

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06000

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いたTmem86aの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Tmem86a using oligodendrocyte progenitor cells

研究代表者

小森 雅之 (Komori, Masayuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40183347

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)：オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いる実験が成功しなかったため、FLAGタグ付加ヒトTmem86aの異種発現系を用いてTmem86aの機能解析を行うことにした。FLAGタグ付加ヒトTmem86aの単独での異種発現には成功しなかったが、N末端側がTmem86bでC末端側がTmem86aとなるように融合させた4種のキメラタンパク質(Ch1-4)をメタノール資化酵母で発現させることができた。特に、Ch4はほぼ全長のTmem86aを含んでいる。また、ラット脳においてTMEM86a mRNAの発現が他組織より強く、Tmem86aが脳において重要な役割を果たしてい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

FLAGタグ付加ヒトTmem86bを異種過剰発現する酵母ミクロソームから可溶化・精製した標品を用いてリボソーム再構成系でのリゾプラスマロゲナーゼ活性を測定したが検出できず、Tmem86bがリゾプラスマロゲナーゼを持たないというごく最近の報告(文献3)を支持する結果が得られた。一方、FLAGタグ付加ヒトTmem86bとTmem86aのキメラタンパク質のうち、ほぼ全長のTmem86aを含むCh4についてメタノール資化酵母を用いる異種発現系の確立に成功したことは、Tmem86aの生化学的な機能解析などを行う上で学術的に有用である。

研究成果の概要(英文)：Since the experiments using oligodendrocyte progenitor cells was not successful, it was decided to perform functional analysis of Tmem86a using a heterologous expression system of FLAG-tagged human Tmem86a. Although heterogeneous expression of FLAG tagged human Tmem86a alone was not successful, four chimeric proteins (Ch1 to 4) fused so that the N-terminal side is Tmem86b and the C-terminal side is Tmem86a, were possible to express them in methylotrophic yeast. In particular, Ch4 includes a nearly full-length Tmem86a. In addition, the expression of TMEM86a mRNA was stronger in rat brains than in other tissues, suggesting that Tmem86a may play an important role in the brain.

研究分野：生化学、分子生物学、獣医学

キーワード：プラスマローゲン Tmem86a リゾプラスマロゲナーゼ オリゴデンドロサイト前駆細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) プラスマローゲンは脳や心臓に多く存在するエーテルリン脂質の一種で、主要な生体膜成分であるジアシルグリセロリン脂質(エステル結合型)とは異なり、グリセロール骨格のsn-1位がアルケニル基となっておりビニルエーテル結合を持つ。また、ヒトの中枢神経系ではプラスマローゲンがリン脂質の約1/4を占めており、特に、ミエリンに多く含まれ、神経系において重要な役割を有していることが示唆される。

(2) ごく最近、プラスマローゲン由来のリン脂質が胸腺のナチュラルキラーT細胞に対して自己抗原としての役割を持っていることが報告された(文献1)。また、プラスマローゲンの分解代謝に関与するリゾプラスマロゲナーゼがラット肝ミクロソームより精製され、*TMEM86b*遺伝子産物と同定された(文献2)。この*TMEM86b*遺伝子は唯一、*TMEM86a*遺伝子と42%の相同性を示すのみで、他に高い相同性を示すものはデータベース上に見つかっておらず、*TMEM86a*遺伝子産物(Tmem86a)についてはその機能が全く不明である。

2. 研究の目的

プラスマローゲンはsn-1位にアルケニル基を持つエーテルリン脂質で脳、特にミエリンに多く存在するが、その生物学的意義については不明な点が多い。ごく最近、プラスマローゲン関連リン脂質が新規なリン脂質メディエーターとして機能している可能性が示唆された。また、プラスマローゲンの分解代謝に関与するリゾプラスマロゲナーゼが*TMEM86b*遺伝子産物(Tmem86b)と同定されたが、その唯一のホモログ遺伝子産物であるTmem86aの機能は全く分かっていない。そこで、本研究では、新生仔ラット脳より調製したオリゴデンドロサイト前駆細胞を用いて*TMEM86a*遺伝子をノックダウンやノックアウトすることによりTmem86aの機能について解析し、プラスマローゲン関連リン脂質との関連性の有無についても検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新生仔ラット脳由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞の培養系を確立し、*TMEM86a*遺伝子のRNA干渉によるノックダウン株やゲノム編集によるノックアウト株の作製を試みた。

(2) ヒトおよびラットの各組織における*TMEM86a* mRNAの発現動態を既に確立しているRT-PCR法により調べた。

(3) メタノール資化酵母やバキュロウイルスを用いる昆虫細胞を利用した異種発現系を用いて、FLAGタグ付加ヒトTmem86aおよびTmem86bの大量かつ機能的な発現系の確立を試みた。

(4) ポリクローナル抗体の作製のため、大腸菌で組換え体ヒトTmem86a (MBP融合タンパク質)の発現・精製を試みた。

4. 研究成果

(1) 当初予定していた新生仔ラット脳由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞単離キットの入手やその培養系の確立に時間を要したため、オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いて*TMEM86a*遺伝

子のRNA干渉によるノックダウン株やゲノム編集によるノックアウト株を作製することはできなかった。

(2) ヒトおよびラットの各組織由来cDNA (8種類) を用いてRT-PCR法により *TMEM86a* mRNA の発現を調べた (図1)。その結果、ヒトでは *Tmem86a* の発現は膵臓と胎盤で非常に高く、次いで肝臓と腎臓で高く、骨格筋では最も低くなり、その発現パターンは肝臓を除いてほぼと *Tmem86b* と類似していた。また、ヒト *Tmem86a* の発現パターンはプラスマローゲンの生合成系の酵素であるアルキルジヒドロキシアセトンリン酸シンターゼやジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼの発現パターンとも類似していた。一方、ラットでは *Tmem86a* の発現は脳で最も高く、次いで脾臓で高く、肺では低かったのに対して、*Tmem86b* の発現は肺、骨格筋で最も高く、次いで肝臓で高く、精巣では低かった。個体差が大きくRNA調製も難しいヒト組織での結果を考慮すると、ラット組織での結果より *Tmem86a* が強く発現している脳において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、*Tmem86a* の特異的な抗体が得られたならば、タンパクレベルでもラットの各組織における *Tmem86a* の発現を調べる必要がある。

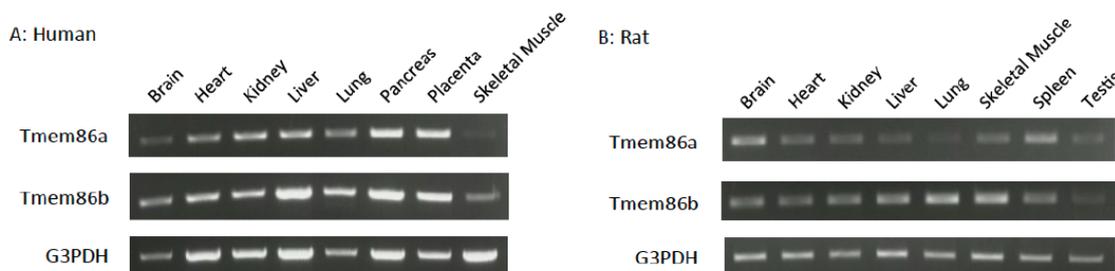


図1. ヒトおよびラットの各組織における *Tmem86a* mRNA の発現

(3) まず、FLAGタグ付加ヒト *Tmem86b* については、メタノール資化酵母および昆虫細胞、いずれの宿主を用いた場合も過剰発現系の確立に成功した。ごく最近、*Tmem86b* のリゾプラスマローゲナーゼ活性について再現性が得られないとの報告がなされたため (文献3)、組換え体発現酵母マイクロソームから可溶化・部分精製した標品を含むリポソーム再構成系を用いてリゾプラスマローゲナーゼ活性を測定した (文献2) が検出できず、文献3を支持する結果が得られた。さらに、ヒト *Tmem86b* と GFP との融合タンパク質のメタノール資化酵母での発現にも成功し、小胞体マーカー (BiP の N 末 30 残基 と mCherry との融合タンパク質) との共発現株を用いて融合タンパク質が小胞体に局在することを明らかにした。

一方、FLAGタグ付加ヒト *Tmem86a* については、両宿主いずれを用いても全長ヒト *Tmem86a* の異種発現には成功しなかった。そこで、N末端側が *Tmem86b* で C末端側が *Tmem86a* となるように融合させた4種のキメラタンパク質 (Ch1~4) のメタノール資化酵母での異種発現を試みたところ、いずれの組換え発現酵母株もメタノール培地で特異的にキメラタンパク質 (28kDa 付近) を発現していることが分かった (図2の矢頭)。なお、Ch1は *Tmem86b* の 1-123 残基と *Tmem86a* の 120-240 残基、Ch2は *Tmem86b* の 1-70 残基と *Tmem86a* の 68-240 残基、Ch3は *Tmem86b* の 1-44 残基と *Tmem86a* の 37-240 残基、Ch4は *Tmem86b* の 1-19 残基と *Tmem86a* の 6-240 残基をそれぞれ融合させたものである。さらに、ほぼ全長の *Tmem86a* を含む Ch4 について、組換え発現酵母から分離・精製するためラージスケールでの培養を試みたが、メタノールで誘導される約 28kDa のバンドがほとんど検出されなくなった。

Tmem86aはTmem86bと異なり、宿主の酵母に対して毒性を示す可能性が示唆され、酵母での大量発現を行うためにはさらに条件検討を行う必要があることが分かった。

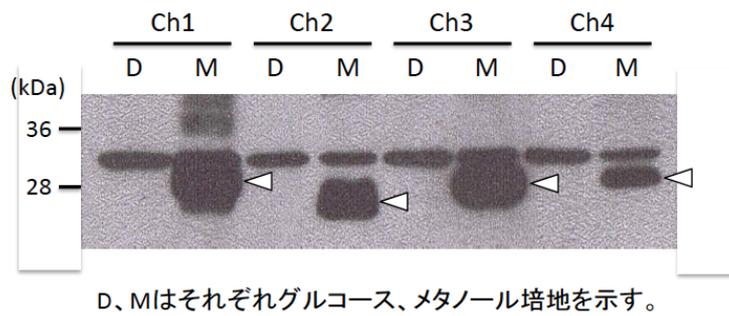


図2. メタノール資化酵母におけるTmem86b/86aキメラタンパク質の発現

さらに、Tmem86bの保存性Cys (2カ所) がTmem86aではいずれもPhe (83および90残基目) に置換しているため、この部位に注目してCh4タンパク質の点変異体4種 (F83C、F83A、F90C、F90A) を作製した。今後は引き続き、機能解析を行うために十分な量のCh4タンパク質の分離・精製を行い、プラスマローゲン代謝との関連について検討するとともに、他のキメラタンパク質 (Ch1-3) や上記の点変異体についても解析し、Phe (83および90残基目) の置換によるTmem86aの機能への影響について調べたい。

(4) 市販の抗ペプチド抗体によるTmem86aの検出が困難であったため、自作でヒトTmem86aに対する特異抗体の作製するため、大腸菌を用いて5種の組換え体 (マルトース結合タンパク質のC末端に全長Tmem86a (WT) および4種のN末端欠失体Tmem86a (64C、96C、129Cおよび160C) を融合させたキメラタンパク質) の発現株を作製したところ、160残基目からC末端までを含む160C融合タンパク質が最も発現量が多かった (図3の矢頭)。また、組換え体大腸菌より160C融合タンパク質を精製することができたが、さらにプロテアーゼで消化してTmem86a由来ペプチドの回収を試みると、精製の過程で必要な界面活性剤の除去や限外濾過メンブレンを用いる濃縮の際に不溶化が生じたため、抗原として十分な量を回収することができなかった。したがって、充分量のTmem86a由来ペプチドを得るためにはさらに精製の条件検討を行う必要がある。

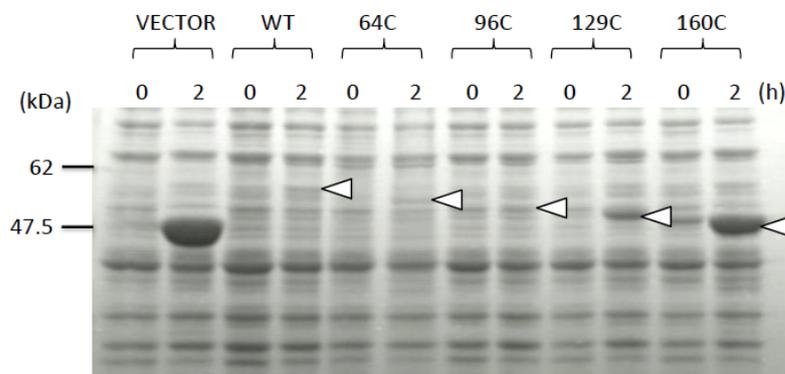


図3. 大腸菌におけるMBP-Tmem86a融合タンパク質の発現

<引用文献>

- (1) Facciotti, F et al, Nat Immunol, 13, 474-480, 2012
- (2) Wu, L-C et al, J Biol Chem, 286, 24916-24930, 2011
- (3) Christopher, MJ et al, J Biol Chem, 293, 8693-8709, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa H, Komori M, and Nishimura K.	4. 巻 45
2. 論文標題 Carbon tetrachloride suppresses ER Golgi transport by inhibiting COPII vesicle formation on the ER membrane in the RLC 16 hepatocyte cell line.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Biol Int.	6. 最初と最後の頁 633-641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川博史、小森雅之、西村和彦
2. 発表標題 ラット肝由来株化細胞において四塩化炭素は小胞体-Golgi間小胞輸送を阻害する
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川博史、小森雅之、西村和彦
2. 発表標題 ラット肝由来株化細胞を用いた四塩化炭素肝毒性での細胞内小胞輸送阻害メカニズムの解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川和雅、國澤卓磨、Ida J.van der Klei、小森雅之
2. 発表標題 Heterologous expression of N-terminal FLAG-tagged human lysoplasmalogenase
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野敦也、奥添彩加、国本将樹、Ida J.van der Klei、小森雅之
2. 発表標題 Visualization of import of peroxisomal matrix proteins in derived cells from H. polymorpha pex14 deletion strain
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川博史、碓一樹、小森雅之、西村和彦
2. 発表標題 Phospholipase D1またはPhospholipase D2の抑制はER-Golgi間小胞輸送調節を介してERストレス由来アポトーシスを誘導する
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
オランダ	University of Groningen		