

《若手研究者紹介》



アルブミン研究を通して感じたこと

異 島 優* Yu Ishima

熊本大学薬学部薬剤学研究室

1. はじめに

2001年当時、私は小田切優樹教授主宰の熊本大学薬剤学研究室（現丸山徹教授）に入った。当研究室では、永きにわたり血清タンパク質であるアルブミンや α_1 -酸性糖タンパク質の研究に取り組んでいたが、そんなことは全く把握せずに、大学のサークルで準硬式野球部に所属していたという「ご縁」で、迷うことなくこの研究室に決めた。今思い返せば、研究内容が好きだったのではなく、準硬式野球部の先輩が多かったことや「体力さえあれば何とかなる」という体育会系の雰囲気が好きだったのだろう。今でもその感覚が抜けていないのか、飲み会での相手のグラスの量が半分を切ったらお酒を注ぐ癖や、注がれる時に自分のグラスを空にする癖が直らないままである。

2. 研究生活のはじまり

物心ついた時から色々と実験（幼少の頃は「いたずら」と言うべきかもしれない）が好きであった私には、研究室という一日中実験できる環境は、まさに天国のような世界である…はずであった。研究室に入って早々にラボの大掃除があったのだが、その

当時、新入りの学生は、試験管やビーカー等々の器具洗浄が朝から日が暮れるまで続いた（今の時代はこれもパワハラに当たるのだろうか）。ビーカーやメスシリンダーなど、それぞれの器具に応じて洗いが異なる。そのことを事細かに先輩から教えられ、濯ぐ回数のアマリの多さに疲れを通り過ぎていたのだろう、頭がおかしくなり、顔がニヤけ、手がフヤけた。それが数日間続いた。その後、先輩の実験補助生活が始まった。研究室配属後に最初に指導して頂いた先輩は、極めて個性的な「The 体育会系」と呼ぶべき M 先輩（本人に未許可であるため匿名にさせて頂く）であった（余談ではあるが、後にこの M 先輩は、普通の Ph.D. を取得した人なら考えもしない進路である「役者」への道に進まれ、今ではあの堀北真希さんとも映画共演するほどの素晴らしい役者になられている）。この M 先輩は、ものすごい実験量をこなされるため、いつも終わるのは深夜であった。だからと言って、次の日遅刻することは許さなかった。この M 先輩は、実験がない日でも実験室に立ち寄る。何かやり残した作業や出しっ放しにしている器具がないか？ 器具を乾燥機に入れっぱなしで元の棚に戻してないものがないか？ …等々、とにかく何事にも注意深く、他の実験者への配慮が行き届いていた。だからこそ、私が忙しさにかまけて洗いを洗わずに、洗い場に置きっぱなしにしていた時などは、よく「お説教」を頂いたものだった（未熟者の私は、あまりの M 先輩の厳しさに露骨に反抗する時期もあったと思う）。ただ、この M 先輩は、お金がない時でもお昼ご飯に連れて行って、私に「ビックマックバーガーの L セット（コーラ付）」を買い、自分は「普通のハンバーガー 2 つ

*2007年3月熊本大学大学院薬学教育部博士後期課程修了、博士（薬学）。同年、同大学薬学部の医薬高分子学の特任助教。2010年、米国ピッツバーグ大学医学部・博士研究員を経て、2011年、熊本大学薬学部・医療薬剤学・助教、2013年より、次世代創薬研究者養成塾塾長を兼任。受賞歴は、日本 NO 学会 Young Investigator Award 最優秀賞(2009)、日本 DDS 学会奨励賞(2014)。研究キーワード：ドラッグデリバリーシステム、アルブミン、一酸化窒素。連絡先：〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1 E-mail: y-ishima@kumamoto-u.ac.jp

と水」を頼むようなお方だった（今思えば、よく後輩の分際で、私はビックマックを頼めたものだと思うが）。このM先輩との研究生生活が私の研究人生の幕開けであった。ここで、この時に取り組んだHSA研究の紹介をさせて頂きたい。ヒト血清アルブミン（HSA）は、血清中に最も多く含まれる糖鎖を持たない単純タンパク質である。生体内において血漿膠質浸透圧の調節、脂肪酸、ビリルビン、尿毒症物質を始めとする内因性リガンド及び薬物などの外因性リガンドの輸送担体、酸化還元緩衝能、抗酸化作用及び酵素的作用（エステラーゼ様作用）など数多くの機能を有しているマルチな機能を持つタンパク質であることが知られているが、中でも、HSAの半減期が約20日と非常に血中滞留性に優れている点は、HSAをドラッグデリバリー担体として使用する利点として挙げられ、血中半減期の短い分子の滞留性の向上にたびたび使用されている。このため、遺伝子融合技術を用いて半減期の短いタンパク質とHSAとの融合タンパク質作製のための技術習得から始めることとなった。そこで、当研究室にて代々引き継がれている *pichia* 酵母を用いたタンパク質発現系の技術をM先輩に手取り足取り教えて頂いた。さらに、今後 *in vitro* から *in vivo* の実験系になることに伴い、必要なタンパク量が増加することが予想されたため、高収量発現系の構築を目的として、様々な培養条件検討を同時に行った。その際私は、夜中一人で震盪培養機のフラスコの様子を眺めては、酵母の気持ちになって考えてみたりしていた。『培地があまり攪拌されていないのでは？』とか、『培地の上にある泡が酸素の供給を邪魔しているのでは？』と。こうした私の素人的考察に対しても、M先輩は検討してみようと言って下さり、培養機の回転数を変えたり、消泡剤を添加したり、さらには金魚用のエアポンプを自費で買ってきては、お手製の空気注入器を火傷しながらもガラス細工で作成したりと、M先輩には私の知的好奇心を最大限育てて頂いたと心から感謝している。ちなみにその結果が、私の学士卒業論文における思い出深い最初のFigureになった（図1）。

3. 一酸化窒素との出会い

修士課程の時に、小田切教授から突然「医学部に連れて行くから」と言われ、教授と向かった先は、

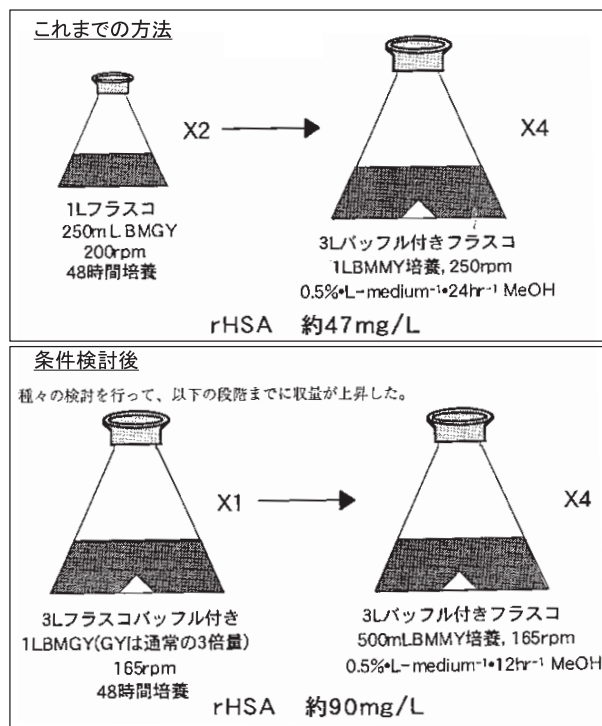


図1 卒業論文での最初の Figure

熊本大学医学部の微生物学分野であった。その当時、前田浩教授（現崇城大学 DDS 研究所特任教授）と赤池孝章准教授（現東北大学医学部教授）の体制の下、微生物関連から炎症・癌の領域に至るまで多岐にわたり素晴らしい業績をあげられていた。そして私は、次の日からこの微生物学分野にお世話になることとなった。どういう経緯で医学部微生物学分野への派遣が私になったかは未だに不明だが、この経験がなければ、今の私はいなかったであろう。

この微生物学分野でまず取り組んだのは、S-二トロソ（SNO）化タンパク質の抗菌活性実験であった（このS-二トロソ化とは、一酸化窒素（NO）がシステイン残基のSH基に付加反応したSNO基のことである）。ここで少し、最初に取り組んだNO研究の紹介をさせて頂くことにする。

タンパク質のSNO化体は、生体内におけるNOのリザーバーとして働くことが知られており、適材適所にNOを輸送する。中でも細菌に対しては、驚異的なNOデリバリー効率を見せることから、まずこの実験系から取り組んだ。すでに高い抗菌活性が確認されていたSNO- α_1 -アンチトリプシンをポジティブコントロールとして、当薬剤学研究室ではなじみの深いタンパク質であるヒト血清アルブミン（HSA）の ^{34}Cys のSNO化体であるMono-SNO-

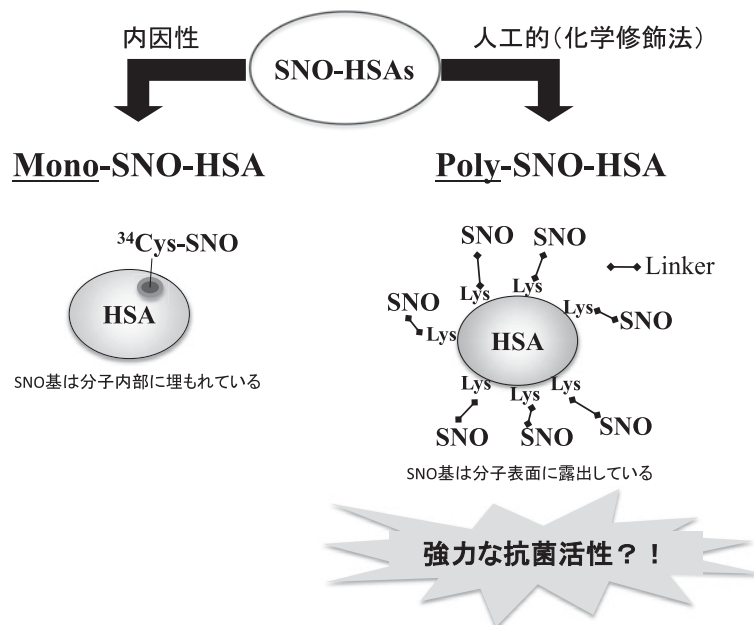


図2 内因的にも存在する Mono-SNO-HSA と多分子の NO を化学的に付加した Poly-SNO-HSA

HSAの作製に着手した。その抗菌活性実験を始めたところ、SNO- α_1 -アンチトリプシンには劣るものの、Mono-SNO-HSAにも抗菌活性が存在することが分かった。その後、この研究をどう展開するか悩んだ。すでにSNO- α_1 -アンチトリプシンというMono-SNO-HSAより優れた抗菌タンパク質があるのにMono-SNO-HSAの抗菌活性を追求する意義はあるのかという思いが募る一方、HSAからSNO- α_1 -アンチトリプシンに研究対象を乗り換えたときの罪悪感？(HSA研究に精を出している研究室にとってあるまじき行為と当時私は考え込んでいた)は、計り知れないことも感じていた。そこで、何とかしてSNO- α_1 -アンチトリプシンの抗菌活性を越えるスーパーSNO-HSAを作製してみようという発想に辿り着いた、『もしかすると1分子のHSAに多分子のSNO基を導入できれば、効率的なNOの輸送を可能にし、強力な抗菌活性を示すかもしれない。』と(図2)。早速、私はHSAのLys残基のアミノ基にSH基を導入する2-イミノチオランを用いてSH付加を行い、さらにSNO基へ変換した。その結果、この化学修飾法を用いて作製したPoly-SNO-HSAのSNO導入効率、6.7 mol/mol HSAであり、従来のMono-SNO-HSA (0.3 mol/mol HSA)の20倍以上の付加効率に成功した。このPoly-SNO-HSAは物理学的安定性も高く、ワクワクしながら抗菌活性を

測定した。しかし予想に反し、何度やってもPoly-SNO-HSAの抗菌活性は、全く出ない。同じタンパク濃度にして試してみても、同じNO濃度にして試してみてもPoly-SNO-HSAには全く抗菌活性がないのである。ちょうど時を同じくして、このPoly-SNO-HSAの抗腫瘍活性を検討するテーマが走っていたのだが、その結果は、なんと従来のMono-SNO-HSAとは比較にならないほど高い抗腫瘍活性が認められたのである。私はPoly-SNO-HSAの抗菌活性がないという結果を踏まえ、色々と仮説を考察した。『Poly-SNO-HSAのSNO基は、従来のSNO-HSAとは異なり、表面に露出しているため、反応性が高い。しかし、それが仇となって、細菌が出す何かによって、積極的に分解されているのではないか?』『Poly-SNO-HSAのSNO基の導入のために化学修飾法を用いているが、その反応においてLys残基のアミノ基が潰されている。そのために細菌との相互作用が低下し、逆に菌体内へのNO導入が阻害されたのではないか?』と。実際、これら仮説を裏付けるためにたくさんの予備試験をした。その結果、Poly-SNO-HSAは、細菌共存下で分解を受けること、ならびにMono-SNO-HSAの抗菌活性発現には、自身のLys残基の陽電荷が菌体膜との相互作用に極めて重要であることが示唆された(図3)。この抗菌活性におけるMono-SNO-HSAとPoly-SNO-HSAの違

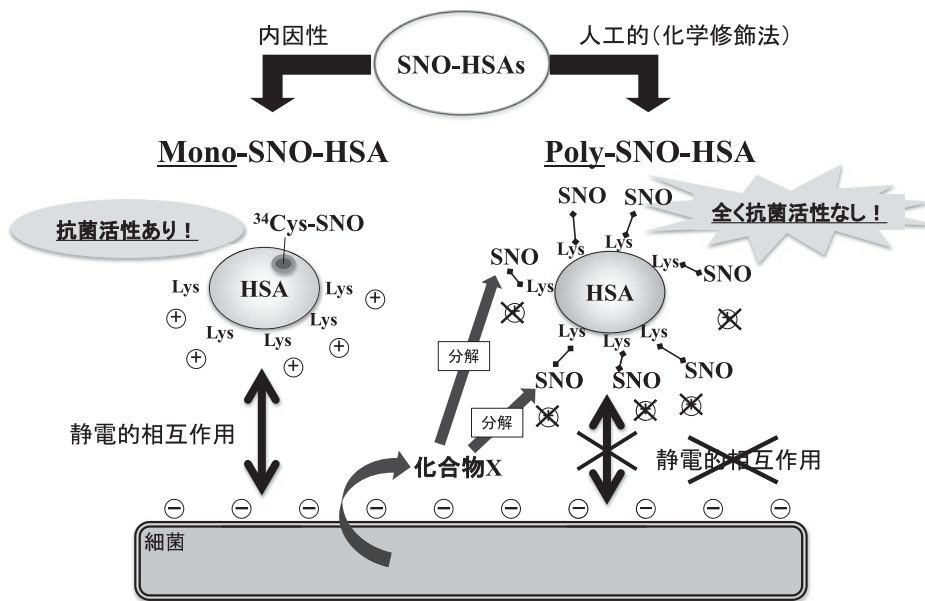


図3 Poly-SNO-HSA の抗菌活性欠如の推定メカニズム

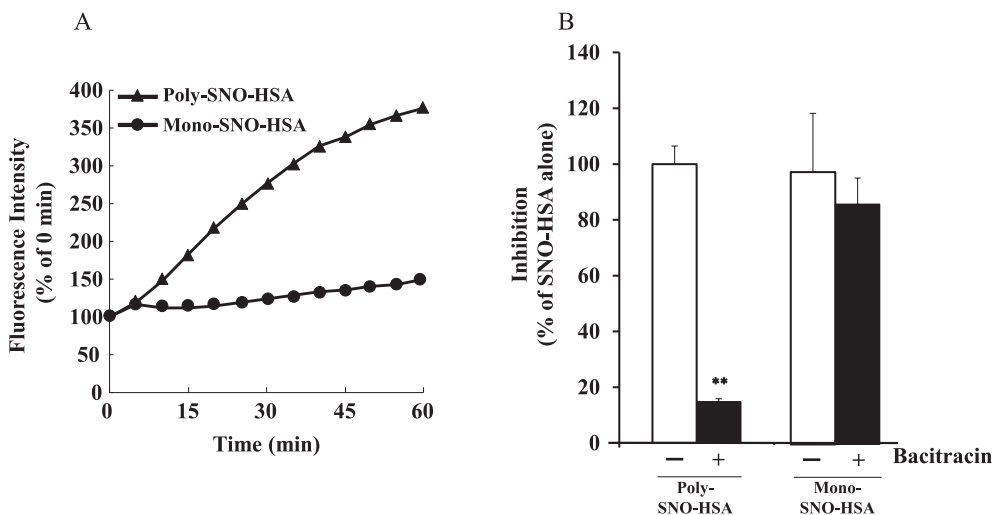


図4 Mono-SNO-HSA と Poly-SNO-HSA の細胞内 NO 取り込み

(A) 50 mM SNO-HSAs (SNO 量にて換算) をマウス大腸がん細胞株 C26 細胞に暴露した際の経時的細胞内 NO 量変化。(B) PDI 阻害剤である Bacitracin 存在下での細胞内 NO 量。

いを見出した知見は、これからの研究の方向性において非常に重要なターニングポイントになっていく。

4. Mono-SNO-HSA と Poly-SNO-HSA

当初は、Mono-SNO-HSA より高効率に SNO 基を導入し、比活性を向上させる目的で Poly-SNO-HSA を作製したにもかかわらず、Poly-SNO-HSA の抗菌活性はなくなり新たに抗腫瘍活性を獲得するという結果に、その当時はなかなか明確な答えを見出せずにいた。そのような中、Mono-SNO-HSA の新たな生物活性の実験を進める過程で、Mono-SNO-

HSA は、ヒト肝細胞に対し、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) といった生体防御タンパク質を誘導すること、それにより肝虚血再灌流障害などを軽減することが明らかになっていった¹⁾。このことは、Mono-SNO-HSA が、内因的な細胞保護剤として機能している可能性を示唆するものであった。『では、なぜ Poly-SNO-HSA は Mono-SNO-HSA と異なり、癌細胞に対してアポトーシスを引き起こせるのか?』この疑問が日に日に大きくなっていった。

そんな中、ヒト肝癌由来細胞などでは、Poly-SNO-HSA の NO は非常に速いスピードで細胞内へ取り込

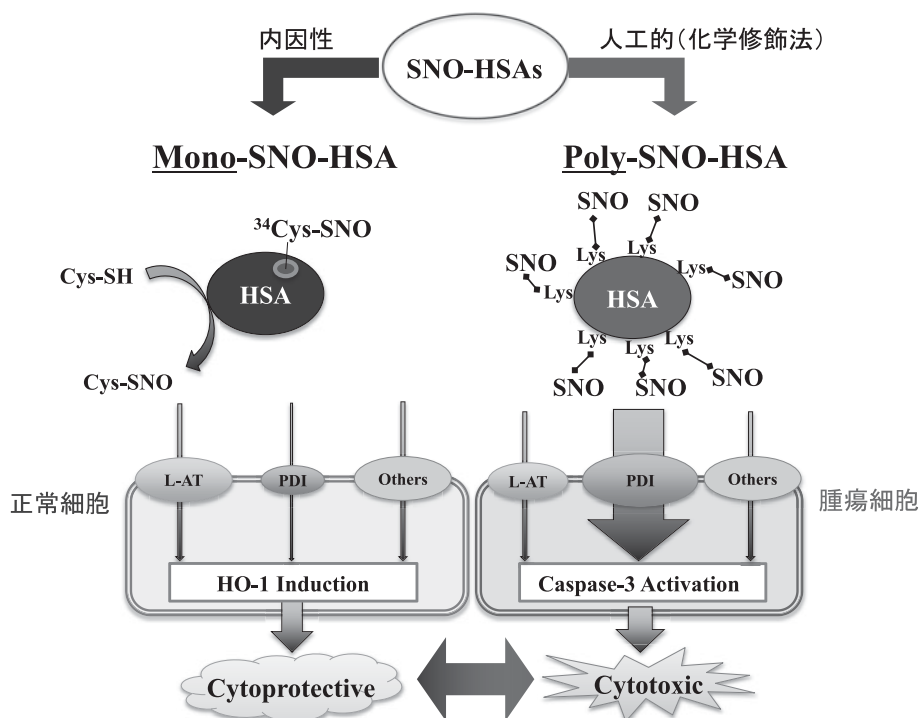


図5 異なる細胞応答性を有する Mono-SNO-HSA と Poly-SNO-HSA のメカニズム

まれる一方, Mono-SNO-HSA ではゆっくりとした細胞内 NO 輸送が起こることが判明した (図 4A). そして更なる阻害剤を用いた検討の結果, Poly-SNO-HSA と Mono-SNO-HSA による NO 送達経路が異なり, Poly-SNO-HSA では細胞膜上のプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) が関与することで高効率な供給が可能になることが分かった (図 4B). 私は, この知見と NO の二面性を考え合わせることで, 1つの仮説を導き出した (図 5). 『Mono-SNO-HSA は, 低分子のチオール化合物への SNO 転移反応を介して L-アミノ酸トランスポーター (L-AT) により細胞内へ NO を供給する. この NO 輸送効率率は極めてゆっくりとしたものであり, 細胞内の NO 濃度が高濃度に達することはない (NO 輸送過程が律速). 一方で, Poly-SNO-HSA は, PDI によって極めて高効率かつ 1 段階で細胞内へ NO を供給するため, 短時間で細胞内 NO は高値を示す (Poly-SNO-HSA 暴露濃度が律速)^{2,3)}. つまり, こういった律速過程の違いが細胞内 NO 濃度をそれぞれ低値と高値に調節制御し, 異なった細胞内シグナル (HO-1 とカスパーゼ-3 の誘導) を引き起こした結果, 細胞保護あるいは細胞障害に働いているということではないか』と. 実際このことを立証し, レビューアに罵声を浴びせられながらも, 様々な追加実

験を重ね, 論文化できたときの何とも言えない喜びは, 今でも忘れない. 追記しておく, 今回 Poly-SNO-HSA からの細胞内 NO 輸送の大部分に関与している細胞表面に発現する PDI は, 多くの腫瘍細胞に発現し, その PDI 発現量は悪性度と相関していることも知られている. また, 腫瘍細胞が免疫回避の手段の一つとして獲得している MHC class I chain-related gene A (MICA) の分泌に重要なタンパク質として PDI が着目されており, Poly-SNO-HSA の抗腫瘍効果と MICA に何らかの関係性が推察されるため, 今後明らかにしていく必要があると考えている.

5. おわりに

私の研究人生の始まりから, ターニングポイントになった研究内容に至るまで徒然なるままに書かせて頂いた. 今回, 執筆の機会を与えて頂き, 日頃あまり振り返らない過去を思い起こしてみる非常に良い機会を与えて頂いたことをまずは感謝したい. 起こるすべてのことが研究や人としての糧になっていき, 経験するすべてのことが繋がっていくことを改めて感じ, 自分はそれに『ただ乗っかっているだけ』であることを再認識させられた. 私は自分でも頭が良くないし, 物覚えが悪いと感じている (これは謙

遜でもなんでもない。最近特に感じている)。学会等に行かせて頂くと、スマートな方は本当に大勢いらっしやる。だからこそ、他の人が考えないことを考えるように、研究が好きだという気持ちだけは負けないようにと努力してきた。例えば、ゼミや学会の時の質問は他の人がやってからすること(質問がかぶったらすぐ別の質問を考える)とか、論文を読んで、その研究者達が今後やろうとすることをしないこと等々。後は、どんな領域の研究でも自分の研究との関連がありそうなことはないかとアンテナを張り続けることを心がけている。こういうことを今書いていることすらも、これまでに会った先輩方や先生方から頂いた、非常に的を射た言葉が心の奥底に突き刺さっているからだと思う。幸い単刀直入に言って下さる方々が周りに多かったおかげである。ただ、研究が好きな気持ちは、どうやって維持できているのか自分でも分からない。生まれつき好きだと言えばそうなのかもしれないが、今回こうして改めて振り返ってみると、私の周りには薬を作りたいとか科学の進歩のためになどという巨大な使命感に押しつぶされそうになりながらも、研究を楽しんでやっている先輩方や先生方ばかりであった。いくら朝方まで実験が続いたとしても、休みの日が無くな

ったとしても、研究や実験がきついということを実際に聞いたことがない。こういった素晴らしい研究者の方々の背中を見てきたからこそ、「自然と」研究が好きであり続けられているのかと、ふと感じた。まだまだ研究者の道は先が長いですが、私もそういう素晴らしい研究者になりたいと強く思うと同時に、いつまでも研究の楽しさを伝えられる人になりたいと心から願っている。

引用文献

- 1) Y. Ishima, F. Yoshida, U. Kragh-Hansen, K. Watanabe, N. Katayama, K. Nakajou, T. Akaike, T. Kai, T. Maruyama, M. Otagiri, Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin, *Free Radic. Res.*, **45** (10), 1196–1206 (2011).
- 2) Y. Ishima, M. Hara, U. Kragh-Hansen, A. Inoue, A. Suenaga, T. Kai, H. Watanabe, M. Otagiri, T. Maruyama, Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models, *J. Controlled Release*, **164** (1), 1–7 (2012).
- 3) Y. Ishima, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, M. Otagiri, Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 353892 (2013).