

動物・細胞システム研究室

Animal and Cellular Systems Laboratory

主任研究員 高 月 昭
TAKATSUKI, Akira

生物は外的ならびに内的な様々な要因に対して多様な応答を示し、また、応答する可能性を秘めている。当研究室ではこれらの機構の基礎的な解明を通して生物機能の制御技術に貢献することを目指している。このような観点に立脚して、病態を含め多岐に亘る重要な生物機能を担っている糖タンパク質を取り上げて(1)糖タンパク質が合成の場から生物機能を発現する場合に向けて細胞内を転送される機構の解明と(2)糖タンパク質の生物機能発現における糖鎖機能の解明を当面の重要課題としている。そのために、特異な阻害剤や変異をプローブとして用いることによってこれらの機構の局面を切り出して解析を進めている。なお、前研究室来の腸内細菌関連の研究も継続されている。

1. 複合糖質の細胞内転送機構

(1) 糖タンパク質細胞内転送阻害剤の探索と単離(室井、高橋^{*1}、中村^{*1}、幾田^{*1}、石井^{*1}、佐藤^{*1}、高月)

粗面小胞体で合成された糖タンパク質がゴルジを経て細胞表層に出現するに至る過程については、分泌変異株や再構成系を用いた研究が展開されている。我々が見いだした Brefeldin A の新規な阻害作用は広く利用されるに至っているが、2000 年だけでも 200 編を超える Brefeldin A を用いた研究が報告されていることに見られるように、選択的阻害剤は糖タンパク質の細胞内転送機構の研究において有用なプローブとなる。しかし、有用な阻害剤は限られているので、すでに確立している簡便で効率的な糖タンパク質の細胞内転送阻害剤探索系にその後の知見を踏まえて更なる改変を加えた阻害剤の探索と単離を進めている。前年度に引き続いて、ウイルス糖タンパク質が細胞表層へ出現した結果として起こる合胞体の形成の抑制を細胞内転送の指標として、糖タンパク質の合成に対する影響が少ない濃度範囲で合胞体形成を抑制する活性を示す物質を、土壌微生物、海洋微生物、植物組織などの抽出物について探索し、活性物質を種々の精製手法を組み合わせで精製・単離した。次いで、それらの構造について解析した。

(2) 動物培養細胞を用いたタンパク質細胞内転送の解析(室井、Jung^{*2}、高橋^{*1}、中村^{*1}、幾田^{*1}、石井^{*1}、黒岩^{*1}、佐藤^{*1}、高月)

Mepanipyrim 関連物質のウイルス糖タンパク質のプロセッシングと細胞表層出現に及ぼす作用を、水疱性口内炎ウイルス感染培養細胞を用いて蛍光抗体法によるウイルス糖タンパク質の細胞内蓄積部位の解析や糖鎖切断酵素を用いた糖鎖構造の解析等を行うことによって構造-活性相関を検討した。

新規 Mycophenolic acid 関連物質の作用をウイルス感染細胞を用いて解析し、Mycophenolic acid と同様の作用機構を有することを明らかにした。

Radicicol のウイルス糖タンパク質のプロセッシング、トリマー形成、細胞内転送に及ぼす作用を解析し、ゴルジレベルで作用していることを示唆する結果を得た。

Ascochlorin とその類縁体 LL-Z1272ε は共にニューカッ

スル病ウイルス感染 BHK 細胞において合胞体形成を顕著に阻害することを認めた。しかし、LL-Z1272ε は Ascochlorin に比較して赤血球凝集素の合成を強く阻害した。糖タンパク質合成後の細胞内転送を追跡するために小胞体からゴルジへの細胞内転送を阻害する Brefeldin A の作用を利用して、水疱性口内炎ウイルスの外被糖タンパク質の細胞内転送に及ぼす作用を検討した。Ascochlorin も LL-Z1272ε も細胞外へのウイルス糖タンパク質の放出を顕著に阻害した。蛍光抗体法でウイルス糖タンパク質の細胞内局在性を経時的に追跡したところ、Ascochlorin ではゴルジ以降の過程で、LL-Z1272ε はゴルジと考えられる細胞内オルガネラにウイルス糖タンパク質の蓄積が認められた。細胞内転送に重要なオルガネラであるゴルジの形態に及ぼす作用を検討したところ、LL-Z1272ε 処理 NRK 細胞ではゴルジのフラグメント化が観察された。ゴルジ構造維持に關する細胞骨格系に及ぼす作用について検討した結果、微小管に対する作用は認められなかったが、F-アクチンの破壊が観察された。

(3) 酵母を用いたタンパク質細胞内転送の解析(平田、富茂^{*3}、高月)

Folimycin はウイルス外被糖タンパク質の細胞表層出現を阻害するが、その標的分子は細胞内小器官内腔の酸性化に機能する液胞型 ATPase (V-ATPase) である。タンパク質転送阻害と酸性化阻害との関係について、さらに詳細に検討することを目的として、酵母で Folimycin によって転送阻害を受けるタンパク質を検索した。その結果、複数回膜貫通型の細胞膜タンパク質である Pma1p が Folimycin を作用させることによって液胞に誤輸送される現象を認めた。液胞への蓄積は間接蛍光抗体法と Pma1p の液胞内プロテアーゼに対する感受性で確認した。この現象は、V-ATPase のサブユニット欠損株にも認められた。Folimycin 処理による Pma1p の液胞への蓄積は、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送を阻害する sec18 変異によって阻害された。その一方で、ゴルジ以降の過程に作用する分泌変異株(sec)やエンドサイトーシスの変異株(end)では、野生株を処理した場合と同様に液胞への蓄積が認められた。以上の結果から、Pma1p は分泌経路を経由して、細胞膜に出現することなく

ゴルジ体から直接液胞に輸送されていることが示唆された。Folimycin は、別の細胞膜マーカータンパク質である Gas1p の細胞膜への発現や分泌タンパク質 Suc2p の分泌には影響しなかった。

酵母のエンドサイトーシス経路を分子レベルで解析するための実験系を確立することを目的として新規なエンドサイトーシスのマーカータンパク質を検索し、その候補として酵母における主要な GPI-アンカータンパク質である Gas1p を同定している。本タンパク質を用いてエンドサイトーシス経路の解析を引き続き行っている。また、GPI-アンカー型タンパク質の局在化に働く遺伝子の取得を目的として、酵母 GAS1 破壊株を用いて合成致死を示す遺伝子の探索を行って合成致死を示す変異株を取得することができ、変異遺伝子のクローニングを行っている。

(4) ゴルジ装置ダイナミクスに作用する薬剤の作用解析(室井, Jung^{*2}, 高橋^{*1}, 中村^{*1}, 幾田^{*1}, 石井^{*1}, 黒岩^{*1}, 佐藤^{*1}, 高月)

糖タンパク質等の細胞内転送に伴うこれらの出入りに加え、細胞分裂期には断片化して娘細胞に等分に分配された後でゴルジ構造体が再構築されることから示されるように、ゴルジ装置は非常にダイナミックな細胞内小器官である。ゴルジ装置は糖タンパク質等の細胞内転送において中心的な役割を担っていることから、糖タンパク質細胞内転送過程に作用する薬剤にはゴルジ装置のダイナミクスに作用するものが濃縮されていることが期待される。そこで、Brefeldin A の処理後速やかにゴルジタンパク質が小胞体に逆行移行し、除去後速やかにゴルジ構造が再構築される作用を利用したゴルジ装置ダイナミクス解析系を確立した。取得した糖タンパク質細胞内転送阻害剤や関連物質について本系を用いてゴルジ装置ダイナミクスへの作用を解析した。

Ascochlorin は Brefeldin A で誘起されたゴルジ局在タンパク質の逆行移行に作用しないのに対し、LL-Z1272ε は顕著に阻害した。LL-Z1272ε は Ascochlorin とは異なり F-アクチンの構造を破壊するが、Ascochlorin と CytochalasinB を一緒に NRK 細胞に作用させると LL-Z1272ε と似た作用が観察された。

Mepanipyrim も Brefeldin A で誘起されたゴルジ局在タンパク質の逆行移行を阻害した。Brefeldin A はアデノシンリボシル化因子の GDP/GTP 交換反応阻害剤であるが、これとは異なる作用を有する Nordihydroguaiaretic acid や Arachidonyltrifluoromethyl ketone で誘起された逆行移行も阻害することを認めた。これら逆行誘起剤はゴルジのみならずトランス・ゴルジ網の逆行移行あるいは細胞質分散を誘起するが、Mepanipyrim はこれら薬剤のトランス・ゴルジ網への作用は抑制しないこと、すなわち、ゴルジ特異的に作用することを認めた。

タンパク質細胞内転送阻害剤のゴルジ膜ダイナミクスの解析に際して既知の逆行移行阻害剤や逆行移行誘起剤の作用との比較検討を行う過程で、カルシウム非依存性 Phospholipase A2 阻害剤である Arachidonyltrifluoromethyl ketone がゴルジならびにトランス・ゴルジ網に局在するタンパク質を細胞質に分散させることを認めた。トランス・ゴルジ網は Brefeldin A や Nordihydroguaiaretic acid の作用に対してゴルジよりも感受性が低い。しかし、Arachidonyltrifluoromethyl ketone に対しては同じ感受性を示すことを認

めた。その作用について検討を行った結果、既知逆行移行誘起剤とは異なることを示す結果を得た。更に Clofibrate の作用についても検討を加え、上記の阻害剤とは異なる作用を認めた。

^{*1} 研修生, ^{*2} 協力研究員, ^{*3} ジュニア・リサーチ・アソシエイト

2. 糖タンパク質糖鎖機能

(1) グルコシダーゼ阻害剤の探索と作用(門倉^{*1}, 小林^{*1}, 高月)

糖鎖は糖タンパク質の機能発現において重要な機能を担っている。リピド中間体からポリペプチド鎖に転移された少糖鎖は3個のグルコース残基を有するが、ポリペプチド上での糖鎖合成は、プロセッシンググルコシダーゼの作用を受けてグルコース残基が遊離されることに始まる。本酵素阻害の簡便な検定法を用いて、プロセッシンググルコシダーゼ阻害剤の探索を昨年に引き続き行った。

(2) エキソ型グリコシダーゼに関する構造生物学と特異的阻害剤の創製(袴田^{*2}, 高月)

エキソ型グリコシダーゼは、糖代謝および糖タンパク質糖鎖の構築に関与する酵素として注目されている。これらグリコシダーゼに対する阻害剤は、それらの異常によって引き起こされる様々な疾病に対し、有効な治療薬となる可能性を有している。 α -グリコシダーゼ阻害剤については天然物とその誘導体を中心に研究が行われてきたが、それらの阻害活性は、酵素の由来によって大きく異なる。また、基質特異性に基づく α -グリコシダーゼ阻害剤の開発に関する報告は数少ない。そこで、阻害剤の構造と酵素活性部位の構造の両面から阻害剤と酵素の相互作用を検討することによって選択的 α -グリコシダーゼ阻害剤を創製することを目指した。1-amino-2, 6-anhydro-1-deoxy-D-glycero-D-ido-heptitol のアミノ基に嵩高さの異なる官能基または末端に水酸基を有する炭素鎖長の異なるアルキル基をアミド結合した分子構造を有する化合物を調製した。それらのグリコシダーゼ阻害活性を検討することによって、アグリコン特異性を解析する分子プローブとしての有用性を検討した。

^{*1} 共同研究員, ^{*2} 基礎科学特別研究員

3. 脂質の代謝調節に関する研究(鈴木)

昨年に引き続きフィトステノンの薬理作用について検討した。5-Campestenone を SD ラットに pair-fed で投与すると、0.1%および0.3%添加で血漿トリグリセライドおよび遊離脂肪酸に有意な低下が見られたが、血漿コレステロールには差が見られなかった。このことから5-Campestenone は小腸からの脂質の輸送を阻害するが肝臓におけるコレステロール合成には作用しないことが示唆された。この研究は有機合成化学研究室の協力によって行われた。

[参照 研究ユニット: 肥満・脂血症研究ユニットコレステノンおよびフィトステノンの薬効、毒性および作用機序に関する研究]

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Kogoshi N., Takatsuki A., Kim Y.-J., and Kitahara T.:
“Synthesis of unnatural enantiomer of nectrisine and its
biological activity”, *Heterocycles* **49**, 63–66 (1998). *

Kuroiwa N., Nakamura M., Tagaya M., and Takatsuki A.:
“Arachidonyltrifluoromethyl ketone, a phospholipase A₂
antagonist, induces dispersal of both Golgi stack- and
trans Golgi network-resident proteins throughout the cy-
toplasm”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 582–
588 (2001). *

Muroi M., Ando O., Bols M., and Takatsuki A.: “Pro-
cessing glucosidase inhibition by 1-azafagomine”, *Biosci.*
Biotechnol. Biochem. **64**, 1103–1105 (2000). *

(単行本)

高月昭: “糖鎖合成阻害剤の研究への応用”, 基礎生化学実験
法, 日本生化学会(編), 東京化学同人, 東京, 5, 203–206
(2000).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Suzuki K., Shimizu T., and Nakata T.: “Lowering effect
of phytosterones on serum lipid and body fat accumula-
tion in mice”, 10th European Congr. Obesity, (The Eu-
ropean Association for the Study of Obesity), Antwerp,
Belgium, May (2000).

(国内会議)

中村真知子, 河野芳樹, 高月昭: “Mepanipyrim はゴルジ-
小胞体間の逆行移行を選択的に阻害し, ゴルジとトラン
ス・ゴルジ網を分別する”, 日本農芸化学会 2001 年度大
会, 京都, 3 月 (2001).

室井誠, 高橋美和, 金子堯子, 高月昭: “Radicicol のウイ
ルス外被糖蛋白質の細胞内転送並びにゴルジ体の形態に
及ぼす作用”, 日本農芸化学会 2001 年度大会, 京都, 3 月
(2001).

袴田航, 西尾俊幸, 奥忠武, 高月昭: “アグリコン特異性解
析用プローブの調製とそのグルコシダーゼ阻害活性”, 日
本農芸化学会 2001 年度大会, 京都, 3 月 (2001).

富重斉生, 野田陽一, 下飯仁, 足立博之, 高月昭, 依田幸司:
“出芽酵母における GAS1 破壊と合成致死を示す遺伝子の
探索”, 日本農芸化学会 2001 年度大会, 京都, 3 月 (2001).

越野広雪, 室井誠, 田近立春, 木村靖夫, 高月昭: “新規
Mycophenolic acid 誘導体 F13459 の構造解析”, 日本農
芸化学会 2001 年度大会, 京都, 3 月 (2001).

黒岩奈津子, 中村真知子, 多賀谷光男, 高月昭: “新規ゴ

ルジ装置分散誘起剤 Arachidonyltrifluoromethyl ketone
(AACOF3) の作用: 既知誘起剤の作用との比較”, 日本農
芸化学会 2001 年度大会, 京都, 3 月 (2001).

Research Subjects and Members of Animal and Cellular Systems Laboratory

1. Intracellular Trafficking of Glycoconjugates
2. Glycoproteins in Cell Biology
3. Metabolic Regulation of Lipids

Head

Dr. Akira TAKATSUKI

Members

Dr. Kunio SUZUKI

Dr. Ryogo HIRATA

Dr. Makoto MUROI

Dr. Wataru HAKAMADA ^{*1}

Dr. Dong-Soo JUNG ^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

Visiting Members

Mr. Kazunari KADOKURA (Kibun Food Inc.)

Mr. Kei KOBAYASHI (Kibun Food Inc.)

Mr. Masaki MIBAYASHI (Sch. Biosci. Biotech., Tokyo
Inst. Tech.)

Mr. Nario TOMISHIGE (Dept. Biotechnol., Univ.
Tokyo)

Trainees

Ms. Miwa IKUTA (Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

Ms. Miho ISHII (Sch. Sci. Eng., Teikyo Univ.)

Ms. Natsuko KUROIWA (Sch. Life Sci., Tokyo Univ.
Pharm. Life. Sci.)

Ms. Machiko NAKAMURA (Sch. Agr., Ibaraki Univ.)

Mr. Kazuto SATO (Fac. Life Sci., Toyo Univ.)

Ms. Kiyoko TAKAHASHI (Coll. Bioresour. Sci., Nihon
Univ.)

Ms. Miwa TAKAHASHI (Fac. Sci., Jpn. Women's Univ.)