

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15090

研究課題名(和文)分泌型14-3-3sigmaの生物活性解明と臨床応用

研究課題名(英文)Analysis of secretory pathway of 14-3-3sigma

研究代表者

松岡 正明(Matsuoka, Masaaki)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70222297

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 14-3-3sigmaは細胞外に分泌され、CLSPに結合し、その機能を抑制する。本研究では、まず、14-3-3sigmaのdeletion analysisを行ない、N末82アミノ酸がCLSPとの結合に重要であることを見出した。次に、細胞外分泌のメカニズムの検討を行い、その分泌メカニズムはunconventional pathwayであることを確定させた。Unconventional pathwayのうち、CUPS経路を構成するGRASP1および2が分泌に関係するか否かの検討を行ったが、アッセイ系に問題があり、現在のところ結論が出ていない。

研究成果の概要(英文): To elucidate the mechanism underlying the secretion of 14-3-3sigma, a series of experiments have been performed and the following results have been obtained. First, the analysis using various deletion mutants of 14-3-3sigma indicate that the N-terminal 82 amino acids region is important for its binding to CLSP. Treatment with brefendin results in the almost complete defect of 14-3-3sigma secretion. This result indicates that 14-3-3sigma is secreted via the so-called unconventional secretion pathway. Third, an secretion assay system has been established by which 14-3-3sigma, C-terminally tagged with Nanoluc, is overexpressed in cultured cells. Using this assay, the involvement of Grasp1 and Grasp2 in the secretion of 14-3-3sigma has been addressed. Until now, consistent results have not been obtained by the gain-of-function experiments or the loss-of-function experiments. Finally, no 14-3-3sigma-binding proteins other than CLSP have been identified.

研究分野：薬理学

キーワード：14-3-3 細胞外分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

14-3-3sigma は他の 14-3-3 family 蛋白質 (ヒトで6種類) と heterodimer を形成せず、homodimer で機能する唯一の 14-3-3 蛋白質である。100 種類以上同定された 14-3-3sigma の結合蛋白質は多岐に渡る細胞内蛋白質群であり、機能的には他の 14-3-3 蛋白質と同様、標的細胞内蛋白質の機能を調整する scaffold protein と考えられてきた。申請者は、アルツハイマー病の研究途上、14-3-3sigma が、細胞外に分泌されることを見いだした。さらに、14-3-3sigma は通常の secretory signal sequence を持たず、unconventional secretory pathway を通じて分泌される可能性が高いと推定した。

2. 研究の目的

本研究では以上の萌芽的な発見をもとに、「分泌型 14-3-3sigma」の生物学的意義を確定させ、分泌メカニズムを解明し、その細胞外における調節分子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

研究の第一の柱は、14-3-3sigma 分泌のメカニズムを解明することである。この解明により、詳細な機序が十分解明されていない unconventional secretory pathway の一端が明らかになる可能性が高い。もう一つの研究の柱は、分泌型 14-3-3sigma の生物活性の全貌を明らかにすることである。分泌型 14-3-3sigma の標的蛋白質を探索する研究と分泌型 14-3-3sigma の Degradation を規定するメカニズムを解明する研究を含む。

4. 研究成果

(1) 14-3-3sigma が分泌されることの確定
当初、transient transfection の系を用いて培養細胞に 14-3-3sigma を発現させ、細胞外に分泌されるか否かの実験を行なった。しかし、transfection 操作に伴う非特異的細胞死由来の細胞外放出である可能性が除外

できなかった。この問題点を解決するために、F11 神経細胞を用いて 14-3-3 遺伝子を高発現する stable transformant 細胞を複数樹立した。これらの細胞株の培養上清に分泌されたタンパク質を詳細に比較することにより、14-3-3sigma は細胞外に分泌されることを確定させた<図 1>。陽性コントロールとして CLSP を、また陰性コントロールとして Rho を用いて実験を行った。また、Brefendin という conventional secretory pathway を特異的に抑制する薬物をこの細胞に作用させたところ、分泌は抑制されなかった<図 2>。この結果は 14-3-3sigma がいわゆる Unconventional secretory pathway を介して分泌されることを支持している。

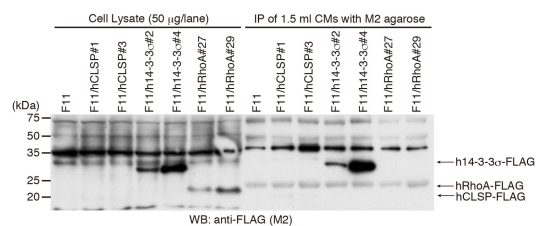


図 1 14-3-3sigma は細胞外に分泌される。陽性コントロールは CLSP。陰性コントロールは Rho。右の 7 lanes は培養上清中に分泌されたそれぞれのタンパク質を免疫沈降したサンプル。

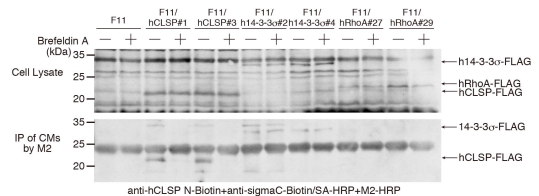


図 2 14-3-3sigma 分泌は Conventional secretory pathway 阻害剤 Brefendin で抑制されない。下のパネルは培養上清中に分泌されたそれぞれのタンパク質を免疫沈降したサンプル。

(2) 14-3-3sigma 分泌に必須の領域の同定
14-3-3sigma の分泌に必須の領域を明らかにするために 14-3-3sigma の種々の deletion

mutants を作成した。これらのMutantが有する分泌能とCLSP結合活性をin vitro assay 形を用いて検証したところ、図3のような結果となった。CLSPとの結合責任部位としてはN末82アミノ酸領域を削ると結合が弱まることから、この領域に結合に重要な部分が存在すると結論した。一方、現在までの解析結果では、細胞外分泌に重要な領域は確定できなかった (図3)。

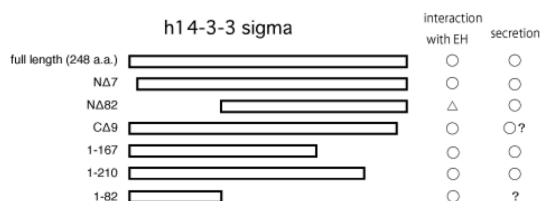


図3 deletion analysis of 14-3-3sigma. EH(CLSP) との結合能と細胞外分泌を検討した。

(3) 14-3-3sigma 分泌に対する Grasp1 および Grasp2 の関与の解析

いままでの研究によりYeastの系ではCUPS経路が代表的なUnconventional secretory pathwayの一つであることが明らかになっている。4-3-3sigma 分泌にかかわるUnconventional secretory pathwayの候補として、この経路の中心分子であるGrasp1とGrasp2の関与をgain-of-functionとloss-of-functionの遺伝子実験手法を用いて検討した。Assay系として、14-3-3sigmaのC末にNanoluc(ある種のLuciferase)を結合させ、細胞外に分泌された14-3-3sigma-Nanoluc量を酵素活性を指標に計測するという系を独自に構築し用いた。まず、loss-of-function実験として複数のGrasp1およびGrasp2のsiRNAを構築し、種々の細胞内に導入して遺伝子ノックダウンを行いひき起こされる変化を観察した。その結果、残念ながら現在までに行なった結果では、使用する細胞により分泌が上昇する細胞(図4)が存在する一方、別の細胞では分泌が低

下するという事を発見した。現在、アッセイの詳細な問題点を検討しつつあり、この実験に関して今後再検討する予定である。

また、遺伝子高発現によるgain-of-function実験においてはやはり用いた細胞の種類により一定しない実験結果を得た。同じくアッセイの詳細な問題点を検討しつつあり、今後再検討する予定である。

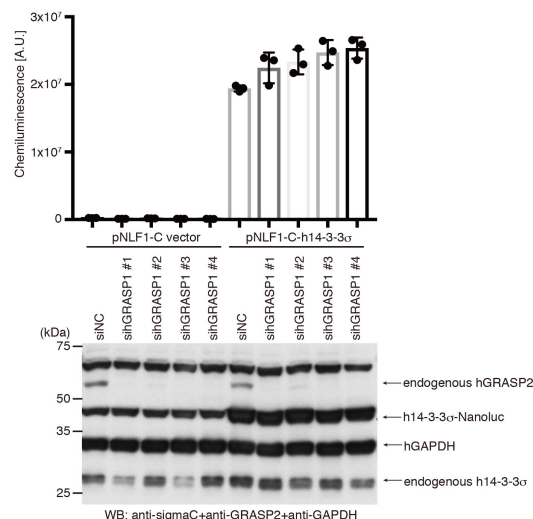


図4 GRASP1 and GRASP2 の knockdown の 14-3-3sigma nanoluc 分泌に対する効果。複数のsiRNAをHela細胞に導入させ、細胞外に分泌される14-3-3sigmaの量を計測した。

(4) 14-3-3sigma 標的タンパク質の探索

分泌14-3-3sigmaのCLSP以外の標的の探索のため、glutathione beadsに固相化されたGS-14-3-3sigmaを作成したが、特異的に結合する分泌蛋白質はCLSP以外には得られなかった。

(5) <今後予想される展開>

14-3-3sigma分泌に必須の領域を同定する作業を継続する。また、現在まで樹立したアッセイ系の問題点を明らかにして、よりよいアッセイ系を構築し、14-3-3sigma分泌経路の解明を目指す。

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)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 正明 (Matsuoka, Masaaki)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号: 70222297

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()