

Yamamarin 誘導体による
細胞増殖制御機構の解析

2010

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物環境科学専攻
(岩手大学)

佐藤嘉則

目 次

序 論.....	1
謝 辞.....	8
第 1 章 Yamamarin 誘導体による各種細胞の増殖抑制	9
材料と方法.....	11
1. 供試試薬.....	11
2. ラット肝がん細胞増殖抑制試験.....	13
3. 昆虫培養細胞増殖抑制試験.....	15
結 果.....	19
1. Yamamarin 誘導体によるラット肝がん細胞 (dRLh84) の増殖抑制効果.....	19
2. C16-Yamamarin による昆虫培養細胞の増殖抑制効果.....	25
考 察.....	36
摘 要.....	39
第 2 章 細胞増殖抑制メカニズムの解析.....	40
材料と方法.....	43
1. ラット肝がん細胞増殖抑制活性の可逆性実験.....	43
2. 昆虫培養細胞増殖抑制活性の可逆性実験.....	44
3. DNA マイクロアレイによる解析.....	45
4. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析.....	50
5. ミトコンドリアおよび細胞膜透過化処理細胞による解析.....	51

結 果.....	55
1. C16-Yamamarin によるラット肝がん細胞の可逆的増殖抑制効果	55
2. C16-Yamamarin による昆虫培養細胞の可逆的増殖抑制効果	57
3. C16-Yamamarin による RNA 発現レベルでの変動.....	59
4. C16-Yamamarin による細胞周期の変動.....	69
5. C16-Yamamarin によるミトコンドリアレベルの酸素消費活性の可逆的抑制効果	71
考 察.....	76
摘 要.....	80
総 合 考 察.....	82
引 用 文 献.....	86
補 遺.....	100

序 論

代謝や発育の一時的な停止、すなわち休眠は生物の広範囲で確認できる普遍的な生命現象である。植物での種子休眠や菌類の孢子や芽包での休眠、また動物の冬眠・夏眠などが相当する。このような休眠中の生物の多くは、活動中に比べ、季節変動などに伴う不適な環境条件下でも生存できる。つまり生命の維持に必要なエネルギーを節約することで、より長期間の生存を有利にする手段でもある。

ほ乳類での長期臓器保存を目的として開始されたシベリアシマリス (*Tamias sibiricus*) での休眠研究により、活動期では血中に存在する冬眠特異的タンパク質 (hibernation-specific peptide: HP) が、冬眠期に HP 複合体の形で脳関門を通過し脳内に存在しており、HP 複合体から乖離し活性化した HP20c の脳内での存在量と冬眠の期間が見事に相関していることが報告されている (Kondo *et al.*, 2006)。その一方で、HP の臓器での機能や、冬眠における直接的な機能とその作用機構、すなわち生体での代謝低下や発育停止を誘導する分子実体についてはいまだに解明されていない (近藤, 2007)。

シベリアシマリス以外の動物の休眠として、胞胚期で停止する着床前のカンガルーやワラビーなどの有袋類、マウスやラットといったほ乳類、さらにカイコやイナゴ類のような昆虫の卵での休眠など、発生の初期段階でも知られている。昆虫およびほ乳類の休眠を調整する内分泌系には、大きな違いが存在するにもかかわらず、分裂や分化に関連する成長因子などは進化的に保存されている (Renfree and Shaw, 2000)。また、マウス胞胚での休眠ステージと非休眠ステージのマイクロアレイを用いた研究により、休眠中と活動中の発現遺伝子の比較で明確な差異がある代謝経路が報告されており、細胞周期やシグナル伝達、エネルギー代謝などに関連する経路が含まれている (Hamatani *et al.*, 2004)。しかし、シマリスやラットなどほ乳動物を用いた休眠研究では、数ヶ月から数年に及ぶ長期間の厳密な実験を要し、飼育可能な個体数も限られてくる。

ライフスパンが短いにもかかわらず、ほ乳動物と代謝上類似の経路を有する生物としてセンチュウ (*Caenorhabditis elegans*) が知られている。無脊椎動物である *C. elegans* の休眠は飢餓や過密など、環境条件の悪化により耐性幼虫 (dauer larva) として誘導される。休眠移行への決定は、生存に不適な環境条件に応答し、チトクローム P450 の CYP2 ファミリーに関連するステロイドの水酸化酵素

DAF-9 を介しておこなわれる (Gerish and Antebi, 2004)。センチウの休眠機構は遺伝的欠損系統や RNAi などによるノックダウン個体で進められており、ミトコンドリアレベルでのエネルギー代謝と寿命の関係 (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009) のように、真核生物の根幹に迫る研究がなされている。その一方で、外部からのエネルギー補給のない長期間の生存を可能にする分子実体および生理的機構の詳細は、ほとんど解明されていない (Narbonne and Roy, 2009)。

昆虫の生活圏は地球上の熱帯から亜寒帯までに及び、多様な環境に適応することで繁栄しており、進化の頂点に位置している生物網のひとつである。昆虫の休眠は生存を脅かすような極端な乾燥地帯や、一年を通じて変動する環境条件である温帯でも、厳しい環境条件が緩和されるまでの生存を可能にしている。このように、昆虫にとっても休眠は環境適応戦略のひとつであり、昆虫繁栄の面でも有効な生存様式である。

昆虫の休眠はチョウ目 (Lepidoptera) というひとつの目に焦点を絞っても、カイコ (Nakagaki *et al.*, 1991) などの卵内胚子やヤママユ (鈴木・藤沢, 1989) やマイマイガ (Atay-Kadiri and Benhsain, 2005) などの前幼虫体、ニカメイガ (Goto *et al.*, 2001) などの終齢幼虫、ナミアゲハ (Yamanaka *et al.*, 2004) などの蛹、シ

ジミチョウの仲間などの成虫休眠が挙げられる。このように休眠はその種特異的なステージで発生し、多岐にわたる機構および生体物質が関与することが示唆される。

昆虫休眠の分子レベルの調節機構として、蛹休眠中のニクバエ (*Sarcophaga crassipalpis*) では遺伝子の明らかな up-regulation と down-regulation が確認され (Flanagan *et al.*, 1998)、また HSP などストレス応答タンパク質遺伝子が休眠期間を通じて発現していることが報告されている (Rinehat *et al.*, 2007)。

このように昆虫休眠を研究することは、それぞれの種の生命現象を理解するだけにとどまらず、老化や長寿といったメカニズムの解明、さらには休眠関連物による医薬品候補物質などへの応用開発の可能性を秘めている (Suzuki *et al.*, 2001; 鈴木・楊, 2007; Denlinger, 2008)。その一方で、植物や動物での休眠の共通点として、環境条件改善までの期間の発育停止や生体としてのストレス耐性の増強 (Eira and Caldas, 2000; Hand and Menze, 2008)、代謝および呼吸の可逆的な低下などの事象が挙げられる。これらを解析することは、休眠という生命現象を理解するにとどまらず、農業や医療など、生物を扱う多様な分野への応用が可能となる。しかし現在に至るまで、休眠中の細胞レベルにおける共通する現

象に関して、未だに有効なツールを持ちえていない。

ヤママユ (*Antheraea yamamai*, 通称天蚕) は日本原産の大型絹糸昆虫で、その絹糸は繊維のダイヤモンドといわれるほどの高級織材として知られている。一方でヤママユは産下後幼虫体を形成し、約8か月に及ぶ休眠(前幼虫体休眠)をおこなう。その後、春先に孵化後約2か月で繭を作って蛹になり、さらに2か月間の休眠を経て、8月上旬から9月下旬に羽化する一化性の昆虫である。このようにヤママユは高級織材を生産する昆虫であるが、生活史に介在する休眠により飼育期間が限られているため、休眠打破することで年多回育の試行錯誤がおこなわれてきた。その成果として、前幼虫体休眠中のヤママユにイミダゾール系化合物 KK-42 {1-benzyl-5-[(E)-2,6-dimethyl-1,5-heptadienyl]imidazole} を塗布することで、休眠打破が確立された(鈴木・藤沢, 1989)。自然界では、ヤママユの前幼虫体休眠の打破には長期間の低温接触が必要であり、この期間を短縮するために KK-42 が塗布された。その結果、長期低温処理と同等な効果を示すことから(Shimizu *et al.*, 2002)、KK-42 による分子機構を解析することで、前幼虫体休眠メカニズムの解明につながることを期待される。

このヤママユ前幼虫体休眠では、中胸部から分泌される抑制因子(repressive

factor, RF) により休眠が維持され、後休眠は腹部第2～5節から分泌される成熟因子 (maturation factor, MF) によって制御されるモデルが提唱された (Suzuki *et al.*, 1990)。そして、抑制維持 (因子) のひとつの候補物質として5つのアミノ酸から成り、C末端がアミド化されたペプタペプチド (DILRGa, Yamamarin) が同定された (Yang *et al.*, 2004)。

休眠打破のために KK-42 を塗布した前幼虫体において、Yamamarin は休眠期間の延長活性を持っている (楊, 2004)。これ以外にも、ラット肝がん細胞 (dRLh84) での細胞死を伴わない細胞増殖抑制活性 (Yang *et al.*, 2004)、さらに Yamamarin をリード化合物として合成された C16-Yamamarin は、カイコにおける休眠卵産生活性も報告されている (Yang *et al.*, 2007)。以上のことから Yamamarin とその誘導体は、起源昆虫であるヤママユのみならずカイコからほ乳類の細胞レベルまで、広範な休眠化現象を引き起こしていると考えられる。

そこで本研究では、この Yamamarin およびその誘導体を活用し、Yamamarin のリード化合物を基盤としながら、昆虫における細胞レベルでの休眠誘導機構の解析を目的として、第1章では Yamamarin 誘導体が各種培養細胞の増殖に及ぼす影響を検討し、第2章ではマイクロアレイ解析や細胞周期解析、そしてミ

トコンドリア機能解析を通じて、Yamamarin 誘導体による細胞増殖抑制活性のメ
カニズムについて提案した。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜った岩手大学農学生命課程応用昆虫学研究室教授・鈴木幸一博士、講師・安 嬰博士、また御指導ならびに御助言を賜った岩手大学農学部准教授・小藤田久義博士、帯広畜産大学地域環境学研究部門教授・倉持勝久博士、弘前大学農学生命科学部教授・比留間潔博士、さらに実験を進める上で多大なる御援助ならびに御指導を賜った三重大学教授の今井邦雄博士、北海道大学助教の神谷昌克博士、農業生物資源ジーンバンクの今西重雄博士、寒冷バイオフィロンティア研究センター教授・上村松生博士、伊藤菊一博士、岩手大学21世紀COEプログラム博士研究員・楊 平博士（現㈱日本予防医学研究所 研究開発部）、リサーチアシスタント・松川和重博士（現㈱東北化学薬品 生命システム情報研究所）、佐々木裕博士、㈱東北化学薬品 生命システム情報研究所 松田洋和博士に甚大なる感謝の意を表します。そして、公私にかかわらず、多くの御指導と御援助を賜った石黒慎一博士、藤原由美子博士、山本圭一郎氏、荻間澤真弓女史をはじめとする岩手大学農学生命課程応用昆虫学研究室諸氏に心から深く御礼申し上げます。

最後に、常に私を支えていただいた家族全員に感謝の意を表します。

第 1 章 Yamamarin 誘導体による各種細胞の増殖抑制

Yamamarin はヤママユ (*Antheraea yamamai*) の休眠中の前幼虫体より休眠維持物質のひとつの候補として同定された。Yamamarin の活性として、ほ乳類がん細胞であるラット肝がん細胞 (dRLh84) において、細胞周期の G0/G1 期での停止という細胞死を伴わない増殖抑制活性が示され (Yang *et al.*, 2004)、甲虫目昆虫であるチャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*) では、心拍の抑制活性が報告されている (Szymanowska-Dziubasik *et al.*, 2008)。

さらに、細胞膜への透過効率の向上を目指してパルミチン酸 (C16) を結合した C16-Yamamarin において、チョウ目の別種昆虫であるカイコ蛹への注射で、産卵後に胚子発育の停止で休眠卵産生誘導活性を示した (Yang *et al.*, 2007)。

Yamamarin が同定されたヤママユの休眠は、卵内に幼虫体を形成した後に発生する前幼虫体休眠であり、母蛾の日長により休眠ホルモンの分泌が決定されるカイコとは分子機構が異なることが推定されるにもかかわらず、休眠という共通の生理現象を誘導したことは注目に値する。

そこで本章では、Yamamarin 誘導体による細胞増殖制御剤としてのリード化

化合物開発研究の可能性を検証するために、Yamamarin の活性部位特定のためのアラニン置換体や、酢酸、カプリル酸、パルミチン酸といった脂肪酸を結合させた Yamamarin 誘導体によるラット肝がん細胞の増殖抑制活性試験と、Yamamarin の起源昆虫であるヤママユからの昆虫培養細胞とゲノム解析が終了しているシヨウジョウバエ胚子由来の S2 細胞を使用した細胞増殖抑制活性試験をおこなった。

材料と方法

1. 供試試薬

ペンタペプチドである Yamamarin (DILRG-NH₂) およびアラニン置換体などの Yamamarin 関連ペンタペプチドは北海道大学助教の神谷昌克博士が、C2-、C8-、C16-Yamamarin などの脂肪酸結合型 Yamamarin 誘導体は三重大学教授の今井邦雄博士が合成したものを用いた (Fig. 1)。

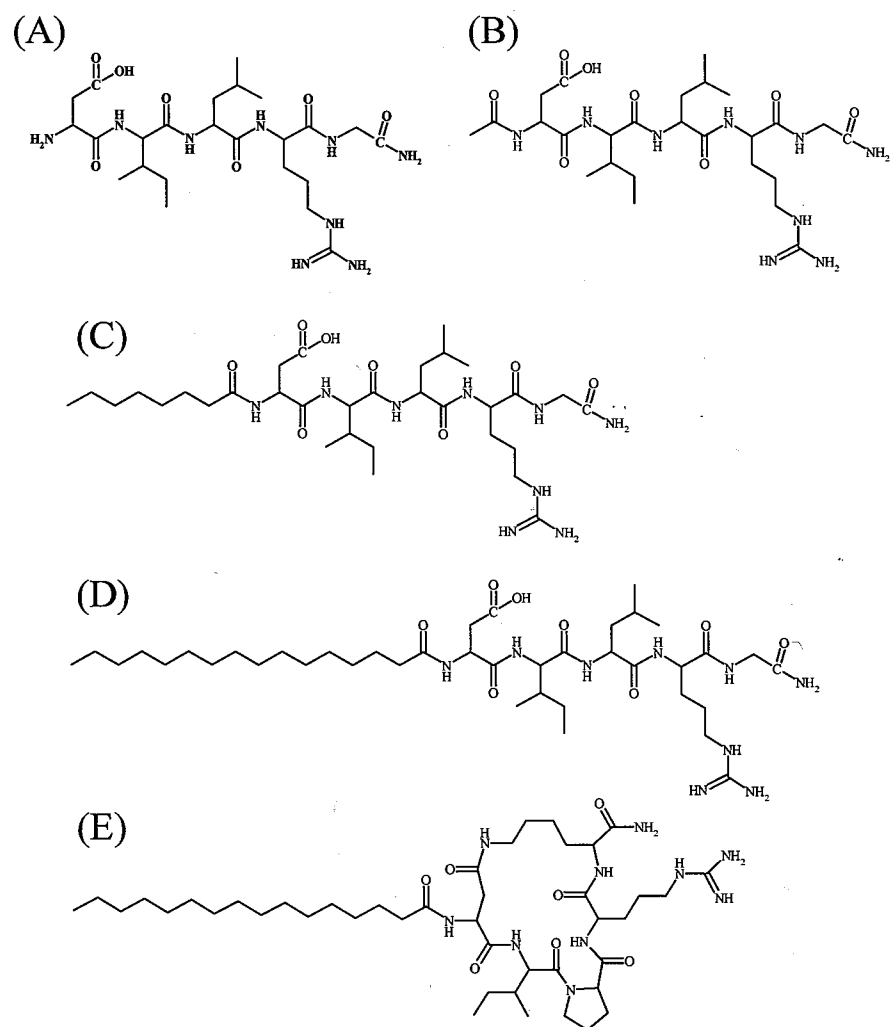


Fig. 1. The structure of Yamamarin derivatives. (A) Yamamarin (DILRG-NH₂), (B) C2-Yamamarin (acetyl-DILRG-NH₂), (C) C8-Yamamarin (octanonyl-DILRG-NH₂), (D) C16-Yamamarin (palmitonyl-DILRG-NH₂) conjugates and (E) C16-Yamamarin conjugates (C16-cyclo-DIPRKA).

2. ラット肝がん細胞増殖抑制試験

1) 細胞と培地組成

ラット肝がん細胞 (dRLh84) を用い、培地には 10%ウシ新生児血清 (NBS)、4 mM グルタミン、50 U/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン (ペニシリン・ストレプトマイシン液、大日本住友製薬)、100 µg/mL カナマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、日水製薬) を使用した。培養は 5% CO₂ 存在下、37°C 湿潤条件でおこなった。

2) がん細胞増殖測定法

がん細胞の増殖は MTT アッセイで測定した。MTT [3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide] は細胞内脱水素酵素により還元され、ホルマザンを生成する。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあり、可溶化したホルマザン溶液の吸光度を測定することによ

り生細胞数を計測できる (Oka *et al.*, 1992)。本研究ではこの方法に従い、以下の手順で実験をおこなった。

ペントペプチドのようにサンプルが水溶性の場合、細胞は細胞培養用ディッシュ (100×20 mm、グライナー) で培養し、対数増殖期に培地を取り除き PBS (-) で洗浄した。さらに細胞をトリプシンで浮遊させ、培地を用いて 5×10^4 cells/mL の濃度に調整した細胞浮遊液を 100 μ L ずつ 96 穴マイクロプレート (IWAKI) に添加し、同条件で 24 h 前培養した。培養後の実験区には検定濃度の 10 倍の濃度に PBS (-) で溶解したサンプルを各ウェルに 11 μ L ずつ添加した。なおコントロール区には、サンプルの代わりに PBS (-) を 11 μ L ずつ添加した。

一方、C16-Yamamarin などの脂肪酸結合型サンプルでの検定の場合、細胞は細胞培養用ディッシュ (100×20 mm、グライナー) で培養し、対数増殖期に培地を取り除き PBS (-) で洗浄した。さらに細胞をトリプシンで浮遊させ、培地を用いて 2.5×10^4 cells/mL の濃度に調整した細胞浮遊液を 199 μ L ずつ 96 穴マイクロプレート (IWAKI) に添加し、同条件で 24 h 前培養した。培養後の実験区には検定濃度の 200 倍の濃度に Dimethyl sulfoxide (DMSO) で調整、溶解

したサンプルを各ウェルに 1 μ L ずつ添加した。なおコントロール区には、サンプルの代わりに DMSO あるいは DMSO で溶解した同濃度のパルミチン酸を 1 μ L ずつ添加した。

細胞増殖抑制活性試験の場合には、48 h の検定培養後に培地を取り除き、0.55 mg/mL の MTT (DOJINDO) を含む培地を 100 μ L ずつ添加した。さらに 4 h 培養後、MTT を含む培地を取り除いて DMSO を 200 μ L ずつ添加し、プレートボルテックスでホルマザンを溶解したのち、2 波長 (590 – 620 nm) における吸光度をマイクロプレートリーダー (Immuno-Mini NJ-2300、インターメッド) で測定し、コントロールとの対比により細胞増殖抑制率を算出した。

3. 昆虫培養細胞増殖抑制試験

Yamamarin 誘導体による昆虫培養細胞の反応を解析するために、Yamamarin の起源昆虫であるヤママユ (*Antheraea yamamai*) と、遺伝子解析などの研究例の多いショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) に由来するものを使用した。

1) 細胞と培地組成

Yamamarin の起源昆虫であるヤママユの蛹卵巣皮膜細胞 Anya (Imanishi *et al.*, 2003) と増殖速度の速いショウジョウバエ胚子由来 Schneider S2 細胞 (Schneider, 1972) の2種類の昆虫培養細胞を用いた。

Anya 細胞の培養は、MGM448 (Mitsuhashi, 1984) に10%の補体処理済 FBS を添加し、抗生物質として Antibiotic-Antimycotic (100×) liquid (GIBCO) を培地 1 L あたり 1 mL 添加したものをを用いた。培養は 25°C 全暗条件でおこなった。なお継代は、懸濁した細胞浮遊液 1 に対し、新鮮な培地 4 の割合で7日ごとにおこなった。

Schneider S2 細胞の培養は Schneider's insect medium (Sigma) に10%の補体処理済 FBS を添加し、抗生物質として Antibiotic-Antimycotic (100×) liquid (GIBCO) を培地 1 L あたり 1 mL 添加したものをを用いた。培養は 27°C 全暗条件でおこなった。なお継代は、懸濁した細胞浮遊液 1 に対し、新鮮な培地 10 の割合で4日ごとにおこなった。

2) 昆虫細胞増殖測定法

昆虫培養細胞の増殖抑制活性の測定は、血球計算盤による細胞の計数と、MTTアッセイを改良したWST-1アッセイ (Ishiyama *et al.*, 1993) によりおこなった。WST-1はMTTと同様に細胞内脱水素酵素により還元され、ホルマザンを生成するが、このホルマザンは可溶性であるため浮遊細胞などの検定が容易である。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあり、ホルマザン溶液の吸光度を測定することにより生細胞数を計測できる。本研究ではこの方法に従い、以下の手順で実験をおこなった。

細胞は細胞培養用フラスコ (12.5 cm², BD Falcon) で培養し、対数増殖期に培地を用いて 5×10^4 cells/mL の濃度に調整した細胞浮遊液を 199 μ L ずつ 96 穴マイクロプレートに添加し、培養条件にしたがって 24 h 前培養した。培養後、実験区には検定濃度の 200 倍の濃度に DMSO で溶解したサンプルを各ウェルに 1 μ L ずつ添加した。なおコントロール区には、サンプルの代わりに DMSO あるいは DMSO で溶解した同濃度のパルミチン酸を 1 μ L ずつ添加した。

細胞数計数による細胞増殖抑制活性試験の場合には、サンプル各濃度にお

ける 24 h ごとの細胞数を血球計算盤により計数し、顕微鏡下での形態的観察をおこなった。

WST-1 アッセイによる細胞増殖抑制活性試験をおこなうにあたり、最適時間および濃度を決定するための予備実験をおこなった。すなわち各濃度のサンプルとともに培養した細胞を 24 h ごとに計数し、コントロールに対し 2 倍程度の増殖抑制を示す時間と濃度を確認し、以下の実験ではその条件で使用した。培養後、WST-1 溶液 (650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WST-1, 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1-methoxy PMS, PBS) を 1 ウェルあたり 10 μl ずつ添加した。さらに 4 h 培養後、吸光度 (450 nm) をマイクロプレートリーダー (Immuno-Mini NJ-2300、インターメッド) で測定した。

結 果

1. Yamamarin 誘導体によるラット肝がん細胞 (dRLh84) の増殖抑制効果

Yamamarin (DILRGa) の細胞増殖抑制活性とアミノ酸配列の関連性を明らかにするために、Yamamarin およびペプチド改変体を用いて dRLh84 に対する増殖抑制活性を調べた。その結果、ペプタペプチドの C 末端がカルボキシル化 (DILRG-COOH) されたもの、および N 末端から 4 および 5 番目のアミノ酸をアラニン (A) に置換したもの (DILAGa、DILRAa) では活性の低下を確認したが、1～3 番目のアミノ酸を置換した 3 種類のペプチド (AILRGa、DALRGa、DIARGa) では 500 μ M までの濃度で増殖抑制活性が認められなかった (Fig. 2)。

また Yamamarin 改変による活性増強を目指して、Yamamarin の N 末端に酢酸 (C2)、カプリル酸 (C8)、パルミチン酸 (C16) の各種脂肪酸を結合した脂肪酸結合型 Yamamarin での dRLh84 に対する増殖抑制活性を検討した。その結果、パルミチン酸結合型 Yamamarin (C16-Yamamarin) の IC₅₀ 値は約 15 μ M であり、Yamamarin (IC₅₀ 値は約 300 μ M) に比べて約 20 倍の活性上昇を確認した (Fig.

3)。なお 25 μM のパルミチン酸と C16-Yamamarin を比較したところ、顕微鏡下でも増殖抑制が観察された (Fig. 4)。さらに C16-Yamamarin を改変した C16-cyclo-DIPRKa の 4 種類の異性体 (R-D, K-D, R-L, K-L) を用いて増殖抑制活性を調べた。その結果、R-D, K-L の異性体で IC_{50} 値は約 6 μM であり、Yamamarin に比べて約 40 倍の活性を確認した (Fig. 5)。

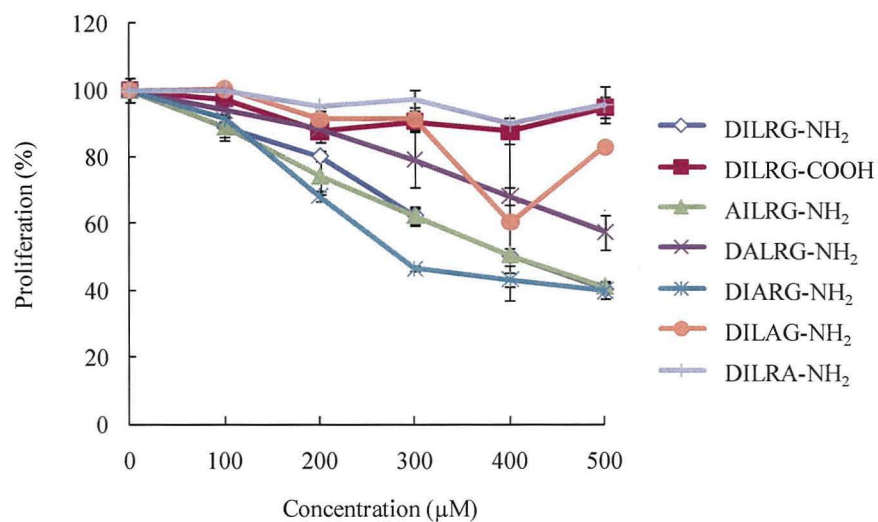


Fig. 2. Relationship between cell growth and concentrations of Yamamarin (DILRG-NH₂) and their derivatives on rat hepatoma cells. Exponentially growth cells were cultured with various concentrations of the conjugates for 48 h. Cell number was measured by the MTT assay and percentage of living cells in cultures incubated with the conjugates was related to numbers of living cells in the control cultures.

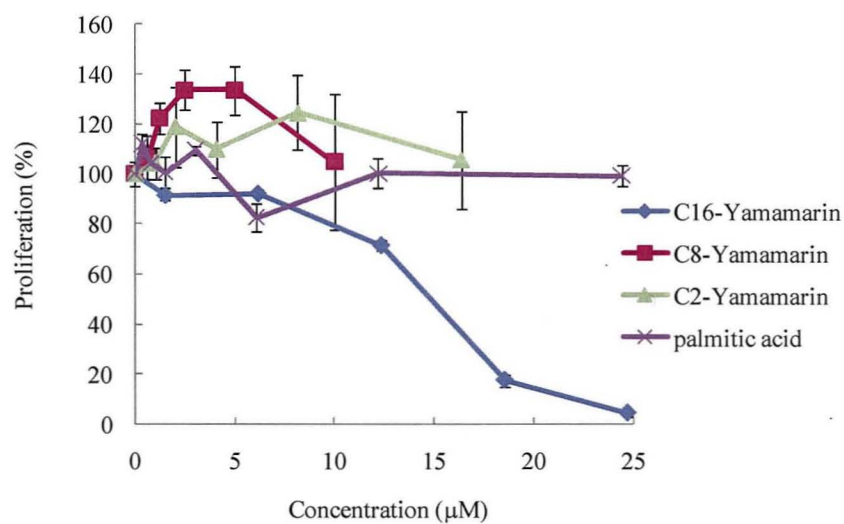


Fig.3. Relationship between cell growth and concentrations of C2 (\blacktriangle), C8 (\blacksquare), C16-Yamamarin (\blacklozenge) and palmitic acid (\times) on rat hepatoma (dRLh84) cells. Exponentially growth cells were cultured with various concentrations of the conjugates for 48 h. Cell number was measured by the MTT assay and percentage of living cells in cultures incubated with the conjugates was related to numbers of living cells in the control cultures.

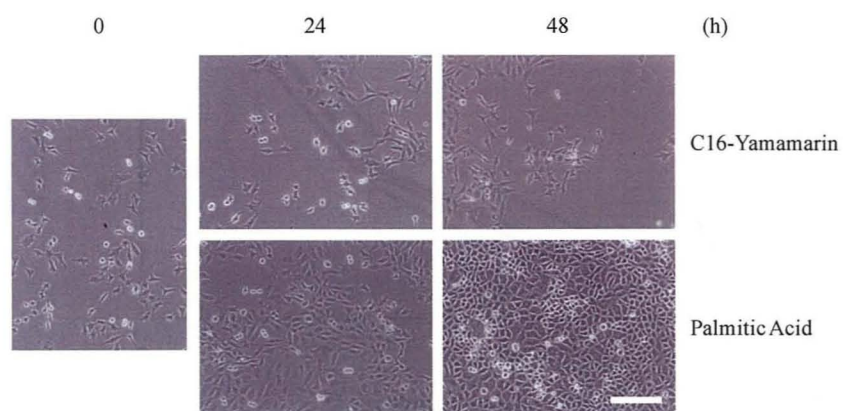


Fig.4. Phase-contrast micrographs of dRLh84 cells treated with samples. Growing cells were treated with 25 μ M palmitic acid as a control (bottom row), 25 μ M C16-Yamamarin (upper row) for 24 h (middle column) and 48 h (right column). Bar =0.2 mm.

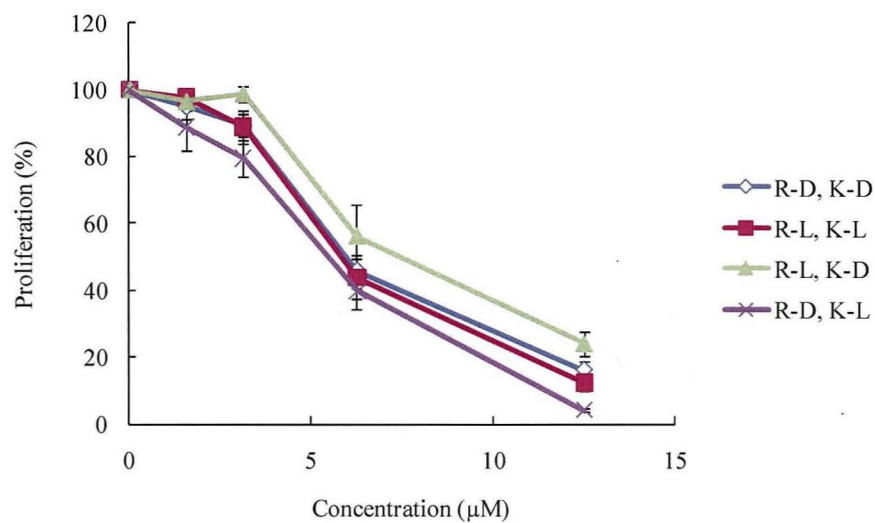


Fig.5. Dose-dependent cell growth suppression effects of the C16-Yamamarin conjugates (C16-cyclo-DIPRKA) of 4 isomers (R-D, K-D; \diamond , R-L, K-L; \blacksquare , R-L, K-D; \blacktriangle , R-D, K-L; \times) on the rat hepatoma cells. Exponentially growth cells were cultured with various concentrations of the conjugates for 48 h. Cell number was measured by the MTT assay and percentage of living cells in cultures incubated with the conjugates was related to numbers of living cells in the control cultures.

2. C16-Yamamarin による昆虫培養細胞の増殖抑制効果

Yamamarin の起源昆虫であるヤママユ (*Antheraea yamamai*) の蛹卵巣被膜由来細胞 (Anya) で C16-Yamamarin の影響を検討した。予備実験として細胞数で調査した結果、コントロール区と比べ 25 μ M C16-Yamamarin とともに 168 h 培養したときに増殖抑制活性を示し、半分程度の細胞数となった。また、同様の方法でこの増殖抑制活性が濃度依存的であることを確認した (Fig. 6)。なお 25 μ M のパルミチン酸と C16-Yamamarin を比較したところ、顕微鏡下でも増殖抑制を観察した (Fig. 7)。さらに WST-1 を用いた細胞増殖抑制活性の検討として、細胞数における検量線を作成した。その結果 450 nm における吸光度と細胞数は直線的な比例関係にあり、特に 5×10^4 cells/mL 以上の細胞数で傾向が現れることを確認した (Fig. 8)。このため Anya 細胞における C16-Yamamarin の活性を検討する方法として、 5×10^4 cells/mL の細胞にサンプルを添加し、添加後 168 h 培養した後に WST-1 法による細胞数の計数をおこなったところ、WST-1 法においても濃度依存的な増殖抑制活性を確認した (Fig. 9)。

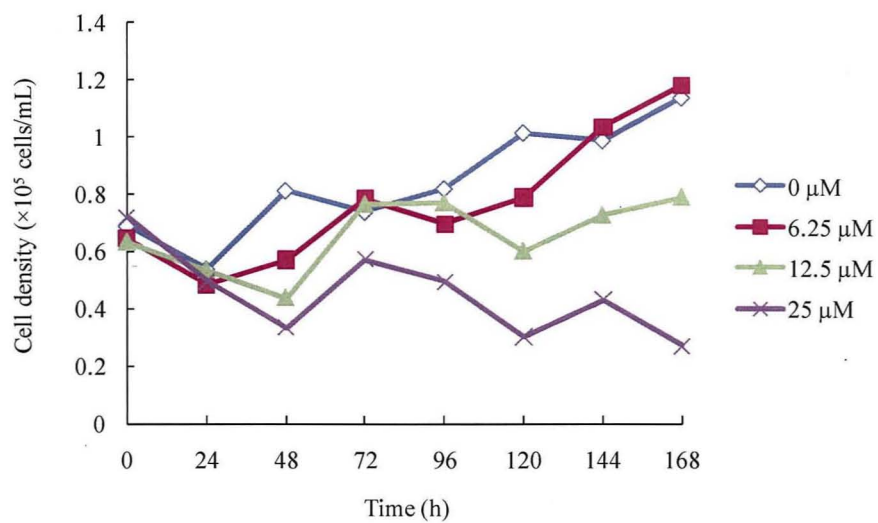


Fig. 6. Dose-dependent cell proliferation suppressive effects of C16-Yamamarin (Control, 0 μM ; \diamond , 6.25 μM ; \blacksquare , 12.5 μM ; \blacktriangle , 25 μM ; \times) on *Antheraea yamamai* cells and time course of cell proliferation in these cell lines. At indicated time points, the cells were counted in a hemocytometer. Initial cell density was 5×10^4 cells/ml. Each concentration was tested in two independent experiments and the data were averaged.

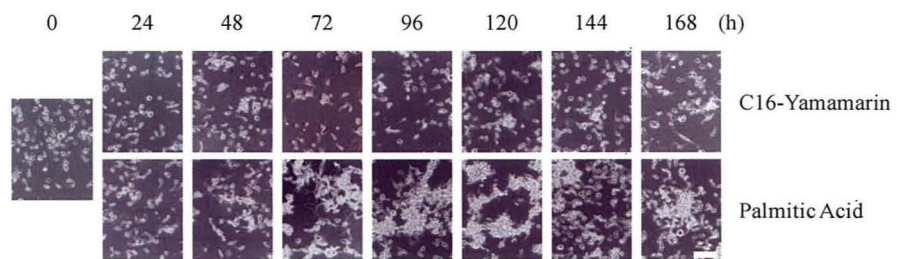


Fig. 7. Phase-contrast micrographs of Anya cells treated with samples. Growing cells were treated with 25 μ M palmitic acid as a control (bottom row), 25 μ M C16-Yamamarin (upper row) for 0 to 168 h. Bar =0.2 mm.

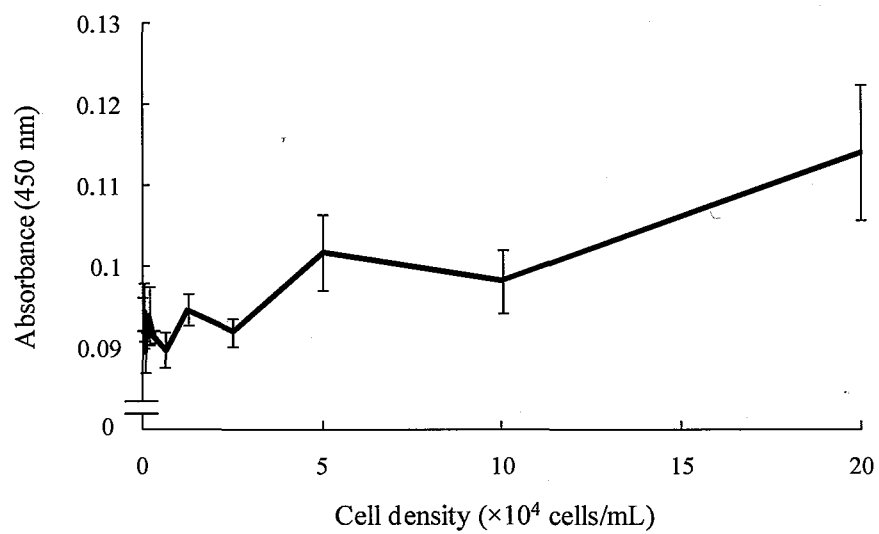


Fig. 8. Relationship between cell density and the absorbance at 450 nm by WST-1 assay in Anya cells. Coefficient of correlation was 0.86.

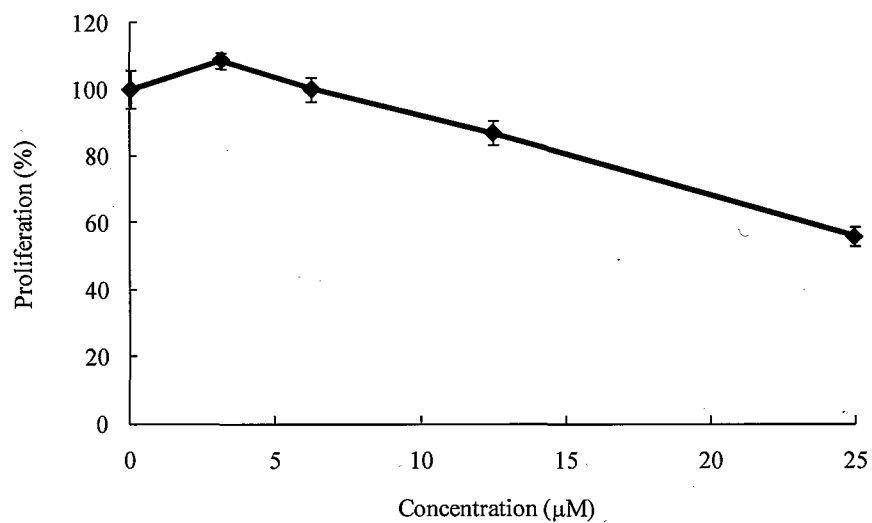


Fig. 9. Dose-dependent cell growth suppression effects of the C16-Yamamarin on the Anya cells. Exponentially growth cells were cultured with various concentrations of the conjugates for 168 h. Cell number was measured by the WST-1 assay and percentage of living cells in cultures incubated with the conjugates was related to numbers of living cells in the control culture.

しかし、Anya 細胞では結果が判明するまでに要する培養時間が 168 h (7 日間) と長く、起源昆虫であるヤママユも遺伝子レベルでの分子生物学的解析を進める上での情報が乏しいため、他の昆虫由来細胞株を使用した。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は全ゲノム配列が解読されており (Myers *et al.*, 2000)、しかもこの胚子に由来する細胞 (Schneider S2) は比較的増殖速度が速いため、C16-Yamamarin による影響を解析するために最適と考えた。

予備実験として細胞数で検討した結果、コントロール区と比べて 12.5 μM C16-Yamamarin とともに 48 h 培養したものでは増殖抑制活性を示し、半分程度の細胞数となり、さらにこの活性が濃度依存的であることを確認した (Fig. 10)。なお、12.5 μM パルミチン酸と同濃度の C16-Yamamarin による増殖を比較したところ、S2 細胞でも顕微鏡下で増殖抑制を観察した (Fig. 11)。また WST-1 を用いた細胞増殖抑制活性の解析のために細胞数における検量線を作成した。その結果、450 nm における吸光度と細胞数は直線的な比例関係にあり、特に 5×10^4 cells/mL 以上の細胞数で傾向が現れることを確認した (Fig. 12)。そこで S2 細胞における C16-Yamamarin の活性を検討する方法として、 5×10^4 cells/mL の細胞に各濃度の C16-Yamamarin を添加し、添加後 48 h の細胞に WST-1 法による細胞数

の計数をおこなったところ、WST-1 法でも濃度依存的な増殖抑制活性を確認した (Fig. 13)。

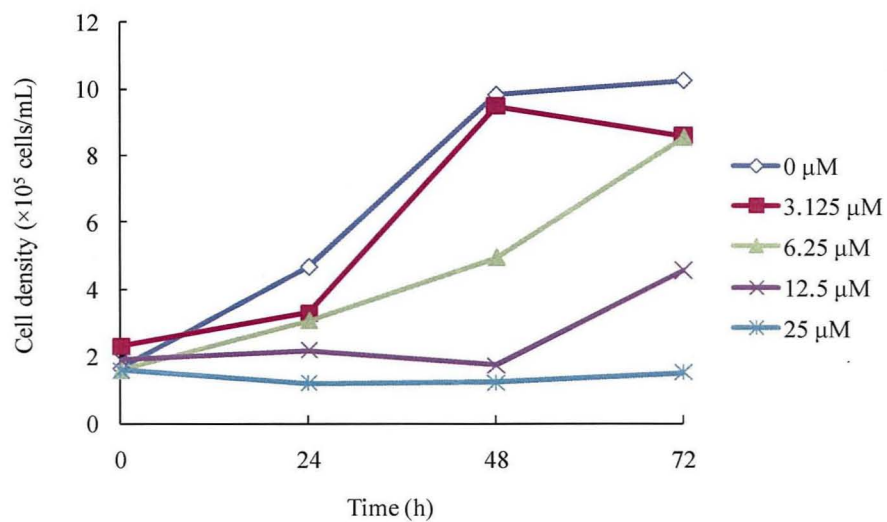


Fig. 10. Dose-dependent cell proliferation suppressive effects of C16-Yamamarin (Control, 0 μM ; \diamond , 3.125 μM ; \blacksquare , 6.25 μM ; \blacktriangle , 12.5 μM ; \times , 25 μM ; \ast) on *Drosophila* Schneider S2 cells and time course of cell proliferation in these cell lines. At indicated time points, the cells were counted in a hemocytometer. Initial cell density was 5×10^4 cells/ml. Each concentration was tested in two independent experiments and the data were averaged.

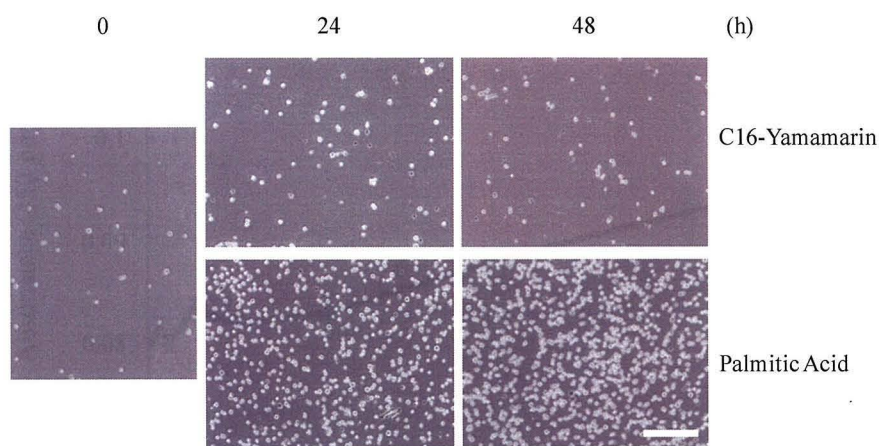


Fig. 11. Phase-contrast micrographs of *Drosophila* Schneider S2 cells treated with samples. Growing cells were treated with 12.5 μ M palmitic acid as a control (bottom row), 12.5 μ M C16-Yamamarin (upper row) for 24 h (middle column) and 48 h (right column). Bar = 0.2 mm.

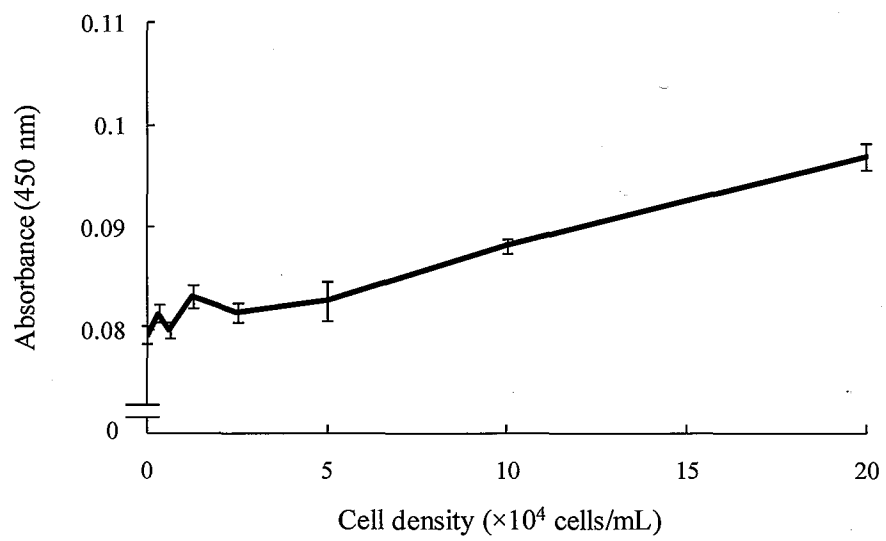


Fig. 12. Relationship between cell density and the absorbance at 450 nm by WST-1 assay in *Drosophila* Schneider S2 cells. Coefficient of correlation was 0.96.

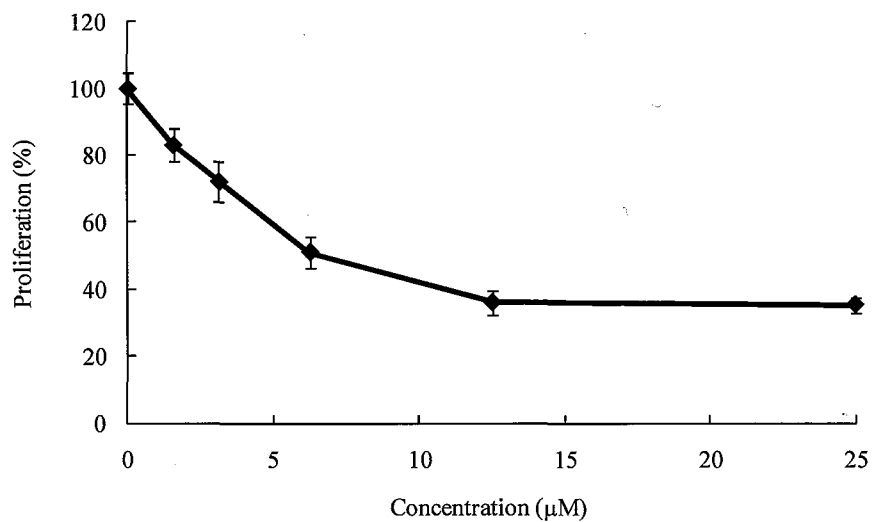


Fig.13. Dose-dependent cell growth suppression effects of the C16-Yamamarin on the *Drosophila* Schneider S2 cells. Exponentially growth cells were cultured with various concentrations of the conjugates for 48 h. Cell number was measured by the WST-1 assay and percentage of living cells in cultures incubated with the conjugates was related to numbers of living cells in the control culture.

考 察

Yamamarin (DILRGa) が有する活性のひとつ、dRLh84 細胞での増殖抑制活性が Yamamarin のアミノ酸配列のどの部位に起因するかを明らかにするために、Yamamarin 関連ペプチドにおける増殖抑制活性の解析をおこなった。また N 末から 1 番目のアスパラギン酸をシークェントしたものでは、Yamamarin と同様の細胞増殖抑制活性を示す一方で、C 末側がカルボキシル基のものでは活性が無いことがすでに報告されている (Yang *et al.*, 2004)。これらの結果より、dRLh84 細胞での増殖抑制活性を示すペプチドの最小単位は $-RG-NH_2$ であることを確認した (Kamiya *et al.*, 2010)。

この配列はヒトやラットなど多くのほ乳類が有する神経ペプチド Arginine Vasopressin (CYFQNCPRG- NH_2) と共通であった。抗利尿ホルモンとしても知られている Vasopressin は脳下垂体後葉より分泌されるペプチドホルモンであり、その名のとおり水イオンチャンネルに関連しており、体液および循環系で恒常性の維持に重要な役割を果たすだけでなく、統合失調症や自閉症など種々の精神疾患にも関与していることが知られている (江頭ら, 2009)。Yamamarin と同様

の $-RG-NH_2$ 構造を有する Vasopressin が水イオンチャンネルに関連する単一の機能としてだけでなく、精神疾患に関与していることから、Yamamarin の立体構造など物理化学的解析が進展することで、Yamamarin の機能がより明らかになることが期待される。

またペプチド構造の安定化と細胞膜への膜透過性の向上を目的としてパルミチン酸 (C16) (Basu, 2004) を結合させた C16-Yamamarin や、真菌類に広く分布しているタンパク毒素 Beauvericin (Gupta *et al.*, 1991) の環状構造をモデルにして C16-Yamamarin を改変し、浸透性と安定性を確保した C16-cyclo-DIPRKa の 4 種類の異性体のうちのひとつである R-D, K-L では、dRLh84 での増殖抑制活性の上昇を確認した。このように Yamamarin の改変により、さらなる活性増強および細胞透過性の向上のみにとどまらず、レセプターの発見などの研究の進展が期待できる。Yamamarin の最小単位 ($-RG-NH_2$) の確認により応用の幅が広がったことと、脂肪酸結合などでの活性増強の結果における Yamamarin の改変は、より強力な細胞増殖抑制剤の開発や個体レベルでの塗布や散布などによる害虫の休眠誘導の可能性を提案できる。

さらに C16-Yamamarin における昆虫培養細胞への影響を解析するために、

Yamamarin 起源昆虫であるヤママユの蛹卵巣皮膜に由来する Anya 細胞、また比較的増殖速度の速いキイロショウジョウバエの胚子に由来する Schneider S2 細胞を用いた増殖抑制活性試験をおこなった。その結果、C16-Yamamarin は起源昆虫であるヤママユのみにとどまらず、ショウジョウバエのように別種昆虫に由来する昆虫細胞、さらにはほ乳類がん細胞であるラット肝がん細胞 dRLh84 で増殖抑制を確認したことから、昆虫からほ乳類まで至る多くの細胞種における Yamamarin 誘導体の *in vitro* での活性が期待できる。

Yamamarin および C16-Yamamarin の CD スペクトルや NMR など分光解析の結果より、 $-RG-NH_2$ に起因する共通のランダムコイルの構造が確認された (Kamiya *et al.*, 2010)。このことから C16-Yamamarin の増殖抑制活性がパルミチン酸など Yamamarin 以外の分子配位に起因するものではなく、ペントペプチド Yamamarin が鍵になっていると考えられる。すなわち、C16-Yamamarin も含めた Yamamarin 誘導体での解析を進めることでヤママユの休眠維持候補物質 Yamamarin の本来の機能を理解できるかもしれない。

摘 要

1. Yamamarin (DILRGa) 関連ペプチドを使用し、ラット肝がん細胞 (dRLh84) における増殖抑制活性を解析した結果、活性保持の最小分子配列単位が -RG-NH₂ であることを確認した。
2. C16-Yamamarin における dRLh84 の増殖抑制活性では IC₅₀ 値が約 15 μM であり、Yamamarin に比べて約 20 倍の活性上昇を確認した。また C16-cyclo-DIPRKa の異性体 (R-D, K-L) の IC₅₀ 値は約 6 μM であり、Yamamarin に比べて約 40 倍の活性上昇を確認した。
3. ヤママユ卵巢皮膜細胞の培養細胞 (Anyu) における C16-Yamamarin の増殖抑制活性が濃度依存的であることを、細胞の計測と WST-1 法で確認した。
4. ショウジョウバエ胚子由来の培養細胞 (S2) における C16-Yamamarin 増殖抑制活性が濃度依存的であることを、細胞の計測と WST-1 法で確認した。