

生物機能開発研究所
平成 22 年度プロジェクト成果報告書

課題 1 : 融合調節タンパク質 FRP による細胞融合制御機構の解析
—パラミクソウイルス感染における細胞融合機能解析—
担当 : 伊藤 守弘

生体が発生し、かつその生命機能を維持するためには種々の様式の膜融合（あるいは細胞融合）が必要である。このような生理的膜融合のうち受精や筋形成における細胞融合あるいは細胞内物質輸送における膜融合の分子機構にはまだ不明な部分も多いが、これらを媒介する蛋白群が同定されつつあり、さらに複雑な分子間相互作用を伴っていることが確実となった。

一方、エンベロープを持つウイルスは膜融合を介して細胞に侵入し、またその結果感染した細胞が隣接する非感染細胞と融合して多核巨細胞を形成することが知られているが、これらの現象がウイルスの糖蛋白により媒介されることが既に明らかになっている。我々の研究グループは、NDV ウイルス感染マウス繊維芽細胞に細胞融合を促進する抗体を発見した。この抗体が認識している分子をアフィニティークロマトグラフィーで精製し同定した所、その分子は CD98 であった。

そこで、我々は CD98 の機能を解明するため、CD98 ノックアウトマウスを作製したが、妊娠 6 日以前の胎生致死であったため、生体内の詳細な解析は不可能だった。最近、我々はコンディショナルノックアウトマウスを作製することに成功したため、今後各臓器組織での CD98 機能を複合的に解析したいと考えている。

課題 2 : 融合調節タンパク質 FRP による細胞融合制御機構の解析
—破骨細胞の分化及び機能における生薬由来化合物の阻害作用—
担当 : 禹 濟泰

骨の量と機能は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収(骨破壊)とのバランスによって維持されている。高齢社会の中で患者数が急速に増加している骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収により骨量が減少し、骨折を起こす疾患である。破骨細胞の分化、機能および活性化を阻害する化合物は骨破壊抑制剤として骨粗鬆症の予防や治療にも応用できる。そこで、天然由来低分子化合物から破骨細胞分化と機能に作用する物質を探索した結果、生薬として用いられている草の黄連 (*Chelidonium majus*) から単離されるアルカイド化合物である Coptisine を見出した。Coptisine は破骨細胞の前駆細胞の細胞生存率に影響を与えず、多核破骨細胞の形成を抑制した。破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) による破骨細胞分化シグナルにおける作用を、Western blot 法によって解析した結果、Coptisine は RANKL によって誘導される NF- κ B のリン酸化と NFATc1 のタンパク質発現を抑制した。今後、Coptisine による RANKL の破骨細胞分化シグナルの抑制が、破骨細胞の分化における細胞融合過程にどのような影響を与えるか、またこれが FRP1 による細胞融合機構に関与するか解析する予定である。

課題 3 : 融合調節タンパク質 FRP による細胞融合制御機構の解析
—U2ME-7 細胞の融合に対する破骨細胞分化抑制化合物の効果—
担当 : 大西 素子

ウイルス感染細胞における膜融合の制御タンパク質として、伊藤らによって同定された FRP1 (CD98) は、重鎖と軽鎖からなるヘテロ二量体の膜タンパク質である。ヒト抹消血単球の初代培養系に FRP1 重鎖に特異的な抗体を加えると、骨吸収活性を持つ破骨細胞が形成されるが、破骨細胞の分化に必需不可欠な破骨細胞分化因子 (RANKL) と FRP1 の関係は明らかでは無い。そこで本研究ではこれらに共通する分子基盤を明らかにすることを目的として、検討を行なった。

まず、ヒト免疫不全ウイルスタンパク質 gp160 を発現するヒト単球由来 U2ME-7 細胞株を用いて、細胞融合系構築のための条件検討を行なった。FRP1 に対するモノクローナル抗体は、伊藤らの協力のもと、マウス腹水からアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。検討の結果、抗ヒト FRP1 抗体濃度が 2.5 μ g/ml の時に、細胞の凝集数と融合率の両方が最も高くなることがわかった。次に、こ

れまで禹らによって破骨細胞分化を抑制することが見出された化合物の、U2ME-7 細胞の融合に対する影響を調べた結果、honokiol、luteorin、fargesin、nepodin、ATD、cardamonin、EGCG は 10~100 μM で融合率を 50%以上阻害したが、細胞融合の前段階である細胞の凝集を阻害したのは honokiol と nepodin のみであった。今後、これらの化合物の融合抑制機構について解析を行う。

課題 4 : カシスアントシアニンの健康機能とこれを高含有する作物の開発

ーカシスアントシアニンの健康機能ー

担当 : 津田 孝範

カシス (*Ribes nigrum* L.) は、温帯性の落葉低木で、その実は黒色~濃紫色で、ジャムやシロップ、飲料、リキュール等に加工されている。カシス果実は豊富なアントシアニン含有する。その含有量は、ブルーベリーよりも高く、主に 4 種のアントシアニンを含む。この中でルチノース配糖体のアントシアニンはカシス果実に特異的で、ブルーベリーなどには存在しない。カシスアントシアニンは、主に視覚機能の改善の点から研究が進められており、ブルーベリーよりも優れた視覚機能の改善効果の科学的根拠を持つ。その他、近年では健康に関する多機能性が期待されているものの、その解明は途についたばかりである。そこで本研究ではカシスアントシアニンの健康機能を解明し、同様の機能性成分を持つ栽培容易な作物を作出して普及させることを目的とした。この中でカシスアントシアニンの健康機能解明を担当した。

その結果、カシスアントシアニンは、細胞レベルでの脂肪細胞機能の改善効果 (アディポネクチン発現低下抑制)、エネルギー代謝の鍵分子、AMP キナーゼの活性化作用が認められた。さらにこれらの知見を元にして、動物個体での効果を糖尿病モデルマウスで検討した。その結果カシスアントシアニンの摂取は、体重増加に影響は及ぼさないが、血清グルコース濃度上昇の抑制、インスリン感受性の上昇が認められた。この作用機序については、今後細胞での結果も踏まえながら立証するとともに、実用化のために、共同研究者である吉村講師によるカシスアントシアニン高含有作物の作出に伴い、これを活用した食品開発へ発展させる予定である。

課題 5 : カシスアントシアニンの健康機能とこれを高含有する作物の開発

ーアントシアニンの生合成経路および制御機構の解明ー

担当 : 吉村和也

カシス (*Ribes nigrum* L.) は、温帯性の落葉低木で、バラ目、スグリ科、スグリ属に分類される。カシス果実は豊富なアントシアニン (植物色素で、食品着色にも利用される成分のこと) を含有する。その含有量はブルーベリーよりも高く、主に 4 種のアントシアニンを含む。この中でルチノース配糖体のアントシアニンはカシス果実に特異的で、視覚機能の改善効果などの多機能性が期待されている。アントシアニンの生合成酵素、液胞への輸送体およびそれらの発現制御に関わる転写因子については、いくつかの植物におけるそれらの分子特性が明らかにされているが、カシスにおける情報は全くない。したがって、なぜ同果実が多様な健康機能が期待されるルチノース配糖体のアントシアニンを蓄積できるのか? についてはまったく不明である。そこで本研究では、カシスアントシアニンの生合成経路およびその制御機構を明らかにすることを目的とし、それらに関連する因子をコードする遺伝子の同定を試みた。果実の収穫時期である 7 月にサンプリングしたカシス (*Ribes nigrum* L. Champion) の成熟葉では若葉より多量のアントシアニンを蓄積していることを確認した。そこで、サブトラクティブハイブリダイゼーション法により成熟葉と若葉間で発現量に変化のある遺伝子を選抜し、シークエンス解析を行った。その結果、これまでに成熟葉に特異的に発現している 12 種類の遺伝子が同定された。現在、さらなる遺伝子の選抜を行っている。

課題 6 : 環境高感受性シロイヌナズナを用いた細胞分化抑制

低分子化合物のスクリーニングと作用機作の解明

ーシロイヌナズナを用いたスクリーニングと阻害物質の解析ー

担当 : 町田 千代子

地球上には、様々な生物が生育しており、それらは、生命体として共通の機構を持っている。これまでに、我々の研究から、植物を用いて細胞分化に影響を与える低分子化合物が同定されたが、それらの物質は、動物細胞にも影響を与えることがわかっている化合物が大部分であることが明らかになった。この事は、動物と植物の分化には、何らかの共通のメカニズムが関与していることを示唆している。しかしながら、動物と植物の細胞分化の共通性についての研究は極めて少ないのが現状である。そこで、本研究プロジェクトにおいては、植物を用いた分化阻害物質の作用機作の解明にとどまらず、動物細胞の増殖と分化の阻害物質の解析、バイオインフォマティクスの手法を用いた解析をする異分野融合型研究をめざした。本プロジェクトでは、ケミカルバイオロジーの手法を駆使して、細胞分化抑制低分子化合物の作用機作を解明することにより、動物と植物の細胞分化の共通の分子的基盤の理解を深めることを目的として研究を行った。

シロイヌナズナの環境高感受性変異株を用いて、葉の分化に特異的に阻害効果をもつ天然物由来の低分子化合物を約 2000 種スクリーニングした結果、葉の特定の時期の分化に阻害効果をもつアルカロイド化合物など 9 種の低分子化合物を同定した。そこで、アルカロイド化合物のひとつであるベルベリンについて、その作用機作をさらに解明した。ベルベリンに構造的に類似している化合物にも阻害効果があることがわかった。ベルベリンはオウレンなどの植物由来のベンジルイソキノリンアルカロイドの 1 種である。もともと DNA に結合することが知られており、ゲノム上に点在する 2 次構造の一種である G-quadruplex のリガンドとしての報告もある。ベルベリンはすでに車研究グループにより動物細胞の分化に影響を与えることがわかっている低分子化合物であり、植物における作用機作との関連についても興味深い。これらの研究成果は、本プロジェクトの共同研究の成果としてまとめ、海外の学会等で発表し、現在、論文投稿準備中である。

課題 7 : 環境高感受性シロイヌナズナを用いた細胞分化抑制 低分子化合物のスクリーニングと作用機作の解明

—動物細胞の増殖と分化の調節物質の解析—

担当 : 車 炳允

骨は骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞のリモデリングによって恒常性が保たれ、正常な状態で維持されている。しかし、そのバランスが崩れると、過剰な骨吸収によって骨量が減少し骨粗鬆症が引き起こされる。しかし、加齢や炎症などにより骨形成が追いつかず細胞間のバランスが崩れると、過剰な骨吸収によって骨量が減少し骨粗鬆症が引き起こされる。現在の骨粗鬆症の主な治療薬は、骨吸収抑制剤であるが、その投与方法や、副作用、有効性において多くの課題が残されている。骨折の予防が期待される骨形成促進低分子化合物の開発が求められている。そこで、本研究では、骨粗鬆症の予防や改善に応用する機能性食品素材を開発するために、天然由来低分子化合物から破骨細胞分化と機能に作用する物質を探索した。その結果、生薬として用いられている草のオウレンから単離されるアルカロイド化合物であるベルベリンを見出した。ベルベリンは破骨細胞の前駆細胞の細胞生存率に影響を与えず、破骨細胞の分化を抑制した。ベルベリンは、町田らにより、シロイヌナズナの葉の分化阻害を引き起こすことが示されており、その作用機作の共通性についても今後明らかにすることが重要である。一方、骨芽細胞の分化を促進する化合物の探索も行った。その結果、ショウガ科ハナミョウガ属の多年生常緑草本の一種から細胞の生存率に影響を与えず ALP 活性を高める化合物を見出した。現在構造解析と作用解析を行っている。

課題 8 : 環境高感受性シロイヌナズナを用いた細胞分化抑制 低分子化合物のスクリーニングと作用機作の解明

—新規情報検索システムによる制御因子の検索—

担当 : 高橋 広夫

従来、生物のゲノムにおける 2 次構造の一種である G-quadruplex は、テロメアに存在し、テロメラーゼと結合すると考えられていたが、近年の研究から、テロメアだけでなく、ゲノムワイドに存在し、様々な遺伝子のの上流に位置し、その遺伝子の転写制御に関わることが分かって来た。例えば、がん遺伝子である c-myc の上流にも、G-quadruplex が存在し、G-quadruplex の転写制御を受けていることが示唆されており、G-quadruplex に結合するリガンドを探索することが、抗がん剤の開発に繋がるのではな

いかという期待から、ヒトにおける G-quadruplex は、精力的に、研究されており、ヒトだけでなく酵母・大腸菌に関しても、様々な研究がされているが、植物での G-quadruplex の研究はまだあまり進んで無い。これまでの町田らの実験から、ベルベリンがシロイヌナズナの葉の表側分化を特異的に阻害することがわかった。オウレンなどの植物由来のアルカロイドの一種であるベルベリンは、G-quadruplex と相互作用することが報告されている。ベルベリンによる細胞分化阻害の原因の一つとして、ゲノム上のある特定の G-quadruplex にベルベリンが結合することによる可能性が考えられた。しかしながら、シロイヌナズナの G-quadruplex の解析例はなく、遺伝子と G-quadruplex 領域の位置関係の情報は全く報告がなかった。

本研究では、バイオインフォマティクスの観点から、シロイヌナズナのゲノムワイドな G-quadruplex 探索と、遺伝子と G-quadruplex 領域の位置関係に基づく新しい分類法を開発し応用した。また、代表的な生物種 7 種類(イネ、ヒト、線虫、大腸菌、ショウジョウバエ、酵母、ゼブラフィッシュ)を選び、同様の解析を行い、シロイヌナズナとの比較を行った。この結果、G-quadruplex 領域が、植物ゲノムの上流相補鎖に集積していること、転写制御に関する Gene ontology と G-quadruplex の集積と相関が見られること、という新しい 2 つの現象を見いだした。この発見については論文を投稿準備している段階である。