

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06133

研究課題名(和文)新規分泌阻害剤の標的分子の探索によるゴルジ体維持と分泌に重要な因子の同定

研究課題名(英文)A bisindole-containing compound affects the proper function of Rab6, resulting in Golgi disruption and secretion inhibition

研究代表者

佐藤 あやの (SATO, AYANO)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・准教授

研究者番号：40303002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分泌を阻害するビスインドール含有化合物を見出した。分泌阻害剤は膜輸送の分子機構の解明に寄与していることから、この分泌阻害剤(Bisindole)の特性を明らかにした。Bisindoleは、既知の分泌阻害剤である Brefeldin A や Golgicide A と同様にゴルジ体を破壊する。既知の分泌阻害剤がグアニンヌクレオチド交換因子を膜に捕捉して作用するのに対し、Bisindoleはしなかった。Rab6a/a'やダイニンを枯渇させると、Bisindoleの細胞内作用が中和されることから、微小管に依存するRab6を介した輸送経路に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体が存在しなければ、生命活動維持に必須である分泌などの細胞内輸送や翻訳後修飾は正常に行われないが、ゴルジ体が存在するための複雑な仕組みの多くは未だ解明されていない。ゴルジ体の維持と分泌能の調節にゴルジタンパク質が機能することを明らかにしてきたが、その過程で独自のスクリーニングにより、分泌を阻害する化合物を見出した。この化合物は、既知の分泌阻害剤などと同様にゴルジ体を破壊し分泌を阻害したが、既知の分泌阻害剤の標的が異なること、ゴルジ体のみならず小胞体出口部位の移動に影響を与えることを示した。このことは、ゴルジ体を維持し分泌を行うためには小胞体出口部位の移動が重要であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We prepared and screened reaction mixtures of pooled substrates and found a bisindole-containing compound that inhibits secretion. Since secretion inhibitors have been contributed to uncovering molecular mechanisms underlying membrane trafficking, here we characterized this secretion inhibitor, named Bisindole. Bisindole disrupts the Golgi as other known secretion inhibitors, such as brefeldin A and golgicide A do. While other known secretion inhibitors act by trapping a guanine nucleotide exchange factor on membranes, Bisindole acts differently. Depletion of Rab6a/a' or dynein neutralizes the cellular effects of Bisindole, unlike those of brefeldin A, suggesting that Bisindole may affect the Rab6-mediated transport pathway, which is microtubule-dependent.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 分泌 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

細胞内で作られた全タンパク質のうち約 30% は、小胞体からゴルジ体を通る経路を経て、それぞれの最終目的地へと輸送される。ゴルジ体は、小胞体から送られたタンパク質の糖鎖などの翻訳後修飾を完了させ、それぞれの目的地への仕分けを行い、これらのタンパク質を送り出す。小胞体からゴルジ体までの輸送経路は、早期分泌経路と呼ばれ、輸送全段階における律速段階と考えられている。それゆえ、この経路を理解することは、生物工学的に分泌を制御する方法を探索する上で、また、基礎生物学的理解を深めるためにも非常に重要であるが、未だ不明な点が数多く残されている。

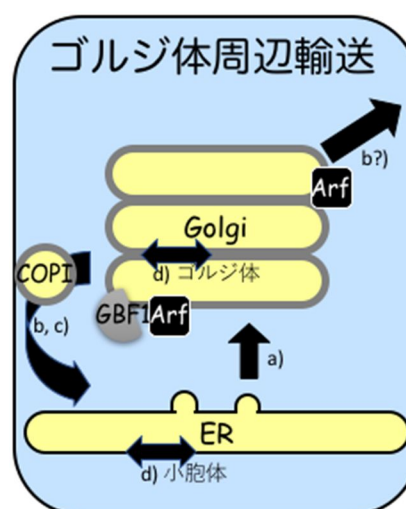
これらの不明な点を明らかにするために、これまでにいくつかの薬剤が利用されてきた。その代表的なものにプレフェルジン A (以下 BFA) がある。BFA は、菌類由来のラクトン型化合物であり、当初、細胞の増殖阻害、つまり抗がん剤としての利用が期待された物質である。BFA は、ゴルジ体において COPI (coat protein I) 被覆小胞という輸送小胞を作るのに必須な GTP 加水分解酵素である Arf の活性を調節するタンパク質の一つ GBF1 (Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1) に作用する。具体的には、BFA-GBF1-Arf の複合体が形成され、通常の GTP 加水分解が阻害されることによって、1) COPI 小胞が正常に形成されなくなる、2) COPI 被覆がゴルジ体から剥がれ落ちることによりゴルジ体と小胞体が非特異的な融合を起こし、ゴルジ体が崩壊すると考えられている。BFA がゴルジ体を破壊し分泌を阻害することは古くから知られていたが、近年の BFA の研究利用により、その標的である GBF1 の機能が明らかになり、GBF1 による Arf の加水分解活性化のメカニズムが明らかになった。つまり、分泌阻害剤の作用機序を追求することによって、“輸送(分泌)”という生物学的現象の分子機構の一端が明らかになった一例と言える。したがって、新たな分泌阻害剤を見出し、その作用機序を明らかにすることは、新たな“輸送調節”の分子メカニズムの解明に通じる可能性がある。

2. 研究の目的

新たに合成した化合物のスクリーニングにより、分泌を阻害する新規の化合物を見出した (以下この化合物を BIS とする)。未発表のため、ここでの詳細な記述は避けるが、BIS は含フッ素複素環低分子量化合物であり、既知の分泌阻害剤と構造的類似性はない。予備実験により、BIS は既知の分泌阻害剤である BFA、ゴルジサイド A、Exo2、LG186 と同様にゴルジ体を破壊し分泌を妨げたが、これらの既知の分泌阻害剤の標的である GBF1 には作用しない可能性が非常に高いことが示された。このことは、ゴルジ体を維持し分泌を行うためには、GBF1 以外にも重要な因子があり、BIS はその因子に作用することを示唆する。本研究は、新規分泌阻害剤 BIS の標的を突き止め、その作用機序を明らかにすることによって新規の分泌機構の存在の解明を目的とした。

3. 研究の方法

- BIS と既知の分泌阻害剤の効果を生化学的に比較し、GBF1 が BIS の標的ではないことを確認する。
- BIS がゴルジ体を特異的に破壊するかどうかを、他のオルガネラの形状を蛍光顕微鏡法を用いて調べることにより明らかにする。
- 順行輸送、逆行輸送などのゴルジ体周辺輸送 (右図、a~d) のうち、BIS によって最も阻害 (もしくは促進) される輸送経路を、蛍光顕微鏡 ライブイメージングを用いて明らかにする。
- BIS の標的を質量分析法によって同定する。



4. 研究成果

この分泌阻害剤 (BIS と命名) の特性を調べたところ、BIS は、他の既知の分泌阻害剤である BFA や GCA と同様にゴルジ体を破壊することが明らかになった (予備実験の確認)。他の既知の分泌阻害剤がグアニンヌクレオチド交換因子を膜に捕捉して作用するのに対し、BIS 作用の作用機序は異なることが示された。Rab6a/a' やダイニンを枯渇させると、BIS の細胞内作用が中和されることから、

BIS は微小管に依存する Rab6 を介した輸送経路に影響を与える可能性が示唆された。ゴルジ体における糖鎖修飾酵素の適切な再分配には、Rab6 を介したゴルジ体常在タンパク質の逆行輸送が必要と考えられており、小胞体からのカーゴの出口における Rab6 の関与が示唆されていることから、本化合物は、糖鎖修飾と小胞体とゴルジ体間の輸送の研究に有用である可能性があることが示唆された。

BISスクリーニング論文: High-throughput screening of bioactive compounds via new catalytic reaction in the pooled mixture、*Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Oct 1;29(19):126539. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.06.061.

BIS 合成法特許等: 特許第 6263814 号、特許第 6263815 号

BIS 特長付論文: 投稿準備中

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Satoh Ayano, Hayashi-Nishino Mitsuko, Shakuno Takuto, Masuda Junko, Koreishi Mayuko, Murakami Runa, Nakamura Yoshimasa, Nakamura Toshiyuki, Abe-Kanoh Naomi, Honjo Yasuko, Malsam Joerg, Yu Sidney, Nishino Kunihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 The Golgin Protein Giantin Regulates Interconnections Between Golgi Stacks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2019.00160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Satoh Ayano, Nishina Yuta	4. 巻 29
2. 論文標題 High-throughput screening of bioactive compounds via new catalytic reaction in the pooled mixture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126539 ~ 126539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.06.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe-Kanoh Naomi, Kunisue Narumi, Myojin Takumi, Chino Ayako, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Satoh Ayano, Moriya Hisao, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Yeast screening system reveals the inhibitory mechanism of cancer cell proliferation by benzyl isothiocyanate through down-regulation of Mis12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45248-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mori Yoshihiro, Yoshida Yuki, Satoh Ayano, Moriya Hisao	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61646-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hassan Ghmkin, Afify Said M., Nair Neha, Kumon Kazuki, Osman Amira, Du Juan, Mansour Hager, Abu Quora Hagar A, Nawara Hend M, Satoh Ayano, Zahra Maram H., Okada Nobuhiro, Seno Akimasa, Seno Masaharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Hematopoietic Cells Derived from Cancer Stem Cells Generated from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 82 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12010082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Taha Eman, Sogawa Chiharu, Okusha Yuka, Kawai Hotaka, Oo May, Elseoudi Abdellatif, Lu Yanyin, Nagatsuka Hitoshi, Kubota Satoshi, Satoh Ayano, Okamoto Kuniaki, Eguchi Takanori	4. 巻 12
2. 論文標題 Knockout of MMP3 Weakens Solid Tumor Organoids and Cancer Extracellular Vesicles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1260 ~ 1260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura Shinsuke, Morimoto Yuji, Tsujimoto Hironori, Arake Masashi, Harada Manabu, Saitoh Daizoh, Hara Isao, Ozeki Eiichi, Satoh Ayano, Takayama Eiji, Hase Kazuo, Kishi Yoji, Ueno Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Highly reliable, targeted photothermal cancer therapy combined with thermal dosimetry using a near-infrared absorbent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66646-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Hirofumi, Takayama Eiji, Satoh Ayano, Into Takeshi, Adachi Masanori, Ekuni Daisuke, Yashiro Koji, Mizuno?Kamiya Masako, Nagayama Motohiko, Saku Seitara, Tomofuji Takaaki, Doi Yutaka, Murakami Yukitaka, Kondoh Nobuo, Morita Manabu	4. 巻 -
2. 論文標題 Horseradish peroxidase interacts with the cell wall peptidoglycans on oral bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.9016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Paneer Selvam Karthik, Nagahata Taichi, Kato Kosuke, Koreishi Mayuko, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Nishikawa Takeshi, Satoh Ayano, Hayashi Yasuhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Synthesis and characterization of conductive flexible cellulose carbon nanohorn sheets for human tissue applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40824-020-00194-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura Kota, Maki Yuta, Okamoto Ryo, Satoh Ayano, Kajihara Yasuhiro	4. 巻 143
2. 論文標題 Glycoprotein Semisynthesis by Chemical Insertion of Glycosyl Asparagine Using a Bifunctional Thioacid-Mediated Strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10157 ~ 10167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c02601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano Hisato, Suematsu Yoshitaka, Takuma Megumi, Aoki Shimpō, Satoh Ayano, Takayama Eiji, Kinoshita Manabu, Morimoto Yuji, Takeoka Shinji, Fujie Toshinori, Kiyosawa Tomoharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhanced cellular engraftment of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids by using nanosheets as scaffolds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93642-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagahata Taichi, Tsujino Yoshio, Takayama Eiji, Hikasa Haruka, Satoh Ayano	4. 巻 16
2. 論文標題 Evaluation of skin sensitization based on interleukin γ 2 promoter activation in Jurkat cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2021.1486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Yujia, Myojin Takumi, Li Kexin, Kurita Ayuki, Seto Masayuki, Motoyama Ayano, Liu Xiaoyang, Satoh Ayano, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 23
2. 論文標題 A Major Intestinal Catabolite of Quercetin Glycosides, 3-Hydroxyphenylacetic Acid, Protects the Hepatocytes from the Acetaldehyde-Induced Cytotoxicity through the Enhancement of the Total Aldehyde Dehydrogenase Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1762 ~ 1762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ayano Satoh, Takuto Shakuno, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiko Nishino
2. 発表標題 ゴルジ体ゾーンの形成にゴルジタンパク質であるGiantinは関与するか
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Satoh, Yuuya Yoshii, Mayuko Koreishi
2. 発表標題 コレラトキシンBサブユニットを利用した機能性ペプチドの小胞体への特異的送達法の開発
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Satoh, Yuuya Yoshii, Mayuko Koreishi
2. 発表標題 コレラトキシンBサブユニットを利用した機能性ペプチドの細胞小器官への送達
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Satoh, Kyohei Kusumoto, Shoko Ueki
2. 発表標題 赤潮原因藻ヘテロシグマのバイオテクノロジー的利用をめざした遺伝子導入法の検討
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 浩介、辻野 義雄、佐藤 あやの
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎惹起性の評価のための細胞アッセイの確立
3. 学会等名 シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanami Nakayama, Ayano Satoh, Shoko Ueki
2. 発表標題 Reporter Gene Expression in Heterosigma akashiwo which is a Causative Organism of the Harmful Algal Bloom
3. 学会等名 CELL BIO virtual 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanami Nakayama, Ayano Satoh, Shoko Ueki
2. 発表標題 Gene Manipulation Techniques in Heterosigma Akashiwo, a Causative Organism of Harmful Algal Blooms
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山七海、植木尚子、佐藤あやの
2. 発表標題 赤潮原因種Heterosigma akashiwoの遺伝子操作技術
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 浩介、辻野 義雄、佐藤 あやの
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎惹起性評価のための試験法の確立
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 浩介、辻野 義雄、佐藤 あやの
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎惹起性の評価のための動物実験代替法の確立
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第33回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤あやの
2. 発表標題 ゴルジ体の構造と糖鎖構造には関係があるのか？
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤あやの
2. 発表標題 ゴルジタンパク質である Giantin はゴルジ体ゾーンの形成に関与するか?
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤あやの
2. 発表標題 ゴルジタンパク質、Giantinの欠失細胞におけるゴルジ体の三次元構造解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayano Satoh, Takuto Shakuto, Mitsuko Hayashi-Nishino, Kunihiro Nishino
2. 発表標題 ゴルジタンパク質群のゴルジ体の形成への寄与
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤あやの
2. 発表標題 ゴルジ体の構造変化により糖鎖修飾は変化するのか?
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真木勇太、佐藤あやの、川田一希、岡本亮、梶原康宏
2. 発表標題 複合型糖鎖を有するCholera Toxin B-Subunitの化学合成と生細胞への導入
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞内におけるタンパク質や脂質の集配所?! ゴルジ体での積荷仕分けシステムと
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id663.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関