

## 研究課題別 中間評価結果

1. 研究課題名: ナノ・マイクロ超分子複合体によるメカノトランスダクション機構の解明
2. 研究総括: 曾我部 正博(名古屋大学 大学院医学系研究科 教授)
3. 研究概要

本研究では、細胞力覚(細胞の機械感覚)が細胞の機械感受性チャネル(MS チャネル)と細胞骨格からなるナノ・マイクロスケールの超分子複合体によって実現されるという点をキーコンセプトに据え、細胞力覚を担うメカノセンサー複合体の同定とその作動メカニズムの解明を試みてきた。また、細胞力覚研究の将来を見据え、細胞力覚と高次生理機能(例えば乳汁分泌)、あるいは循環器病(例えば心房細動)との関連を探る研究を並行して進めてきた。これまでの研究成果は以下のとおりである。

既に高次構造が判明し、膜張力で活性化することが知られている細菌 MS チャネルについて、その突然変異体とパッチクランプ法を組み合わせることにより、細菌 MS チャネルの機械刺激感知部位(アミノ酸)を同定した。この結果に基づき、脂質膜と MS チャネルから成るナノ・マイクロ複合体の分子動力的シミュレーション解析を進め、「感知部位の張力による構造変化が、どのようにしてチャネルの開口を導くのか」という活性化メカニズムを明らかにした。

また、レーザーピンセットによるナノ操作と超高速イメージング法から、高等生物血管内皮細胞の MS チャネルは、細胞骨格/接着斑とナノ・マイクロ複合体を形成すること及び細胞骨格の張力が主要な活性化の要因であることを示した。さらに、このような複合体を形成することではじめて力の大きさと方向の感知、即ちカベクトルの感知が可能となることを明らかにした。この研究プロセスにおいて、「細胞骨格(具体的にはアクチン線維)そのものが機械センサーとして機能する」ことを見出した。この結果は、全く新しいメカノセンサーを発見したことを示唆するものである。

細胞力覚と高次生理機能の関係を探る研究の進捗は次の通りである。機械刺激の細胞間伝達を担う ATP 放出メカニズムを明らかにするためには、既存の標本及び ATP 測定法では不十分であった。そこで、新たに乳腺細胞と筋上皮細胞の共培養系を確立し高感度 CCD カメラと超高感度イメージインテンシファイアー(画像増感器)からなる「高精度リアルタイム ATP イメージング法」を開発した。その結果、新たに確立した培養系において、乳腺へ機械的刺激を与えると、乳腺からの ATP 放出が見られ、血中からのオキシトシンと協同して筋上皮を収縮させ乳腺が絞り込まれるという *in situ* とほぼ同様のプロセスを再現することが出来た。このプロセスを詳細に検討し、ATP が存在するとオキシトシンの筋上皮の収縮効果が 10 倍程度増強され、僅かな機械的刺激によって筋上皮が収縮することを示した。また、高精度リアルタイム ATP イメージング法により、単一細胞からの ATP 放出及び拡散プロセスを 300 ミリ秒の時間分解能で記録することを可能にした。

細胞力覚と循環器病との関係を明らかにする課題については、MS チャンネルの解析に不可欠な特異的チャンネルブロッカーの開発及び心房細動を誘発出来る灌流心モデルの開発に重点を置いてきた。蜘蛛毒由来の特異的チャンネルブロッカーである GsMTx-4 の部分構造を模擬したペプチドを合成し、そのスクリーニングを行い、少なくとも数種類の合成ペプチドについては GsMTx-4 のような MS チャンネルの抑制効果が確認された。

また、GsMTx-4 と比較しながら、これらの合成ペプチドの作用メカニズムの解析を行った結果、MS チャンネルのポアをブロックするのではなく、ゲーティング機構を修飾していることが明らかとなった。本課題において合成したペプチドの 1 つについて灌流心モデル等を用いて心房細動抑制効果を調べたが効果は見られず、現在は他のペプチドについても順次、心房細動抑制効果を確認する予定である。同時に、発想を転換し既存の薬物から心房細動の抑制効果を有すると考えられるものについて、灌流心モデルを使ってその効果を確認し、当該薬物が MS チャンネルを抑制するか否かをパッチクランプで調べるというアプローチを開始したところである。

#### 4. 中間評価結果

##### 4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

主要課題について、独自の手法を用いて計画的に実験・解析がなされ、メカノトランスダクションのメカニズムの解明は着実に進んでいる。評価時点における主要課題の到達点は以下の 4 点にまとめられる。

- ・圧力差を条件とした分子動力学シミュレーションによる MS チャンネル開閉モデルを検証した。
- ・TRPV2 チャンネルの MS チャンネルとしての役割を解明した。
- ・アクチン線維がメカノセンサーとして機能するという新しい発見があった。
- ・ATP イメージング法によるメカノセンシングにおける ATP 放出の確認を達成しつつある。

これまでの成果は、メカノトランスダクションに関する多くの新事実を明らかにしており、科学的にインパクトが高く、メカノバイオロジーという新しい研究領域に理論的基盤を与えるものである。また、細胞・分子の操作技術やイメージング技術は、最先端、かつ独創的であり、この面においても世界をリードしている。

以上の通り、主要 4 課題の研究は順調に進捗している。チャンネルブロッカーの開発と応用研究では当初期待された結果が得られなかったが、既存の薬剤の中にブロッカーとしての可能性を見いだしており、新展開が図られつつある。

今後は、従来の高い実績に基づき、メカノセンサーのオルガネラ、個体での表現型における分子機構の解明等基礎研究に大きな進展が見込まれる。また、医薬品として使用されている薬剤にブロッカー活性を見出しており、新たな薬剤開発のための基礎研究という視点も含めた研究の発展も期待出来る。

#### 4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

メカトランスダクションという新たなコンセプトについて重要な知見を集積しつつある点を含めて、本研究の重要課題への取り組みは順調に進捗している。一方で分子・構造レベルの詰めが分子動力学に基づくシミュレーション中心であるので、今後は実験的検証の提示が望まれるところである。

また、MS チャンネルブロッカーの開発では、蜘蛛毒由来の応用ペプチドに阻害活性が無く開発は行き止まりとなった感があったが、既に医薬品として広く使われているスタチンが MS チャンネルブロッカーとして機能する可能性を見出している。この結果は、意図したものとは異なるが、新しい治療薬開発という予想外の発展的展開をもたらす可能性があり、今後の展開が注目される。

その他にも、乳腺の ATP 放出のイメージング化、MS チャンネルの分子動力学による解析、乳腺細胞のメカノセンシング機構、MS チャンネルを基本とした心房細動治療薬の開発、等に期待出来る。

#### 4-3. 総合的評価

細胞のメカノセンサー(MS)の分子実態の解明と MS チャンネルブロッカーの開発を目指し、分子機構モデルとしての細菌 MS チャンネルの構造活性相関解析から高等動物のオルガネラレベルまでを研究対象として解析を行った。細菌 MS チャンネルの突然変異がもたらす分子構造の変化とチャンネル活性を測定することによってメカノセンサー部位を同定し、分子レベルでの構造と活性の関連を明らかにするとともに、高等生物でのホモログを同定して細胞骨格とメカノセンサーとの関連を明らかにしたことは高く評価される。今後これらの知見の幅を広げる研究が望まれる。

一方残念なことに、MS チャンネルブロッカーの開発に向けて造った特異性の高いペプチドはブロッキング作用が無く、開発は容易ではなくなった。しかし、ある種の既存医薬品が MS チャンネルをブロックするという発見は、医療応用へ直結する可能性が高いため大きな期待が持たれる。これまでに得られた成果は、予算規模に見合ったものとなっていると判断出来る。

本研究では、メカノセンシングという非常に困難な課題について、独自の技術を駆使してその解明に取り組み、非常にインパクトの大きい成果を上げている。この領域での高いポテンシャルを有し、合理的な計画に基づき研究が進められており、先進的・先導的な結果が得られる事を大いに期待したい。