

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19580098
 研究課題名 (和文) ゴルジ膜構造体の構築・維持機構のケミカルバイオロジー的解析
 研究課題名 (英文) Chemical Biology of Golgi Membrane Dynamics
 研究代表者
 高月 昭 (TAKATSUKI AKIRA)
 法政大学・生命科学部・教授
 研究者番号： 80011972

研究成果の概要(和文)： ゴルジ膜構造体はダイナミックな平衡で特異な構造を維持している。膜構造体の構築と維持の機構を明らかにする目的で、ゴルジ膜構造体ダイナミクス作用物質を探索した。細胞周期の分裂期への移行の阻害剤やアポトーシス誘起剤の中にゴルジダイナミクス作用物質を見いだした。これら化学物質の作用解析の結果から中心体への作用が示され、中心体がゴルジ膜構造体の構築と維持に中心的な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The Golgi maintains its characteristic structure by a dynamic equilibrium manner, but this mechanism remains to be clarified. Chemicals affecting Golgi membrane dynamics were found at a relatively high ratio among those known to affect transition to mitotic phase of cell cycle and induce apoptosis. Results indicating that they act on the centrosome suggest that the centrosome plays important roles in the control of Golgi membrane dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 農芸化学・応用微生物学

キーワード： ゴルジ, 抗生物質, ケミカルバイオロジー, 中心体, 微小管, 膜ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ装置は核近傍に係留された槽状構造を有する膜構造体である。ゴルジ槽は機能的にシス, メディアル, トランス, トランスゴルジ網に区別され, 各槽に局在する複合糖質糖鎖合成酵素の働きでシスからトランスに輸送される過程で糖鎖の合成が完成し, 輸

送物質はトランスゴルジ網で仕分けされて予め定められた機能発現の場に運ばれるという重要な機能を司っている。しかし, ゴルジ膜構造は一旦形成されると恒常的に維持されているわけではなく, ダイナミックな膜構造体である。極端な例では 10 分間にゴルジの全蛋白質量と等しい量の輸送蛋白質が

出入りしているにも関わらずその構造の恒常性が保たれている。また、細胞分裂期にゴルジ膜構造は断片化されて娘細胞に等分に分配された後に速やかに再構築される。ゴルジ装置の断片化は細胞分裂期への移行に必須であること、多様な細胞内情報伝達分子がゴルジに存在すること、アポトーシス初期にゴルジ膜構造の異常が誘起されること等々から、当初に考えられていた機能以外の細胞生理にとって重要な機能を担っていると考えられるに至っている。ゴルジ膜構造体の構築と維持の機構は殆ど分かっていないが、これらの機構を明らかにすることによって細胞生理においてゴルジ装置が司っている機能について新しい展開が出来ると考えた。

2. 研究の目的

生命反応に薬剤は医薬としてのみならず、生命機能を解析するプローブとして多大の貢献をしてきた。しかし、ゴルジ装置のダイナミクスに作用する薬剤は非常に限られており、加えて、その大部分がゴルジ膜構造の破壊物質である。このような現状を鑑みて、多種多様な物質を対象として探索を行い、ゴルジ膜構造の破壊のみならず、ゴルジ膜構造破壊抑制やゴルジ膜構造再構築に作用する物質も含めたゴルジ装置ダイナミクス作用物質ライブラリーを構築する。次いで、これら薬剤のゴルジ装置ダイナミクスへの作用を解析するというケミカルバイオロジー的手法を用いて、ゴルジ膜構造体の構築と維持の機構についての知見を得る。

3. 研究の方法

ゴルジ装置ダイナミクスが顕著に認められるのは細胞分裂期である。細胞周期を細胞分裂期に揃える手段として、同調培養細胞を用いる方法やアフリカツメガエル卵母細胞抽出物で処理して細胞分裂を誘起する方法が一般的であるが、ダイナミクスの局面を解析できるまでに時間と労力がかかる難点がある。そこで、ブレフェルジンAとノコダゾールという全く異なる機構でゴルジ膜構造を破壊する薬剤を利用した。ブレフェルジンAは小G蛋白質の一種であるADPリボシル化因子(ARF)の特定の因子のGDP/GTP交換反応を阻害し、ノコダゾールは微小管構成蛋白質であるチューブリンの重合を阻害することが知られている。これら薬剤で培養細胞を処理すると、前者では約5分、後者では約25分でゴルジ膜構造はほぼ全ての細胞で完全に破壊される。また、これらの作用は可逆的で、薬剤を除去すると1時間以内に元の膜構造体が再構築される。従って、短時間に効率良くゴルジ膜構造体の構造維持と構築を追跡できた。

ゴルジ膜構造や関連する細胞小器官の構

造への作用は、蛍光抗体やその他の蛍光標識プローブを用いて蛍光染色することによって定性的、並びに、定量的に追跡した。主に、ゴルジ装置マーカー蛋白質については、GM130, p115, GRASP55, ManII, TGN38, 並びに、 β -COPに対する抗体や、シス・ゴルジ槽特異な糖蛋白質糖鎖構造を認識する *Helix pomatia* 由来のレクチン(HPL)を、細胞骨格である微小管と微小繊維については、各々、抗チューブリン抗体とファロイジンを、中心体については抗 γ -チューブリン抗体を、ミトコンドリアについてはマイトトラッカーを用いて蛍光染色を行った。必要に応じてこれらを組み合わせた二重染色を行った。

被験薬は入手量と溶解度を考慮しながら極力高濃度からの段階希釈を行ってゴルジ装置ダイナミクスへの作用を検討した。なお、第1段階の探索では全て3時間の前処理を行った。

4. 研究成果

(1) ゴルジ装置ダイナミクス作用物質の探索

微生物は多様な生理活性物質を生産することから、まず、微生物培養抽出物を用いてブレフェルジンAとノコダゾールのゴルジ膜構造破壊作用に及ぼす影響を調べた。顕著な活性を示した微生物については大量培養を行って活性物質の単離構造を決定した。その結果、アポトーシスを誘起する作用が報告されている既知物質が多く同定された。そこで、類似の作用を有することが報告されている化学物質に加え、ゴルジ装置ダイナミクスと細胞分裂は密接な関係にあることから、細胞周期のG2期からM期への移行に作用することが報告されている化学物質についてもゴルジ装置ダイナミクスへの作用を検討した。

(2) ゴルジ膜構造破壊抑制作用の解析

探索ではブレフェルジンAとノコダゾールによるゴルジ膜構造体破壊への作用を一定の条件で検討しただけなので、その詳細を検討した。その結果、ブレフェルジンAのゴルジ装置破壊作用のみを抑制する活性物質、ノコダゾールのゴルジ装置破壊作用のみを抑制する活性物質、両者の作用を抑制する活性物質の3群に分類されたが、両者の作用を抑制する活性物質の頻度が最も高かった。

ゴルジ装置が核近傍に係留されている理由として、細胞分裂期に分散したゴルジ装置構成蛋白質が微小管の上を核に密接した微小管形成中心(中心体)に向かって輸送された後にゴルジ膜構造体が形成されるためであると信じられ、事実、ノコダゾールで微小管を破壊するとゴルジ装置はベシクル化して細胞質中に分散する。また、ゴルジ装置には微小管結合蛋白質が存在することが報告

されている。しかし、ノコダゾールで微小管を完全に破壊した条件下でもゴルジ膜構造破壊を抑制する作用物質が数多く見いだされたことは、ゴルジ装置の核近傍係留は微小管のみに依存するものではないことが明らかになった。

ほぼ全ての活性物質について、前処理なしで、あるいは、30分から60分程度の前処理で活性が発現されることが示された。アポトーシスが検出されるまでには時間がかかるが、短時間でゴルジ膜構造破壊の抑制作用が発現されることから、アポトーシスと関連する場合、その初期に関与していることが考えられる。

全ての活性物質は単独で処理した場合にゴルジ膜構造の異常が認められたことから、ゴルジ膜構造破壊の抑制のみならずゴルジ装置ダイナミクスに作用することが示された。また、ゴルジ膜構造破壊抑制が認められるよりも高濃度で、少数ではあるが、プレフェルジンAと同様にゴルジ局在蛋白質を細胞質全体に分散させる作用が認められた。これら新規なゴルジ構造破壊作用はゴルジ装置研究に有用であると考え、これらの作用については更なる解析を加える予定である。

(3) ゴルジ装置マーカー蛋白質間のゴルジ膜構造破壊物質に対する感受性の比較

TGN38は他の槽に存在するマーカー蛋白質よりもプレフェルジンAに対する感受性が低いことを認めていた。ゴルジ装置各槽のゴルジ膜構造破壊物質への感受性を明らかにすることによってゴルジ装置の構造維持の機構に関する知見が得られることが期待される。そこで、各種マーカー蛋白質についてゴルジ膜構造破壊物質に対する感受性の差異を比較検討した。

通常用いられているプレフェルジンAの濃度ではゴルジ装置核槽に存在するマーカー蛋白質はTGN38を除いて全て5分以内に逆行されるために感受性の差を追跡することが困難であるので、より低濃度の至適濃度を決定し、それを挿む2点の濃度を加えた3点の濃度で同時に感受性を追跡した。

各マーカー蛋白質のプレフェルジンA感受性を比較検討した結果は以下の不等式で示される。

$$P115 \geq GM130 \geq GRASP55 > HPL \text{ 反応性蛋白質} > \text{ManII} > \beta\text{-COP} \gg \text{TGN38}$$

GM130とp115はシス槽膜表在性蛋白質でHPL反応性蛋白質はシス槽膜内在性蛋白質、GRASP55はメディアル槽膜表在性蛋白質でManIIはメディアル槽膜内在性蛋白質、TGN38はトランスゴルジ網膜内在性蛋白質である。従って、同じ槽に存在するマーカー間では

膜表在性蛋白質>膜内在性蛋白質

膜表在性蛋白質あるいは膜内在性蛋白質間では

シス槽>メディアル槽>>トランスゴルジ網

という規則性を認めた。 β -COPは輸送被覆小胞の構成成分で、その機能の上からもシス槽、メディアル槽、トランス槽、更には、トランスゴルジ網にも存在するために、膜表在性蛋白質であるにもかかわらずメディアル膜内在性のManIIよりもプレフェルジンA感受性が低い結果になったと考えられる。プレフェルジンAに似たゴルジ膜構造破壊パターンを示すことを新たに見いだした活性物質についても検討を加えた結果、同様の感受性の規則性が認められた。

本実験条件下でTGN38で標識されるトランスゴルジ網の完全な消失は認められず、中心体あるいはそれに近接した場所にコンパクトなTGN38染色像が観察された。詳細な解析は加えていないが、細胞分裂期におけるゴルジ装置ダイナミクスにおいてもゴルジ膜構造破壊物質を作用させた場合と同様な感受性の差異を認めている。細胞分裂期やゴルジ膜構造破壊物質の作用に際してトランスゴルジ網が最も感受性が低く、且つ、その一部が中心体と近接して残ることから、ゴルジ膜構造体の構築と維持に中心体が関わっている可能性を提唱したが、本結果からも支持される。以下に、中心体の機能を念頭においた研究成果について述べる。

(4) ゴルジ膜構造破壊抑制物質の中心体機能への影響

中心体は微小管形成中心とも呼ばれるように微小管のヌクリエーションを司っている。ヌクリエーション活性が細胞分裂時に強まることが証明されているが、本活性の増強は紡錘糸形成のみならずゴルジ膜構造再構築のためのコア維持の観点からも都合が良いと考える。中心体がゴルジ装置ダイナミクスに関わっていることを示すためには、ゴルジ膜構造破壊抑制物質が中心体に作用していることを明らかにする必要がある。

微小管の重合抑制剤であるノコダゾールと重合促進剤であるパクリタクセルの特異な作用を組み合わせることによって中心体の微小管ヌクリエーション活性の強さを検討する実験系を構築している。ノコダゾールで微小管を破壊した後にパクリタクセルを添加すると細胞質全体に多数の短い微小管アスターが形成され、中心体にオーガナイズされたアスターは顕著でない。それに対して、プレフェルジンAとノコダゾールによるゴルジ膜構造体の消失を共に抑制する作用物質で処理した場合には、細胞質アスターの形

成は少なく、顕著な中心体にオーガナイズされたアスターの形成を認めた。また、中心体アスター形成の強さとゴルジ膜構造破壊抑制の強さとの間で相関が認められた。更に、ブレフェルジンAあるいはノコダゾールによるゴルジ膜構造破壊のいずれか一方の破壊しか抑制しない作用物質では中心体アスター形成の増強は認められない。中心体に作用するゴルジ膜構造破壊抑制物質のみがブレフェルジンAとノコダゾールの両方の作用を抑制する、換言すると、これらの薬剤で中心体の機能が影響を受けるとゴルジ膜構造はブレフェルジンAやノコダゾールの作用に耐性になるといえる。

以上の結果から中心体の微小管ヌクリエーション活性の昂進が示されたが、ゴルジ装置ヌクリエーション活性の昂進についての知見を得るために、ノコダゾールで分散させたゴルジ膜ベシクルのノコダゾール存在下での挙動を追跡した。対照ではゴルジ膜ベシクルは細胞質に分散したままであるのに対し、ゴルジ膜構造破壊抑制活性が顕著な作用物質の存在下では核近傍にチューブ状のゴルジ構造体が形成されることを認めた。しかし、中心体近傍のコンパクトな構造体形成は少なかったため、中心体とゴルジ膜構造との間の直接的な関係について以下に検討した。

(5) ゴルジ膜構造体と中心体とを結ぶチューブ状構造体

ゴルジ装置と中心体の細胞内での位置関係は、両者が重なっている細胞と異なる位置関係にある細胞が存在する。後者の細胞では、ゴルジ装置が核の一箇所に存在するもの、2つに分かれているもの、核を取り囲むようにしているものに大別できる。各種抗体で蛍光標識したゴルジ装置を精査すると、ゴルジ装置と中心体が重なっていない細胞では両者を結ぶチューブ状の構造体が観察された。更に、本チューブ状構造体は前記大別に応じて中心体からゴルジ装置が存在する方向に向かってのみ延びていることを認めた。従って、この新規なチューブ状構造体を介してゴルジ膜構造体と中心体は結合されている、即ち、ゴルジ装置と中心体の間には直接的な関係が存在すると考えられ、本チューブ状構造体について更なる解析を行うことによってゴルジ装置ダイナミクス機構についての新展開が期待される。

(6) 中心体の二極化とゴルジ装置ダイナミクスの関係

中心体二極化と微小管ダイナミクス、微小管ダイナミクスとゴルジ装置ダイナミクスは、各々、密接な関係にあるが、ゴルジ装置ダイナミクスと中心体二極化については、細胞分裂時にゴルジ装置断片化が中心体二極化に必要であることが報告されているのみ

である。本研究で探索されたゴルジ膜構造破壊抑制物質のいくつかのグループの物質が、細胞分裂時の中心体二極化に伴う核膜や微小管の破壊や染色体の凝集を伴うことなく、中心体の二極化を誘導することを認めた。中心体二極化に伴ってゴルジ膜構造体もほぼ等分されて二極化されたことから、ゴルジ膜構造体と中心体は密接な関係にあると考察された。

(7) ゴルジ膜構造体の再構築と中心体

細胞分裂後のゴルジ膜構造体再構築における中心体の機能に関する知見を得る目的で、ブレフェルジンAや新たに見いだしたゴルジ膜構造破壊物質でゴルジ装置を破壊、これら薬剤除去後のゴルジ膜構造体再構築を経時的に追跡した。ゴルジ膜構造体再構築初期に中心体を取り囲むチューブ状の膜構造体が形成されることを認めた。この過程を更に詳細に検討することによって、ゴルジ膜構造体の再構築に果たす中心体の機能についての新知見が得られると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高月 昭(TAKATSUKI AKIRA)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：80011972