慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	オミクス解析を用いた分子クラウディング効果、及びがん薬剤耐性への探究
Sub Title	
Author	山久保, 純(Yamakubo, Jun)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.143- 149
JaLC DOI	
Abstract	本報告では, システムバイオロジー的概念に基づくオミクス解析から生命現象へのアプローチを利用した研究について学部中に行ったテーマである「分子クラウディング効果が大腸菌の中心炭素代謝反応に与える影響」, 「卵巣がんにおける薬剤耐性機構の解明に向けたプロテオーム及びリン酸化プロテオーム解析」の2つの内, 前者のみを述べる。 細胞内の分子混雑状態が生体分子のふるまいに影響を与える分子クラウディング効果の一つとして, 酵素における熱安定性の向上が明らかにされている。分子混雑状態では, いくつかの酵素において, 熱に対する恒常性が増加すると先行研究で報告されているが, これらは単独の酵素反応のみであり, 代謝反応のような連続反応においては不明である。そこで本研究ではin vitroにて擬似的に再現した分子混雑状態での代謝反応をメタボローム解析から調べることで, 分子クラウディングが与える代謝反応への影響を明らかにすることを目指した。結果, ペントースリン酸経路の律速酵素であるGlucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)が分子クラウディング効果によって, 高温状態下でも活性を保ち, ペントースリン酸経路上流の反応を維持させることが示唆された。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0143

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

オミクス解析を用いた分子クラウディング効果，及びがん薬剤耐性への探究

環境情報学部4年
山久保　純

要旨

本報告では，システムバイオロジー的概念に基づくオミクス解析から生命現象へのアプローチを利用した研究について学部中に行ったテーマである「分子クラウディング効果が大腸菌の中心炭素代謝反応に与える影響」，「卵巣がんにおける薬剤耐性機構の解明に向けたプロテオーム及びリン酸化プロテオーム解析」の2つの内，前者のみを述べる．

細胞内の分子混雑状態が生体分子のふるまいに影響を与える分子クラウディング効果の一つとして，酵素における熱安定性の向上が明らかにされている．分子混雑状態では，いくつかの酵素において，熱に対する恒常性が増加すると先行研究で報告されているが，これらは単独の酵素反応のみであり，代謝反応のような連続反応においては不明である．そこで本研究ではin vitroにて擬似的に再現した分子混雑状態での代謝反応をメタボローム解析から調べることで，分子クラウディングが与える代謝反応への影響を明らかにすることを目指した．結果，ペントースリン酸経路の律速酵素であるGlucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) が分子クラウディング効果によって，高温状態下でも活性を保ち，ペントースリン酸経路上流の反応を維持させることが示唆された．

キーワード：分子クラウディング，メタボロミクス，癌，薬剤耐性，プロテオミクス

1. 序論

1.1 分子クラウディング

細胞内は多くの生体分子の混在によって非常に高濃度となっている．このような細胞内環境は高濃度というよりも，むしろ混雑していると表現される (Ellis *et al.*,2001)．細胞内は非常に特殊な環境を有しており，分子混雑状態の他にも，細胞内領域における局在化や，細胞ごとに存在する分子やふるまいが異なるといった不均一性などが観察される．そしてこれらが複雑に作用する細胞内環境は細胞内に含まれる生体分子にいくらか制約を与えているとされている．その中でも分子混雑状態が分子のふるまいに影響を与える分子クラウディングは分子動力学に基づくシミュレーションと数々の生化学実験から，生体反応においてその効果が実証されている (Minton *et al.*, 2001)．分子クラウディングは込み合いによる拡散速度の低下や占有面積の減少による排除体積効果から平衡定数を変化させ，酵素活性を増加させることや，タンパク質の折りたたみ，熱安定性を向上させることが知られている (Elis *et al.*, 2001)．これら分子クラウディングの効果が，DNAポリメラーゼのDNA結合反応に寄与すること (Zimmerman *et al.*, 1987) や，細胞増殖の制御に関わること (Stefan *et al.*, 2013) も報告されている．しかし，生化学実験の多くは分子混雑状態とはほど遠い低濃度の緩衝溶液内で行われるため，例えば大腸菌の細胞内溶液では，タンパク質，RNAなどによって300~400 g/Lと高濃度になっているのに対して，一般的なin vitro実験で使用される溶液の多くが1~10 g/L程度と非常に低濃度となっている (Elis *et al.*, 2001)．混雑した細胞内においては，生体分子が複雑な相互作用をすることではじめてその機能を発揮するケースもあると想定され，希釈された溶液内では完全に再現できない生体反応があると考えられる．分子クラウディングの効果をin vitro実験にて調べた生化学実験のほとんどが，反応液にクラウディング剤と呼ばれる不活性高分子を添加することによって，細胞内環境の一つである分子混雑を擬似的に再現している．しかし，高濃度に含まれる不活性高分子が生体反応に特異的な相互作用を及ぼし，混み合い以外の効果を引き起こすことが懸念されるなど，細胞内の分子クラウディングを適切に再現できていないという懐疑的な意見も已然として存在する (Phillip *et al.*, 2013)．またBarryらは使用するクラウディング剤の形状によって得られる結果が異なることを報告しており，球状に比べて，ポリマー状のクラウディング剤は粘度が高くなりやすいことから，拡散速度の低下によって酵素活性が下がると述べている (Barry *et al.*, 2006)．しかしクラウディング剤を用いた実験による報告は多く，例えばNorrisらはin vitro実験からペントースリン酸経路のG6PDHにおける酵素反応が，分子クラウディングによって酵素活性に影響を受けていることを報告しており (Norris *et al.*, 2011)，特に反応溶液を高温度にした異環境下ではその効果を顕著に観察できるなど興味深い結果を述べている．その他いくつかの酵素反応機構においても同様の実験によって分子クラウディングが酵素反応に影響を与えていることはいくつも報告されている (Moran-Zorzano *et al.*, 2007; Vopel *et al.*, 2012).

1.2 目的

in vitro実験において，クラウディング剤を用いた実験から分子クラウディングが酵素活性に影響を及ぼすことがこれまで報告されてきた (Totani *et al.*, 2008)．In vitro実験系での溶液濃度を細胞内に近づけることで，影響を受けるとされた酵素反応は，細胞内での活性により近いと想定されている．しかし，細胞内の酵素反応は複数の反応が連続して起こるような代謝の一部であり，それぞれの代謝経路においての反応速度を決めるのは，反応速度の遅い律速酵素である．この律速酵素が，代謝経路の反応速度を決めているため，それ以外の酵素における反応速度は律速酵素と同

程度となり，例え律速酵素以外の酵素活性が増減しても経路全体に影響を及ぼすことは少ないと考えられる．これまでの先行研究の多くは単独の酵素反応における影響のみを報告しているものが多く，代謝経路全体において分子クラウディングがどのような影響を及ぼしているのかは明らかになっていない．そして分子クラウディングが及ぼす影響をシステムとして理解するには，一つの酵素だけではなく，連続する酵素反応による代謝経路の現象を網羅的に俯瞰する必要がある．以上のことから本研究では，分子クラウディングが代謝反応にどのような影響を与えるのか明らかにすることを目的とした．また分子クラウディングはタンパク質の正しい折りたたみや，熱安定性に寄与するとされ，上述したNorrisらの研究においても分子クラウディングは，酵素が失活するような高温状態においても活性を安定に保つことができると報告している(Norris *et al.*, 2011)．このことから代謝反応でも様々な摂動に対して，同じようなことが起こると考えた．つまり熱など，タンパク質の構造を変化させ，**生体反応を妨げるような摂動に対して，分子クラウディングがロバスト性に寄与するという仮説を立てた．**

本研究では分子クラウディング状態での代謝反応をメタボローム解析によって観察するための実験系を構築し，分子クラウディングの効果を観測できることを確かめた．その後，in vitroにて再構成された代謝反応系を分子クラウディング状態で行い，分子クラウディングの効果について調べた．本報告では構築された実験系を用いた分子クラウディング状態におけるメタボローム解析について述べる．

2 対象と手法

2.1 大腸菌由来酵素群の抽出

クラウディング状態における代謝解析を行うために，使用する酵素群を大腸菌から抽出した．菌株はBW25113を用いて培養，抽出を行った．LB寒天培地に対象の大腸菌を植菌，37°Cで一晩培養した後，増殖したコロニーを1% casamino acid入りのM9液体合成培地にて植菌，37°Cで前培養を行った．OD_{600}=0.36で大腸菌培養液をM9液体合成培地にOD_{600}=0.01になるよう植菌した．OD_{600}=0.34およびOD_{600}=0.68で培養液を遠心分離し，菌体を回収した．回収した菌はそれぞれMOPS Bufferで懸濁後，超音波破砕機にて菌体を破壊，遠心分離後の上清に1 mM PMSFを加えた．溶液を濾過処理 (10K限外濾過フィルター) にて濃縮後，MOPS Bufferを添加し，さらに濃縮した．液量の半量の100%グリセロール溶液を添加し，これら異なる増殖相の菌体から得た抽出液を混合した．得られた大腸菌由来抽出酵素群はBradford法にて定量を行った．

2.2 分子混雑条件下でのメタボローム解析

大腸菌由来酵素群を用いた代謝反応をクラウディング状態で行い，キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析 (CE-TOFMS) による中間代謝物の一斉測定から分子クラウディングが代謝反応に与える影響を調べた．既に大腸菌由来抽出酵素群を用いた代謝反応をin vitroにて行い，代謝産物をCE-TOFMSにて測定する実験系は慶應義塾大学政策メディア研究科 斎藤菜摘講師によって構築されている．このため本実験では構築された実験系を応用した．反応溶液 (500 μM ATP, 500 μM NAD, 500 μM NADP, 500 M ADP, MOPS buffer (pH 7.2), 100 g/mL 大腸菌由来抽出酵素群，Milli-Q) を調製し，クラウディング剤としてPolyethylene glycol 6000 (PEG6000) を10% w/vで添加，及び未添加の条件でそれぞれ実験を行った．反応溶液は37°C，50°Cで30 minのプレインキュベーションを行った．1 mM Glucose 6-phosphate (G6P) を添加することで酵素反応を開始，反応開始後10, 20, 30 min

でそれぞれサンプリングを行った後，CE-TOFMS測定用の内部標準化合物を含む水溶液にて反応溶液を5倍に希釈，限外濾過処理 (10K限外濾過フィルター) を行った．作成した試料は陰イオンモードにて測定を行った．一連の反応は解糖系とペントースリン酸経路のみでの反応を想定した．

3 結果と議論

3.1 分子クラウディング効果による代謝反応への影響

分子クラウディング状態におけるメタボローム解析の結果を代謝経路上にマッピングした (図1)．まず，どの反応条件においても3-Phosphaglycerate (3PG)，2-Phosphaglycerate (2PG)，Phosphoenolpyruvate (PEP)，Pyruvate (PYR) は観測できていない．これはPYRから下流の経路に代謝物が流れてしまっていることや，Glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)，Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) 間の酵素であるTPIが反応を行えていない可能性が考えられる．さらに測定前に，反応液を5倍に希釈したために低濃度の代謝物が検出できていない可能性もある．G3Pより下流の代謝物が観測されないことの決定的な理由は分かっていない．

37°Cインキュベーション後の代謝反応ではクラウディング剤を含むことによる変化はみられなかった (青線)．これまでGlucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 酵素反応実験でみられたような分子クラウディング効果が代謝経路においても確認できると予想していたが，変化はみられなかった．これは連続反応による代謝反応は活性測定試験のように最大速度での反応を行っておらず，基質の量によって反応速度が制限されるため，G6PDHのような律速酵素においても単独酵素反応でみられるような分子クラウディングの効果は観察できず，代謝反応ではその影響を受けにくいのではと考える．

次に50°Cのプレインキュベーション後の代謝反応ではPEG6000を含まない場合，37°Cのプレインキュベーションと比べてG6Pの消費速度が低下している他，DHAP，6-Phosphogluconate (6PG)，Ribulose 5-phosphate (Ru5P)，Ribose 5-phophate (R5P)の量が低下している (赤線，実線)．これは高温度の状態が各酵素の活性を低下させたためであると考えられる．しかし，10% w/vのPEG6000を含む場合において6PG，Ru5Pの濃度は37°Cプレインキュベーションと同じような挙動を示しており，ペントースリン酸経路上流に関して代謝反応が高温状態でも維持されていることが観察された (赤色，点線)．これはNorrisらの先行研究で示したように，G6PDHが分子クラウディングの効果によって熱に対しても活性を保つことができたためであると考える．Norrisらは酵母由来のG6PDHを使用しているため，大腸菌由来のG6PDHにおいても同様に分子クラウディング効果を単独の酵素アッセイから検証したところ同様の結果を得ることができた(付録図S1)．また同様にRu5Pも37°Cプレインキュベーションの場合と同じ挙動を示していることから，6PG，Ru5P間の反応における酵素 (6PGDH) においても分子クラウディングの影響を受けていることが予想された．6PGDHにおいても分子クラウディング効果を調べたが，G6PDHのような効果は観察されなかったことから(付録図S2)，律速酵素であるG6PDHの酵素活性が高温状態においても安定して反応を行えたことで後のRu5Pの生産にも影響したと考えられる．

当実験においてPEG6000を10% w/v含む溶液内で行われた代謝反応にペントースリン酸経路上流における高温状態における代謝反応の恒常性がみられた．これは分子クラウディングの効果によるものではなく，PEGそのものが持つ性質である可能性もあるが，不活性分子であるPEGがもたらす効果が実際の細胞内で起こっていることも十分考えられ

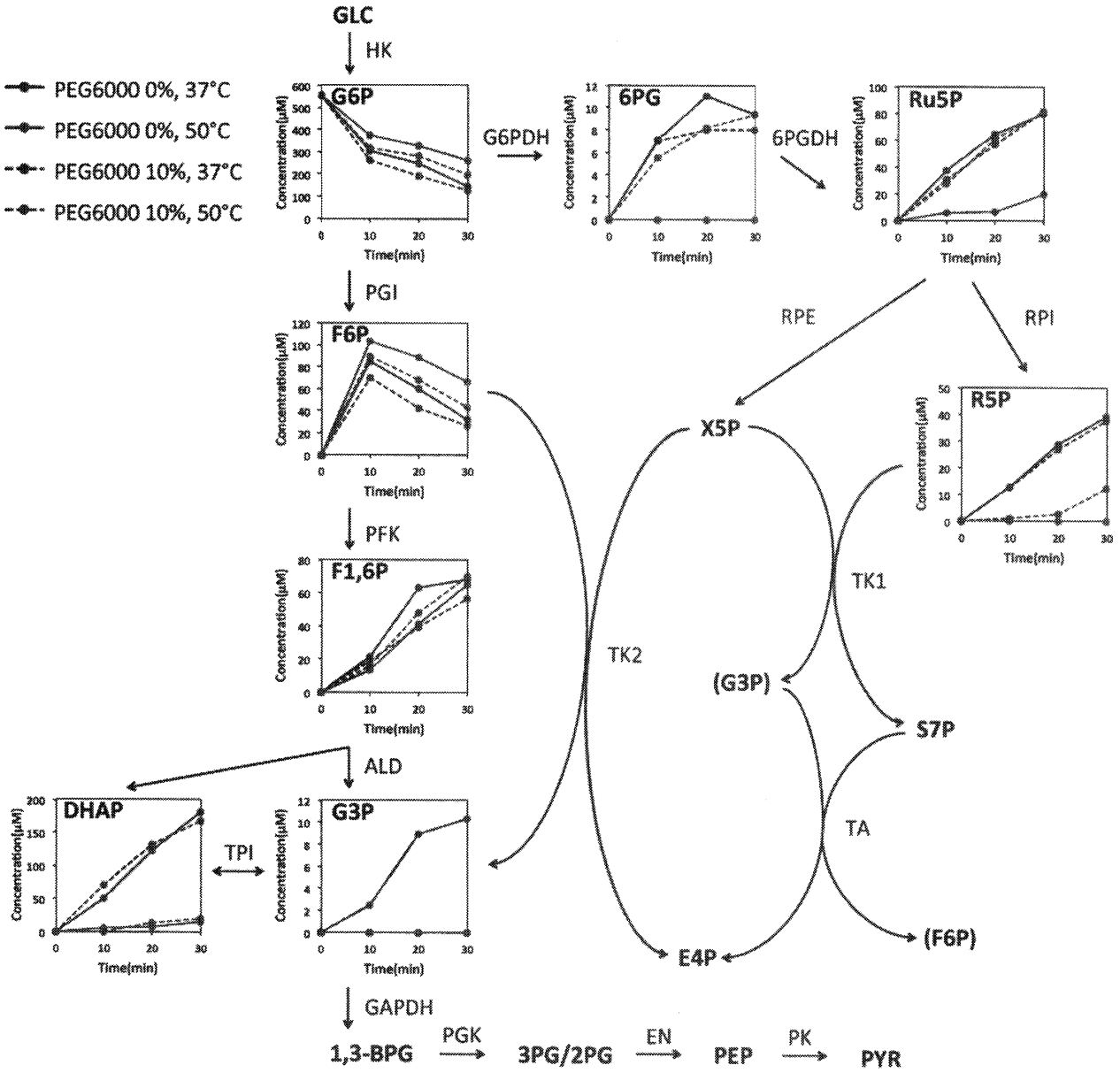


図1 分子クラウディング状態における時系列変動代謝

横軸は反応時間 (min)，縦軸は濃度 (μM) を表している．それぞれの条件において時系列ごとに測定した物質を代謝経路上にマッピングした．青色・実線：37°Cプレインキュベーション，クラウディング剤を含まない．青色・点線：37°Cプレインキュベーション，クラウディング剤を含む赤色・実線：50°Cプレインキュベーション，クラウディング剤を含まない．赤色・点線：50°Cプレインキュベーション，クラウディング剤を含む．

4 結論

本研究では，分子クラウディングが代謝反応に与える影響を明らかにするため，in vitroに再構成した代謝反応を高濃度の不活性高分子中で行い，CE-TOFMSによる測定を行うことで分子クラウディングの効果を観察する実験系を構築した．そしてメタボローム解析の結果，10% w/v PEG溶液では37°Cプレインキュベーションにおいて代謝反応に変化がなく，連続反応の代謝において37°Cの至適温度では分子クラウディングの影響はないことが示唆された．50°Cプレインキュベーションでは10% w/v PEGを含むことで，ペントースリン酸経路上流において代謝反応は低下せず，維持されるなど，分子クラウディングと思われる効果が観察された．今回の実験でこのような現象を観察

できたのはPEGのみであるため，混雑状態によるものではなく，PEGがもつ性質である可能性も考えられる．またメタボローム解析を用いて分子クラウディングの効果を観察できる実験系を構築したことで，今回実験の対象とした解糖系，ペントースリン酸経路以外の代謝反応経路においても同様に実験を行い，分子クラウディングによって代謝反応に影響を及ぼすような酵素の探索をすることができる．また今回は代謝反応を阻害する例として熱を与えたが，上述における仮定を証明するためにはpHの変化など熱以外にも様々な摂動に対する分子クラウディングの影響を観察することは興味深い．

また後日談ではあるが，この研究が終了した後の2013年7月にCheemengらは構築した人口細胞において分子クラウディング環境を再現し，DNAポリメラーゼ反応に様々な摂動を与えたところ，摂動に対して混雑状態がロバスト性に寄与することを報告している (Cheemeng *et al.*, 2013)．つまり本研究で示そうとした代謝反応においては，分子クラウディングがあらゆる摂動に対してロバスト性に寄与するという仮説を，彼らはDNAポリメラーゼ反応からその一端を証明した．本研究ではこれを代謝反応において同様の効果がみられることを示せればと思う．

謝辞

卒業プロジェクトにおける研究は，学部中のアドバイザーである佐伯憲和氏，斎藤菜摘氏，森大氏の多大なるサポートによって行われている．また所属したE-Cellグループ，プロテオームグループの方々にも様々なアドバイスを頂いた．山岸広太郎氏をはじめとする山岸学生プロジェクトの方々には研究費の援助をして頂いた．これらの方々にはこの場をお借りして感謝の意を示したい．最後にすばらしい研究環境を与えてくださった冨田勝氏には深く感謝したい．

参考文献

Derham, B. K. & Harding, J. J. The effect of the presence of globular proteins and elongated polymers on enzyme activity. Biochim. Biophys. Acta 1764, 1000–6 (2006).

Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. Trends Biochem. Sci. 26, 597–604 (2001).

Minton, a P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on

biochemical reactions in physiological media. J. Biol. Chem. 276, 10577–80 (2001).

Morán-Zorzano, M. T. *et al.* Escherichia coli AspP activity is enhanced by macromolecular crowding and by both glucose-1,6-bisphosphate and nucleotide-sugars. FEBS Lett. 581, 1035–40 (2007).

Phillip, Y. & Schreiber, G. Formation of protein complexes in crowded environments--from in vitro to in vivo. FEBS Lett. 587, 1046–52 (2013).

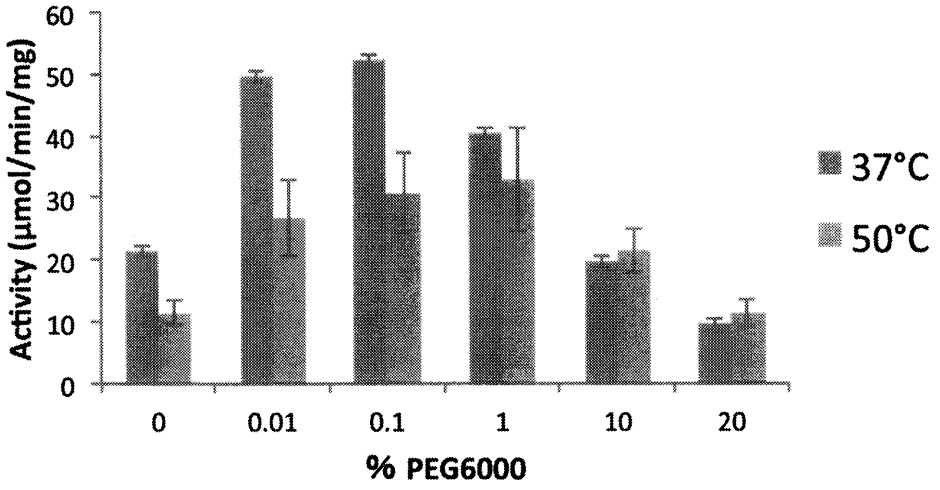
Tan, C., Saurabh, S., Bruchez, M. P., Schwartz, R. & Leduc, P. Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems. Nat. Nanotechnol. 8, 602–8 (2013).

Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I. & Ito, Y. Effects of macromolecular crowding on glycoprotein processing enzymes. J. Am. Chem. Soc. 130, 2101–7 (2008).

Vöpel, T. & Makhatadze, G. I. Enzyme activity in the crowded milieu. PLoS One 7, e39418 (2012).

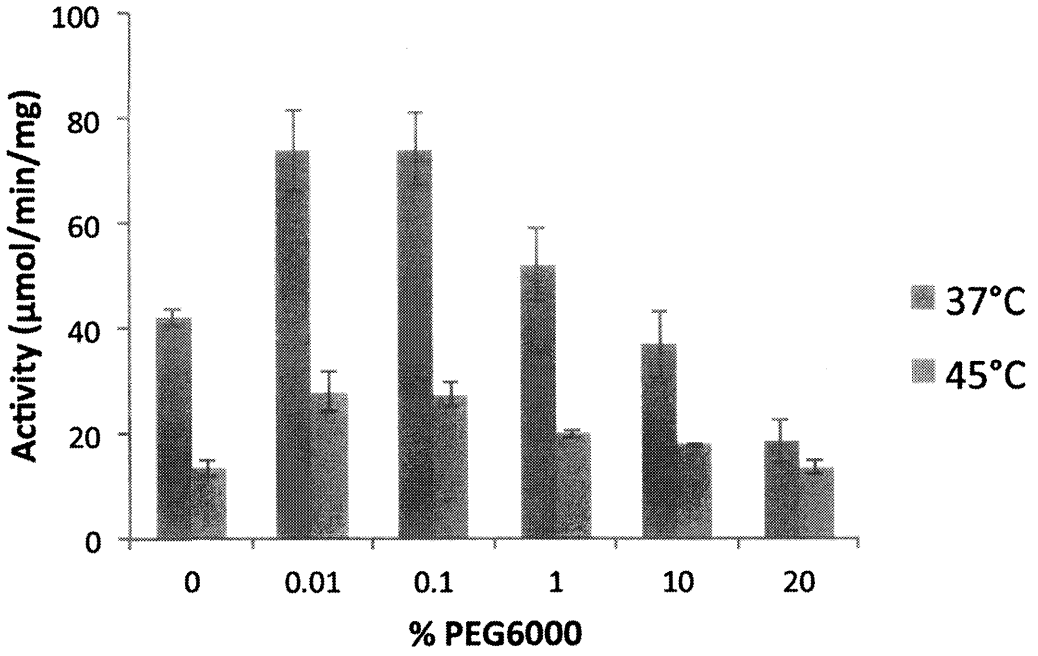
Zimmerman, S. B. & Harrison, B. Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84,** 1871–5 (1987).

付録



図S1 G6PDH活性が受ける分子クラウディングの影響

横軸は各クラウディング剤の濃度 (w/v). 左の図の縦軸はG6PDHの酵素活性 (μmol/min/mg), 青色が37°C, 赤色が50°Cでプレインキュベーションした場合における活性をそれぞれ表している. 誤差範囲は3回の測定結果における標準誤差 (Standard Error; S.E.)を示す.



図S2 6PGDH活性が受ける分子クラウディングの影響

横軸は各クラウディング剤の濃度 (w/v). 左の図の縦軸は6PGDHの酵素活性 (μmol/min/mg), 黒が37°C, 灰色が50°Cでプレインキュベーションした場合における活性をそれぞれ表している. 誤差範囲は3回の測定結果における標準誤差 (Standard Error; S.E.)を示す.