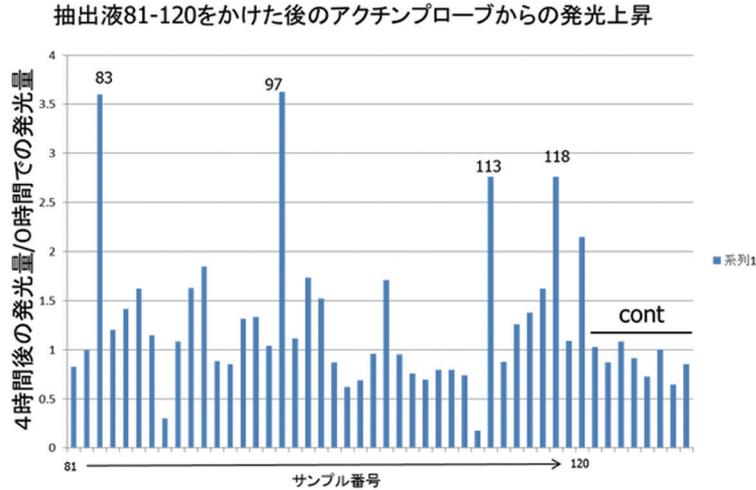


図5 アクチン重合検出プローブからの発光量変化を棒グラフでまとめたもの。数字で示した抽出液は発光量を増大させた。

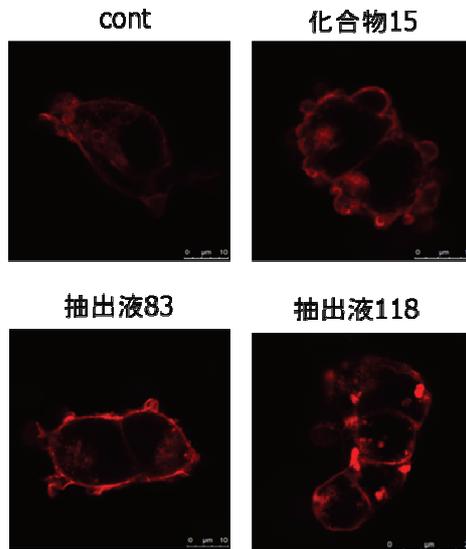


図6 アクチン重合検出プローブの発光を上昇させた化合物や抽出液を HEK293T に投与し、細胞中の重合アクチンのみをローダミンファロイジンで染色した。

アクチン重合を計測するプローブ蛋白質はいくつかの化合物に対して発光量を増大させた（化合物 11, 18, 23, 26, 80, 抽出液 1, 15, 28, 50, 55, 75, 83, 97, 113, 118）。これはそれらの化合物がアクチン重合を誘導することを示唆している。このことを確かめるために従来から知られているローダミンファロイジン染色法を用いて、化合物処理した培養細胞中の重合アクチンを特異的に染色して顕微鏡観察した。いくつかの化合物処理細胞では細胞表面にプレビングと呼ばれるこぶ状の形態が観察された（化合物 14, 抽出液 83）（図 6）。重合アクチンはこのプレビングが形成された場所に集まっていることが確認された。ローダミンファロイジンによる染色だけではアクチン重合が亢進したか判断しにくいものもあるので、今後超遠心法を用いて F/G アクチンを分離し、量比を定量的に計測する方法を用いて、スクリーニングの結果を確認する。

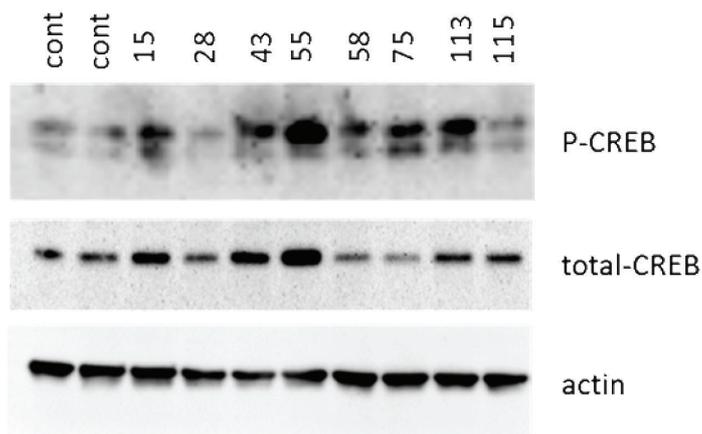


図7 CREBリン酸化検出プローブの発光を上昇させた抽出液をHEK293Tに4時間投与し、ウエスタンブロットにて解析した。

CREBリン酸化検出プローブを発現する細胞もいくつかの和漢薬抽出液に対して発光上昇を呈した(抽出液15, 28, 43, 55, 58, 75, 113, 115)。ただし和漢薬由来化合物に対しては、発光上昇を示さなかった。これらの抽出液で処理した細胞を採取し、リン酸化CREBに対する抗体でウエスタンブロットを行った。発光が上昇したサンプルのうち発現量が変わらず、リン酸化CREBの量が上昇したのが見つかった(抽出液58, 75, 113)。また、CREB自体の発現量を増加させた抽出液も見つかった(抽出液15, 43, 55)(図7)。

コントロール実験として、野生型のルシフェラーゼを発現した細胞からの発光が和漢薬由来化合物や抽出液によって影響を受けるか調査した。化合物や抽出液によって著しく発光が上昇するものは見られなかったが、発光が減少する場合は数件見られた。この原因として、化合物や抽出液が細胞内のATPの量を減少させている可能性が考えられる。

また、アクチン重合検出プローブ、CREBリン酸化検出プローブとも、発光は上昇するが、従来法で重合やリン酸化が確認できなかった偽陽性のシグナルも観察された。この偽陽性シグナルの出現理由に関しては現時点で明らかではないが、偽陽性シグナルを減らすことによってスクリーニングの信頼性を高めることが今後期待される。

## ■結論

アクチン重合検出プローブ、CREBリン酸化検出プローブを用いて、生細胞中のアクチン重合、CREBリン酸化に影響を与える和漢薬由来化合物、抽出液を数種類同定した。スプリットルシフェラーゼを用いて化合物スクリーニングを簡便に行えることを示した。