

辻本細胞生化学研究室

Cellular Biochemistry Laboratory

主任研究員 辻本 雅文
TSUJIMOTO, Masafumi

当研究室では特定の病態に関して、その発症に関与したり、治療に役立ちうるなどの興味深い生物活性を示す新規タンパク質を遺伝子工学的手法を駆使して探索、同定し、その構造と機能および作用機構を明らかにすることで、最終的には創薬研究に結びつくことを目指した研究を行っている。本年度は(1)破骨細胞分化因子、アクチビンなどの多機能性サイトカインの作用機構の解明、(2)小胞体アミノペプチダーゼ、内皮細胞特異的スカベンジャー受容体など、特定の“場”で作用するなどのユニークな性質を有する新規タンパク質の構造と機能(3)発生の初期過程において遺伝子の発現調節に関与する RNA 結合タンパク質の構造と機能、(4)生体膜脂質の動態解析とその制御タンパク質、(5)植物ホルモンの生合成および作用機構を主要テーマとして活動した。

1. 多機能性サイトカインの作用機構 (小川, 辻本)

アクチビンは、細胞の増殖・分化などの調節に働く多機能因子である。我々は、マウス脾臓 B 細胞におけるアクチビンおよびその関連遺伝子の発現と、免疫応答にともなうその変化について検討した。マウス脾臓 B 細胞はアクチビンおよびアクチビン結合タンパク質であるフォリスタチンの mRNA を発現しており、これらの発現は、B 細胞の活性化にともなって著しい変化を起こす事が明らかになった。LPS によってポリクローナルに活性化した B 細胞は、アクチビン発現を増加させ、逆にフォリスタチン発現は減少させた。B 細胞の培養上清中のアクチビン活性も、LPS 刺激によって上昇した。これらの結果は、B 細胞は活性化にともない、アクチビンの産生を増加させると共に、その活性を阻害するフォリスタチンの産生を減少させる事により、正味のアクチビン活性を増加させている事を示唆している。このことは、免疫処置を施したマウスでは、未処置のマウスに比して、B 細胞のアクチビン発現が高く、フォリスタチン発現が低かった事からも支持された。

さらに、B 細胞は、アクチビン受容体の mRNA も発現しており、この発現は B 細胞の *in vitro* および *in vivo* での活性化によって減少することが明らかとなった。B 細胞はアクチビンの産生源であるとともにその標的である可能性が強く示唆された。単離したナイーブ B 細胞を、LPS 添加に先立って Activin A で刺激すると、LPS によって誘導される細胞増殖や IgG の産生が有意に増強されることが示された。これらの結果から、Activin A は、B 細胞の活性化にともなって産生され、B 細胞の増殖や抗体産生を通じて液性免疫に重要な役割を果たすサイトカインであることが強く示唆された。

2. 特定の“場”で作用する新規有用生理活性物質(タンパク質)の同定とその構造と機能解析 (辻本, 相川, 安達, 後藤¹, 秋山², 丸山², 服部³, 有坂⁴, 丹治⁴)

(1) アミノペプチダーゼ

Laeverin/aminopeptidaseQ は、新生児由来の絨毛外栄養膜細胞に特異的に発現する細胞表面抗原として単離された新規タンパク質である。cDNA クローニングの結果、Laeverin は、その 1 次構造から M1 アミノペプチダーゼファミリーに分類されたが、その後 Laeverin の生理機能のみならず、その酵素学的な特徴すら未だに明らかとされていなかった。そこで、Laeverin の生理機能を解明するため、バキュロウィルス発現系を用いて調製したヒトリコンビナント Laeverin の酵素学的性状の解析を行った。その結果、Laeverin は新規のペスタチン感受性ロイシンアミノペプチダーゼであること、胎盤に存在するペプチドホルモンである Angiotensin III、Endokinin-C、kisspeptin-10 を基質とし、これらペプチドのアミノ末端から塩基性アミノ酸や芳香族アミノ酸を遊離することなどが明らかになった。

これより、Laeverin が母子の境界領域でペプチドホルモンの分解を介し、それらの生物活性を調節することで、ヒトの胎盤形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

(2) スカベンジャー受容体

FEEL-1、FEEL-2 は酸化 LDL、グラム陰性、陽性の細菌、AGE (糖化後期生成物)、SPARC、Hsp70 等の動脈硬化や糖尿病、自然免疫に関与するようナリガンドを認識するマルチリガンド受容体である。FEEL の発現調節機構と細胞内局在機構について検討した。その結果 1) マウス腹腔マクロファージを M-CSF 存在下で培養することにより FEEL-1 の発現が誘導されること、2) FEEL-1 ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージとの比較により M-CSF により分化したマクロファージでは酸化 LDL やグラム陰性、陽性の細菌の結合に FEEL-1 が約 50% の寄与を示すことを明らかにした。さらに Yeast Two-Hybrid 法により FEEL-1 の細胞内ドメイン結合タンパク質を探索し、その候補タンパク質として sorting nexin 17 (SNX17) を同定し、SNX17 の PX (phox-homology) ドメインが FEEL-1 の細胞内ドメインのアミノ酸配列 NPVF に結合することを明らかにした。ファイバー改変アデノウィルスベクターを用いて SNX17 に対する miRNA を臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC に発現させることによりマルチリガンド受容体機能への影響を検討した結果、FEEL-1 をノックダウンしたときと同様にアセチル LDL や酸化 LDL の細胞内への取り込みは約 50% まで抑制された。SNX17 は early endosome における LDL 受容体や LRP (LDL receptor-related protein) のリサイクリングに寄与することが報告されている。FEEL-1 も SNX17 によって細胞内トラフィックを規定される新たなタンパク質であることを明らかにした。ヒトの動脈硬化巣や ApoE ノックアウトマウスの酸化 LDL 局在部位では FEEL-1 の高発現が認められる。これらの知見は FEEL-1 を介した脂質の細胞内輸送と病態との関連や生理機能を解明する上で重要な知見であると考えられる。

(3) ヘパラン硫酸・ヘパリンの生合成酵素 (NDST)

4 種類ある哺乳類 N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST) アイソザイムのヘパラン硫酸生合成への寄与を探索することを目的としている。まず、強制発現させた細胞中での発現部位の同定を試み、いずれもゴルジ体及びその近傍に局在することを明らかにした。さらに、構造活性相関を目指して、大腸菌を用いた組換え型 NDST の大量調整法を確立した。

また、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、線虫 NDST の変異体における時空間的特異的な発生異常の解析を行った。さらに、同変異体の表現型を回復させるのに必要な NDST 遺伝子のプロモーター領域を 680bp にまで絞り込んだ。

3. mRNA代謝調節にかかわるRNA結合タンパク質の機能解析研究(松本, 中村², 船越¹, 辻本)

動物細胞の mRNA は、細胞質で活発に翻訳されている状態あるいは翻訳が抑制された状態の平衡状態にあると考えられる。mRNA は常にタンパク質との複合体 mRNP として存在するので、mRNP を構成するタンパク質の変化が mRNA の翻訳活性や安定性に大きく影響する。我々はアフリカツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞を出発材料として用いて mRNP を構成するタンパク質の解析を行っている。卵母細胞で mRNP を構成する主要なタンパク質である FRGY2 と RNA を含む複合体を単離し、その構成タンパク質を同定した結果、P100 タンパク質を見いだした。今年度は、P100 の抗体を作製して機能解析を行った。P100 は卵母細胞の細胞質に存在したが、未受精卵や受精卵、初期胚になると発現が見られなくなった。卵母細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心法で分画すると mRNP 画分に存在し、また polyA をもつ RNA に結合することから、mRNP 因子であることがわかった。翻訳に対する P100 の効果を調べたところ、mRNA 選択的に翻訳を抑制する可能性が示された。

4. 生体膜脂質の動態とその制御タンパク質に関する研究 (長谷川, 金森⁵, 森川⁵, 辻本)

ホスファチジルセリンは生体膜の主要構成リン脂質で、主に形質膜の内層に局在しており、さらに細胞外からの刺激や細胞の状態に応じてその分布が変化することが知られている。我々は、形質膜におけるホスファチジルセリンの動態制御の分子機構を明らかにするために、脂質の膜間移行に異常があると推測される CHO-K1 細胞変異株を用いた解析を行っている。この変異株の原因遺伝子を同定するために、親株と変異株とで発現量に差がある mRNA をサブトラクション法によりスクリーニングした。それらの中には、形質膜に局在するもの・脂質結合性が報告されているもの・細胞内トラフィック関連分子・シグナル伝達関連分子・全く機能未知のものや仮想タンパク質が含まれていた。これらの候補因子の全長 cDNA を作製して発現ベクターに挿入し、そのプラスミドをリポフェクション法により耐性株に導入して発現させ、蛍光標識脂質の動態観察を行った。耐性株での蛍光脂質の動態異常を回復させるクローンを原因遺伝子の候補としてスクリーニングし、更なる解析を進めている。

5. 新規植物機能遺伝子の探索研究(藤岡, 瀬戸, 浅見⁶, 野地⁴, 早瀬⁴, 山本⁴, 北畑², 飯野⁵, 高橋⁷)

(1) ブラシノステロイドの生合成・代謝ならびにシグナル伝達機構に関する研究

ブラシノステロイド (BR) の生合成・代謝やシグナル伝達機構を生化学的・分子生物学的レベルで解明する研究を進めている。本年度は、シロイヌナズナ幼植物を用いた詳細な代謝実験により、BR 生合成の早い段階で 2 位の水酸化が起こる新規生合成経路の存在を明らかにした。また、イネの CYP85A の機能解析を行った結果、イネでは 6 位酸化酵素として機能しているだけで、シロイヌナズナやトマトで明らかにされているカステステロン (CS) からブラシノライド (BL) への酸化反応は触媒しないことを明らかにした。イネでは内生 BL が検出されておらず、イネの活性型 BR は CS であることを示唆している (Seoul 大 Choe 博士との共同研究)。さらに、シロイヌナズナのアクティブーションタンパク質から得られた BR 過剰発現の表現型を示す *ces* 変異体の解析を進めた。その原因遺伝子 *CES* は bHLH 型の転写因子であることを明らかにするとともに、*CES* は BR の生合成酵素遺伝子の発現制御に重要な役割を担っていることを見出した (Vienna 大 Poppenberger 博士との共同研究)

(2) 植物ホルモンのプローブ化とその応用

本研究では、植物ホルモン(ブラシノステロイド、ジベレリン、アブジジン酸、ジャスモネート、その他)の生理過程及び受容体機構を解明するに有用な探索分子の設計と合成を目的に、効率的な合成手法を開発しつつ種々の植物活性検定を並行して、これらホルモンの構造展開を行っている。また、植物ホルモンをリードとした新しい植物成長調節剤の実用化の可能性も追求している。本年度は、植物が産生する哺乳類のステロイドホルモンの植物界での分布や代謝を明らかにするため、市販の 11 α -hydroxyprogesterone と adrenosterone から、それぞれ、[9 α ,11,11,12,12-²H₅]progesterone と [9,11,11,12,12-²H₅]androstenedione を効率的に合成する方法を確立した。これにより、化学的に安定な C 環部が高純度で重水素標識された C₂₁-及び C₁₉-ステロイド (同位体純度: >95) をグラムスケールで合成できるようになった。現在、本法により、9,11,11,12,12-位を重水素した様々な C₂₁-及び C₁₉-ステロイド、更に、ブラシノステロイドを含むステロイド類の合成を行っている。

¹基礎科学特別研究員、²協力研究員、³共同研究員、⁴研修生、⁵ジュニアリサーチアソシエート、⁶客員主管研究員 ⁷研究補助員

The major aim of our laboratory is elucidation of the structure and function of novel proteins which might be useful for the development of therapeutic or diagnostic reagents. Currently, our efforts are focused mainly on the identification and functional characterization of proteins (enzymes), which mediate the metabolism, and transfer of bioactive lipids, proteoglycans or peptide hormones. We are also interested in the signal transduction mechanism of cytokines (such as activin and RANKL) and plant hormones (such as brassinosteroid and abscisic acid) and the regulatory mechanisms of translation by mRNA-binding proteins.

1. Functional analysis of cytokines

We investigated a role of activin A in the regulation of immunoglobulin production of murine B cells. Activated B cells secrete activin activity by increasing activin A and decreasing follistatin expression. B cells also express both type I and type II activin receptors, suggesting that they are targets of activin. Pretreatment of naive B cells with activin A and subsequent activation by LPS resulted in increased cell growth and IgG production. In contrast, no significant effect was observed when activin A was added to naive B cells simultaneously with LPS, indicating that activin A acts on resting but not on activated B cells. In addition, activin A did not induce B cells to produce IgE, even when added prior to activation, however, in vivo, antigen-specific IgE production was significantly reduced by neutralization of circulating activin A. These findings indicate that activin A plays an important role in Th2-mediated immune responses by enhancing antibody production through two distinct modes: 1) acts directly on resting B cells to elicit full functions of activated B cells, and 2) acts indirectly on activated B cells through modulation of other immune cells.

2. Novel proteins with therapeutic significance

(1) Aminopeptidases

Laeverin/Aminopeptidase Q (APQ) is a cell surface protein specifically expressed on human embryo-derived extravillous trophoblasts. Although, the cDNA cloning of Laeverin revealed that it contains HEXXH(X)₁₈E gluzincin motif which is

characteristic of the M1 family of aminopeptidases, its enzymatic properties is remain unknown. In this study, to elucidate the physiological action of Laeverin, we expressed a recombinant human Laeverin using a baculovirus expression system, purified to homogeneity and characterized its enzymatic properties.

It was found that Laeverin is a novel bestatin-sensitive leucine aminopeptidase and able to cleave the N-terminal amino acid of several peptides such as angiotensin III, kisspeptin-10 and endokinin C which are expressed in the placenta.

These results suggest that the enzyme plays important roles in the human placentation by regulating biological activity of key peptides at embryo-maternal interface.

(2) Scavenger receptors

FEEL-1 and FEEL-2 is multiligand receptors that bind to oxidized-LDL, Gram- negative, Gram-positive bacteria, AGE, SPARC or Hsp70 that implicated in various diseases such as atherosclerosis, diabetes and innate immunity. Inducible expression and cellular traffic of FEEL was investigated. FEEL-1 was induced by treatment thioglycolate elicited macrophage with M-CSF. Comparison with macrophage from FEEL-1 knockout mouse revealed that FEEL-1 mainly contributed to the binding to oxidized-LDL or bacteria particle. Employing yeast two-hybrid method, we cloned SNX17 as the candidate for the binding protein of FEEL-1 intracellular domain. Employing pull-down assay, SNX17 was found to bind NPVF domain of FEEL-1. Expression of miRNA for SNX17 in HUVEC revealed that binding of oxidized-LDL is reduced as when expressed miRNA for FEEL-1 in HUVEC. Expression of FEEL-1 was also reduced. Since SNX is known to play roles in recycling pathway of LDL receptor in early endosome, it is speculative that SNX serves as the intracellular trafficking of oxidized LDL and development of disease.

(3) NDST

To investigate functions of heparan sulfate/heparin *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase(NDST) in cells, we have studied the localization of each isozyme in cells where one of four mammalian NDSTs was forced to be expressed. Production of NDST in recombinat form had been developed. On the other hand, Functions of NDST in *Caenorhabditis elegans* have been studied by examining phenotypical properties in their mutants.

3. RNA binding proteins involved in post-transcriptional control

In animal oocytes, a large pool of maternal mRNA is accumulated in the cytoplasm, which offers crucial information for the early developmental processes. These maternal mRNAs are masked from the translational apparatus as storage messenger ribonucleoprotein (mRNP) complexes. We isolated RNP complexes associating with the Y-box protein FRGY2 from *Xenopus* oocytes, and by mass spectrometric analysis we identified the P100 protein as a component of these complexes. We found that P100 acts as a translational repressor in the oocytes.

4. Dynamic aspects of membrane lipids

Phosphatidylserine is an important phospholipid constituent of biological membranes and mainly localized in the inner leaflet of the plasma membranes. It is known that the asymmetric distribution of phosphatidylserine is dramatically changed depending on extracellular stimuli or states of cells. To elucidate the molecular mechanism for the regulation of phosphatidylserine dynamics in the plasma membranes, we study a CHO-K1 mutant cell line which is expected to have defects in the transbilayer movement of lipids, and attempt to identify the genetic defect in this mutant. mRNAs, which are differently expressed in parent cells and mutants, were screened by the subtraction method. The gene products obtained were proteins that localize in the plasma membranes, which are reported as lipid-binding proteins, responsible for intracellular traffic or signal transduction, whose function are unknown, and hypothetical proteins. Full-length cDNAs corresponding to these candidate genes were obtained and subcloned into the expression vector. The plasmids were transfected into the mutants by lipofection, and the dynamics of fluorescent-labeled lipids were observed. As candidates of the defective gene, clones which can recover the abnormal transport of fluorescent lipids in mutants were screened. Now we perform further analysis of these clones.

5. Screening and characterization of novel functional genes of plants

(1) Studies on biosynthesis, metabolism and signal transduction of brassinosteroids

We are studying biosynthesis, metabolism, and signal transduction of brassinosteroids (BRs). Detailed metabolic experiments using *Arabidopsis* seedlings established a novel pathway via C-2 hydroxylation in the earlier steps of BR biosynthesis. In contrast to *Arabidopsis* and tomato, rice genome revealed only one copy of the CYP85 gene. We showed that the rice CYP85A1 enzyme has only the function of CS synthase. As there is no detectable BL in rice, CS is a likely end product of BR biosynthesis in rice. Furthermore, we identified *ces*, an activation-tagged mutant of *Arabidopsis thaliana*, that is characterized by BR over-accumulation phenotypes and altered BR levels. The cloning of *CES* established that it encodes a member of the bHLH TF family. We found that *CES* functions as a transcriptional regulator of BR biosynthesis.

(2) Design and synthesis of plant hormone based molecular probes and their application.

In this project, we aim, in collaboration with plant scientists, to assemble various kinds of molecular probes of brassinosteroids, gibberellins, abscisic acid, jasmonates etc, based on synthetic organic chemistry, which promises noticeable advance in elucidation of the metabolism and signal transduction of plant hormones. Another aim is the development of new agrochemicals originated from plant hormones. In this year, in connection with our ongoing study on a mammalian steroid hormone in plant kingdom: i.e., the detection, identification and quantification of them in a wide range of plant species, and the elucidation of their metabolisms in plants, [9,11,11,12,12-²H₅]progesterone and [9,11,11,12,12-²H₅]androstenedione were synthesized from commercially available 11a-hydroxyprogesterone and adrenosterone, respectively. The deuterium atoms incorporated were chemically stable and the isotopic purities were over 95%. Since the easily-available starting materials and good overall yields allowed the gram-scale preparation, we now synthesis a variety of 9,11,11,12,12-deuterium labelled C₂₁- and C₁₉-steroids, and sterols including brassinosteroids.

Staff

Head

Dr. Masafumi TSUJIMOTO

Members

Dr. Shozo FUJIOKA
Dr. Hideki ADACHI
Dr. Jun-ichi AIKAWA
Dr. Ken MATSUMOTO
Dr. Kenji OGAWA
Dr. Hideharu SETO
Dr. Akiko YAMAJI-HASEGAWA
Dr. Yuji FUNAKOSHI^{*1}
Dr. Yoshikuni GOTO^{*1}
Dr. Nobuko AKIYAMA^{*2}
Dr. Nobutaka KITAHATA^{*2}
Dr. Masato MARUYAMA^{*2}
Dr. Yoriko NAKAMURA^{*2}
Ms Shiho TAKAHASHI^{*3}

^{*1}Special Postdoctoral Fellow ^{*2}Contract Researcher

^{*3}Contract Assistant r

Visiting Members

Dr. Tadao ASAMI (Fac. Agr. Univ. Tokyo)
Dr. Akira HATTORI (Fac. Pharm. Kyoto Univ.)
Ms. Mayumi IINO (Fac. Agr. Tokyo Univ. Agr. Tec.)
Mr. Takahiro KANAMORI (Fac. Pharm. Univ. Tokyo)
Ms. Rei MORIKAWA (Fac. Pharm. Univ. Tokyo)

Trainees

Ms. Naomi ARISAKA (Fac. Life Science, Tokyo Pharm. Univ.)
Mr. Hiroki HAYASE (Fac. Agr. Univ, Tokyo)
Ms. Natsumi NOJI (Fac. Agr. Meiji Univ.)
Ms. Hiroe TANJI (Tokyo Univ, Tec.)
Mr. Kei YAMAMOTO (Tokyo Univ. Sci.)