

したがって、侵入成長不能もアンモニウム輸送能の低下が原因であるという可能性も否定できない。

つまり、アンモニウム制限により誘導される分裂酵母の侵入成長における Amt1 の役割については少なくとも二つのモデルが考えられる。ひとつは、Amt1 がアンモニウム濃度に応じてシグナルを生成するようなセンサーとして機能するというものである (図 2D 左)。アンモニウムの結合や輸送にともなう Amt1 の構造変化がシグナル伝達系の因子との相互作用に影響を与えるということなどが想像される。もうひとつは、Amt1 の機能はあくまでもアンモニウムを輸送することにあり、取り込まれたアンモニウムあるいはその代謝産物がシグナルとして働くという可能性である (図 2D 右)。これらの中間的な仮説として、Amt1 がアンモニウム代謝酵素と相互作用してシグナル分子としての代謝産物の合成を制御しているという可能性も考えられる。以上、分裂酵母の Amt1 について考察してきたが、出芽酵母の偽菌糸分化における Mep2 の機能に関しても、センサーであることが実証されたわけではなく、同じような議論が可能である。

7. おわりに

真正細菌、古細菌から真核生物に至るまで保存されているアンモニウムトランスポーターは、その生物におけるアンモニウムの役割を反映した様々な生理機能を担っている。アンモニウムトランスポーターの生理機能を中心に解説した本稿では、結果として、理解が進んでいる微生物の研究を紹介することになった。今回は取り上げなかったが、植物のアンモニウムトランスポーターも盛んに研究されており、また、ヒトにおけるアンモニウム輸送の研究も、Rh タンパク質の Amt/Mep ホモログとしての同定を契機として急速に進展しつつある。

本稿の後半では、酵母や細胞性粘菌において見出されてきたアンモニウムトランスポーターと形態分化との関連について紹介した。はたして、アンモニウムトランスポーターは、条件に応じてシグナルを生成するセンサーとしての機能を持つのか、それともアンモニウムを輸送するだけでシグナルは細胞内で生成されるのかということは今後に残された問題である。いずれにしても、アンモニウムトランスポーターが関与する形態分化は、窒素源センシングの分子機構を理解するための有用なモデルになると期待される。

1) Van Kim, C.L., Colin, Y., & Cartron, J.-P. (2006) *Blood Rev.*,

- 20, 93–110.
- 2) Huang, C.-H. & Peng, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15512–15517.
- 3) Khademi, S., O'Connell, J., III, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J.W., & Stroud, R.M. (2004) *Science*, **305**, 1587–1594.
- 4) Zheng, L., Kostrewa, D., Bernèche, S., Winkler, F.K., & Li, X.-D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17090–17095.
- 5) Andrade, S.L.A., Dickmanns, A., Ficner, R., & Einsle, O. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14994–14999.
- 6) Marini, A.-M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., & Andre, B. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4282–4293.
- 7) Mitsuzawa, H. (2006) *Genes Cells*, **11**, 1183–1195.
- 8) Hess, D.C., Lu, W., Rabinowitz, J.D., & Botstein, D. (2006) *PLoS Biol.*, **4**, 2012–2023.
- 9) Liu, K., Nagase, H., Huang, C.G., Calamita, G., & Agre, P. (2006) *Biol. Cell*, **98**, 153–161.
- 10) Kirsten, J.H., Xiong, Y., Dunbar, A.J., Rai, M., & Singleton, C. K. (2005) *Dev. Biol.*, **287**, 146–156.
- 11) Palková, Z. & Váchová, L. (2003) *Int. Rev. Cytol.*, **225**, 229–272.
- 12) Lorenz, M.C. & Heitman, J. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1236–1247.
- 13) Biswas, K. & Morschhäuser, J. (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**, 649–669.
- 14) Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., & Perlin, M.H. (2003) *Mol. Microbiol.*, **50**, 259–275.
- 15) Amoah-Buahin, E., Bone, N., & Armstrong, J. (2005) *Eukaryot. Cell*, **4**, 1287–1297.

光澤 浩^{1,2}

(¹ 日本大学総合科学研究所, ² 日本大学生物資源科学部)

Physiological functions of ammonium transporters: role in morphological differentiation

Hiroshi Mitsuzawa^{1,2} (¹University Research Center, Nihon University, 4-8-24 Minamikudan, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8275, Japan; ²Nihon University College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan)

細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-1 が示す薬理作用：下等生物（粘菌）は面白い！

はじめに

近年、「細胞性粘菌 (cellular slime molds)」という土壤微生物の一群から多くの新規薬理活性物質が単離・同定され、今やこの生物は創薬のための「リード化合物の宝庫・資源」として注目されている¹⁾。

ここでは、粘菌の産生する抗腫瘍因子 DIF-1 の作用機構の解析を中心に、DIF-1 発見の経緯や筆者らの最近の研究について概説したい。

1. 細胞性粘菌とは？

粘菌類は、「真性粘菌類」と「細胞性粘菌類」という独立した生物群に大別される（しばしば混同されるので、区別されたい）。

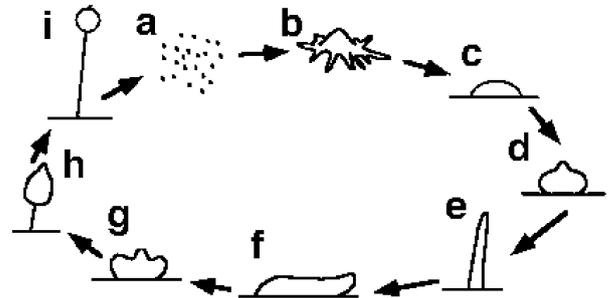
細胞性粘菌類は、世界中の土壤表層、たとえば森の落ち葉の下などに生息する下等真核生物で、7属70種程のグループからなる²⁾。その中の1種 *Dictyostelium discoideum* (和名「キイロタマホコリカビ」) は、その和名の通り、カビによく似た淡黄色の子実体（孢子塊と柄細胞から成る1-2mmほどの構造体）を形成する。ただし、細胞性粘菌類とカビ（真菌）類は、見かけは似ていても進化的にはかけ離れている。

粘菌類の分類学的位置付けには議論のあるところだが、粘菌は「原生生物界（Protista）」、もしくは動物界、植物界、菌界と並立する「粘菌界」に位置付けられており²⁾、「菌界」に属するカビ類とはまったく別の生物群と考えられている（このことが、先に述べた細胞性粘菌類を「新たな創薬資源」として期待する理由にもなっている）。

さて、数ある細胞性粘菌類の中でも *D. discoideum* (以下、粘菌) は最もよく研究されている種の一つであり、その生活史はとてもユニークだ (図 1A)。孢子から発芽した粘菌アメーバ（単細胞、しかも遺伝子は半数体！）は、周囲の細菌を餌として食べながら増殖する（細胞分裂をくり返す）が、餌がなくなると、粘菌細胞は形態形成（多細胞体形成）を開始する。そして、 10^5 個程の細胞が集合して多細胞体を構築し、最終的に孢子塊と柄細胞から成る子実体を形成する。湿度や温度にもよるが、未分化アメーバの集合開始から子実体形成までは、およそ24時間という短さだ。

このように粘菌は、1) 増殖期の未分化細胞が（餌がある限り）分裂をくり返すこと、2) 形態形成期には細胞が走化性運動によって集合すること、3) 最終的に「孢子と柄細胞」というたった2種類の細胞型（その分化比率はかなり厳密に制御されている）にしか分化しないこと、そして何より、4) 育成や遺伝子操作が簡単なことなどの理由から、発生生物学、細胞生物学の優れたモデル生物として、世界的に研究が進められている。

A



B

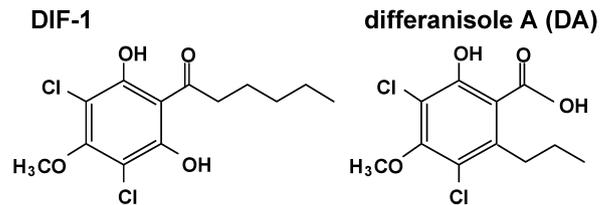


図 1 (A) 粘菌生活史の模式図

増殖期 (a) の粘菌アメーバは細菌を餌に増殖するが、餌が無くなると形態形成期 (b-i) に入る。そして、 10^5 個程の細胞が集合して多細胞体を形成し、ナメクジ型の移動体期 (f) を経て、最終的に孢子塊と柄から成る子実体を形成する。

(B) DIF-1 と differanisole A の化学構造

2. 粘菌の柄細胞分化誘導因子 DIF-1 とがん生物学の接点

1987年、英国 MRC 分子生物学研究所の Kay 博士らは、悪戦苦闘の末、粘菌の柄細胞分化誘導因子 DIF-1 を同定、報告した (図 1B)³⁾。この分子は、二つの塩素原子を含むアルキルフェノンで、その特徴的構造から当時大きな注目を集めた。

一方、理化学研究所の旭博士らは、赤芽球性白血病細胞に対する増殖抑制と再分化（ヘモグロビン産生）誘導能を指標とした抗腫瘍因子のスクリーニングを行い、真菌の1種 *Chaetomium* (和名なし) の培養上清から新規抗腫瘍因子 differanisole A (DA) を発見した (図 1B)⁴⁾。

粘菌が産生する粘菌の分化誘導因子 DIF-1 と抗腫瘍因子である DA は、発見に至る経緯や研究分野が異なっていたため、それらの化学構造が酷似しているにも拘わらず、当初まったく別々に研究されていた。

旭博士らと筆者のグループは両化合物の構造の類似性に着目し、まず、DAが粘菌の柄細胞分化を誘導できること⁵⁾、そして、DIF-1が抗腫瘍活性（しかもDAよりも強力）を有すること⁶⁾を見出した。

これらの結果は、1) DIF-1とDAに共通の化学構造が、種を越えて細胞分化に重要な役割を演じている可能性があること、2) DIF様因子が全く新しいタイプの抗腫瘍因子・分化誘導因子としてがん治療に応用できる可能性があること等を示唆している。この発見以来、筆者らはDIF-1の抗腫瘍作用の解析を進めてきた。

3. 抗腫瘍因子 DIF-1 の作用機構

実際にDIF-1は、筆者らが現在までに調べた全ての腫瘍

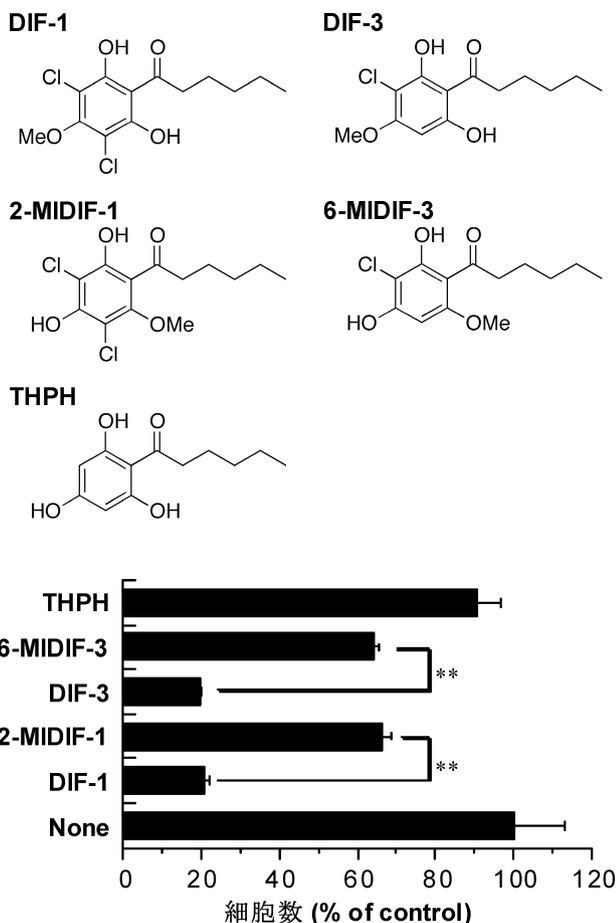


図2 K562ヒト白血病細胞に対するDIFの増殖阻害作用（文献12より改変して引用）

K562細胞を上記DIF誘導体（30 μ M）存在下で3日間培養し、細胞数を比較した。DIF-1とDIF-3は有為に細胞増殖を抑制したが、それぞれの構造異性体とTHPHの作用は小さかった。

細胞に対して *in vitro* で強力な増殖抑制作用を示し、場合によっては分化誘導・促進作用を示している⁶⁻⁸⁾。さらに興味深いことに、DIF-1は *in vitro* で血管平滑筋細胞（正常細胞）の分化状態を維持したり、脱分化した平滑筋細胞の再分化を誘導することや⁹⁾、抗インフルエンザウイルス活性を有すること¹⁰⁾等もわかってきた。

さらに筆者らは、東北大学大学院薬学研究科の大島吉輝教授のグループとの共同研究等で、化学合成したDIF誘導体を用いた「化学構造-作用相関」解析を行い、DIF-3とその誘導体の一部が強い抗腫瘍活性を有することを発見した（図2は解析結果の一部）¹¹⁻¹³⁾。

DIF-1/DIF-3 (DIFs) の作用機構に関しては、1) DIFsが腫瘍細胞内カルシウム濃度を上昇させること^{7,8)}、2) DIFsがcyclin DやEの発現を抑え、Rbタンパク質を脱リン酸化することによって細胞周期をG1期に停止させること等^{9,12)}が、筆者らが調べたすべての細胞において共通する現象として確認されている。しかし、ErkやAktなどのキナーゼ活性へのDIFsの影響は細胞種によって異なっており、DIFsの作用機構を統合的に理解するには至っていない。

4. DIFsのターゲット分子の同定

このように、筆者らはDIFsの作用機構の解析を進めてきたが、肝心のDIFsの薬理的ターゲット分子が未同定だったことが最大の難題になっていた。ところが最近筆者らは、「DIFsがcalmodulin依存性cAMP/cGMP分解酵素phosphodiesterase1 (PDE1)の直接の阻害剤であること」（図3）を世界で初めて発見、報告した¹⁴⁾。PDE1を含むcyclic nucleotide分解酵素群は、近年、抗がん剤のターゲットとして注目されており、実際に筆者らの実験においても、既知PDE1阻害剤が白血病細胞の増殖を阻害している。

ただし、DIFsの示す多彩な作用については、PDE1阻害だけでは説明できない面があり、現在筆者らは、第2のターゲット分子探索を含めDIFsの作用機構解明を進めている。また、各種DIF誘導体の作用解析を進めるとともに、*in vivo*での効果や毒性を検討していく予定である。

おわりに

細胞性粘菌の分化誘導因子と抗腫瘍作用という組合せに驚く研究者も多いかもしれないが、DIF-1はいわゆる「抗生物質」的な観点で発見された物質ではない。粘菌が産生する粘菌の分化誘導因子として同定された物質が、（偶然にも？）抗腫瘍活性を持ち合わせていたのである。

ところで、筆者らの研究のきっかけともなった「DIF-1

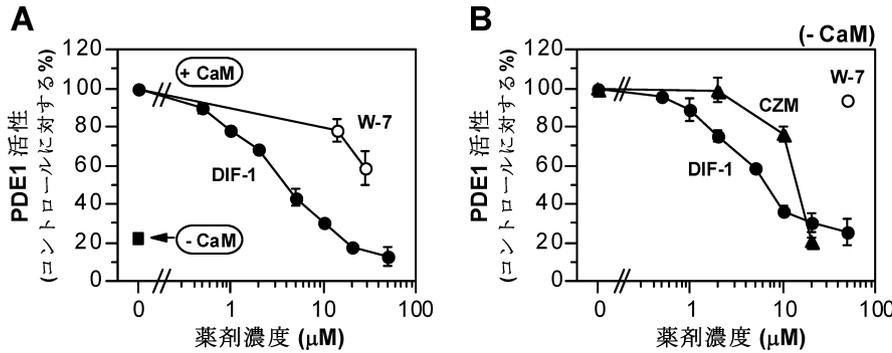


図3 PDE1 活性に対する DIF-1 の阻害作用 (文献 14 より引用)
in vitro における PDE1 活性に対する DIF-1 の阻害効果を calmodulin (CaM) 存在下 (A) および非存在下 (B: PDE1 は CaM 非存在下でもある程度の活性がある) で測定し, W-7 (CaM 阻害剤) や calmidazolium (CZM: CaM 阻害剤かつ PDE1 阻害剤) の効果と比較した。(註) DIF-3 についても PDE1 を阻害することがわかっている。

と DA の構造的類似」は果たして ‘偶然の賜物’ なのだろうか? 前述のように粘菌類と真菌類は進化的隔たりが大きい。ならば, DIF-1 と DA に共通の化学構造を有する物質 (DIF 様因子) は, 種を超えてすべての粘菌類と真菌類に保存され, それぞれの細胞分化に重要な役割を果たしているのではないだろうか? ならば, 抗腫瘍因子として同定された DA もその産生母体である *Chaetomium* (真菌) において細胞分化に関わる何らかの役割を果たしていることが推察される。もしそうであれば, いろいろな種由来の DIF 様因子も探索してみたい。

話は少し飛躍するが, 我々哺乳類にも内在性 DIF 様因子・DIF 類縁因子なるものが存在する可能性もないとは言えない。そして, 「DIF-1 や DA はその内在性因子の働きを代替したり, 乱したりすることによって抗腫瘍作用を発揮した」という可能性も否定できない。等々, 楽しい空想は止まらないが, 今後の DIF 研究の進展がこれらの疑問を解決してくれるだろう。

本稿を終えるにあたり, 共同研究者の皆様に深く感謝いたします。尚, 本稿は文献 15 の続編であり (便宜上, 一部重複もあるが), 興味のある方は参照されたい。

- 1) 大島吉輝, 伊東 明 (2000) モデル生物: 細胞性粘菌 (前田靖男編), pp. 343-354, アイピーシー, 東京.
- 2) 前田靖男 (2006) パワフル粘菌, 東北大学出版会, 仙台.
- 3) Morris, H.R., Taylor, G.W., Masento, M.S., Jermyn, K.A., & Kay, R.R. (1987) *Nature*, 328, 811-814.
- 4) Oka, H., Asahi, K., Morishima, H., Sanada, M., Shiratori, K., Iimura, Y., Sakurai, T., Uzawa, J., Iwadare, S., & Takahashi, N. (1985) *J. Antibiot.*, 38, 1100-1102.
- 5) Kubohara, Y., Okamoto, K., Tanaka, Y., Asahi, K. Sakurai, A.,

& Takahashi, N. (1993) *FEBS Lett.*, 322, 73-75.

- 6) Asahi, K., Sakurai, A., Takahashi, N., Kubohara, Y., Okamoto, K., & Tanaka, Y. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 1036-1039.
- 7) Kubohara, Y., Saito, Y., & Tatemoto, K. (1995) *FEBS Lett.*, 359, 119-122.
- 8) Kubohara, Y. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 418-422.
- 9) Miwa, Y., Sasaguri, T., Kosaka, C., Taba, Y., Ishida, A., Abumiya, T., & Kubohara, Y. (2000) *Circ. Res.*, 86, 68-75.
- 10) Kuno, M., Shimakura, M., Furuta, Y., Terashima, N., Hosaka, K., & Kubohara, Y. (2002) *Kitakanto Med. J.*, 52, 253-256.
- 11) Kubohara, Y. (1999) *Eur. J. Pharmacol.*, 381, 57-62.
- 12) Akaishi, E., Narita, T., Kawai, S., Miwa, Y., Sasaguri, T., Hosaka, K., & Kubohara, Y. (2004) *Eur. J. Pharmacol.*, 485, 21-29.
- 13) Gokan, N., Kikuchi, H., Nakamura, K., Oshima, Y., Hosaka, K., & Kubohara, Y. (2005) *Biochem. Pharmacol.*, 70, 676-685.
- 14) Shimizu, K., Murata, T., Tagawa, T., Takahashi, K., Ishikawa, R., Abe, Y., Hosaka, K., & Kubohara, Y. (2004) *Cancer Res.*, 64, 2568-2571.
- 15) 久保原 禪 (1997) 生化学, 69, 1191-1195.

久保原 禪
 (群馬大学生体調節研究所)

Pharmacological activities of the *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1 (DIF-1): Cellular slime molds are fascinating lower eukaryotes!
 Yuzuru Kubohara (Gunma University Institute for Molecular and Cellular Regulation, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi 371-8512, Japan)

ヒト ABC トランスポーター ABCG2 の遺伝子多型: ポルフィリン症のリスクとタンパク質品質管理機構

はじめに

現在, 「個の医療」の実現に向けた取り組みが世界規模で進んでいる。一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphisms) は個人間における DNA の塩基配列の違いを示し,