

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06911

研究課題名(和文) 選択的スプライシングによるシェディング制御の分子機序と機能的意義

研究課題名(英文) Molecular mechanism and functional significance of the regulation of ectodomain shedding by alternative splicing

研究代表者

白壁 恭子 (Shirakabe, Kyoko)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：00345315

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)：細胞外領域シェディング(以下シェディング)は、膜タンパク質を膜近傍で切断し細胞外領域を可溶化する翻訳後修飾機構である。本研究では、膜近傍をコードする選択的エキソンの有無によりシェディング感受性が変化する接着分子ALCAMの解析を通じ、選択的エキソンがコードする酸性アミノ酸がシェディング耐性の付与に必要であることを明らかにした。さらに、酸性アミノ酸の位置ではなく数が重要であること、他の膜タンパク質に酸性アミノ酸を導入してもシェディング耐性を付与できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膜タンパク質のシェディング感受性が「有利な条件の存在」ではなく「不利な条件の不在」によって規定されることが示唆された。この知見は、これまで明らかにされていなかったシェディングの特異性決定機構の理解を大きく進めるものである。またシェディングは炎症性疾患・がん・神経変性疾患などの発症に関与することが知られており、シェディングに不利な条件(=酸性アミノ酸)の発見はこれらの疾患の治療方法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ectodomain shedding (shedding) is a post-translational modification mechanism that cleaves a membrane protein in the vicinity of the membrane and solubilizes the extracellular region. In this study, through analysis of the adhesion molecule ALCAM, whose shedding susceptibility changes depending on the presence or absence of alternative exon encoding the vicinity of the membrane, it was clarified that acidic amino acids encoded by the selective exon are required for conferring shedding resistance. Furthermore, it was clarified that the number of acidic amino acids is important, not the position, and that shedding resistance can be imparted even if acidic amino acids are introduced into other membrane proteins.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：細胞外領域シェディング 選択的スプライシング 接着分子 酸性アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

細胞外領域シェディング（以下シェディング）は細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質を膜近傍で切断し、細胞外領域ほぼ全体を可溶化する翻訳後修飾機構であり（図1）切断される膜タンパク質だけではなくそれを発現する細胞の機能をも不可逆に制御する影響力の強い分子機構である。しかしながら、その影響力の強さに反して、シェディングされる膜タンパク質に共通するアミノ酸配列上の特徴がないことや、シェディング責任酵素である ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーメタロプロテアーゼの基質特異性が低いことなどから、シェディングの特異性を決める分子機構はほとんど明らかにされていなかった。

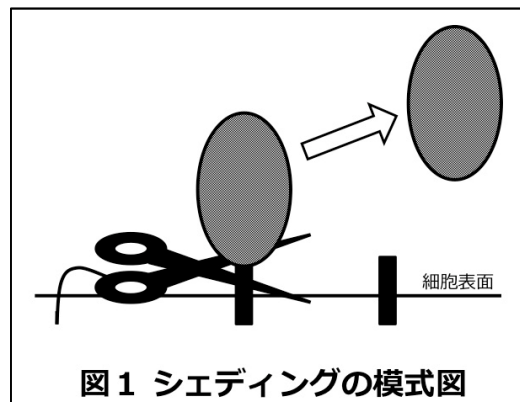


図1 シェディングの模式図

研究代表者は、CADM1 (cell adhesion molecule 1) と ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) という2つの接着分子について、細胞外領域膜近傍をコードする全長の3%にも満たない短い選択的エキソンの有無によって、シェディング感受性が180度転換することを明らかにしていた（図2）。この知見は、これらの接着分子の選択的エキソンがシェディング感受性を決める大事な要素を含んでいることを示唆していた。また CADM1 については、選択的エキソンがコードするアミノ酸が糖鎖修飾されることがシェディング耐性の付与に重要であることも明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究ではALCAMの選択的エキソンがシェディング耐性を付与する分子機構を明らかにすることを目的とした。さらにシェディング感受性と耐性のALCAMタンパク質を作り分ける機能的意義を明らかにすることも目指した。また、膜貫通領域近傍に選択的エキソンを持つ膜タンパク質をゲノムワイドにスクリーニングすることで、選択的スプライシングによってシェディング感受性が規定される膜タンパク質が他にもあるのか明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

ALCAMの選択的エキソンに変異を導入してシェディング感受性の変化を調べることで、シェディング耐性の付与に必要なアミノ酸を特定した。またシェディング感受性ALCAMの切断部位を特定した。CRISPR/Cas9システムを用いてALCAMの選択的エキソンを欠失した細胞を作製し、ALCAMのシェディングが果たす役割を解析した。膜貫通領域をコードするエキソンの隣に選択的エキソンを持つ膜タンパク質をゲノムワイドにスクリーニングし、それらの膜タンパク質のスプライシングバリエーションについてシェディング感受性を比較した。

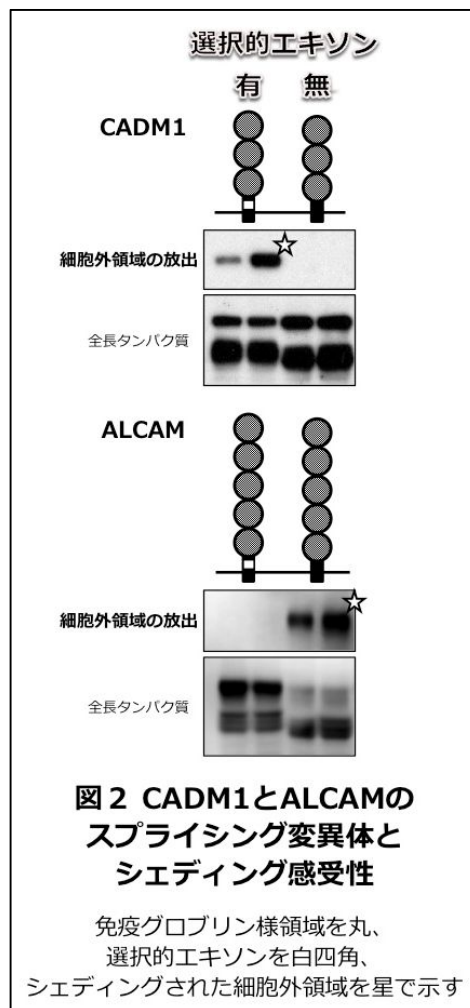


図2 CADM1とALCAMのスプライシング変異体とシェディング感受性

免疫グロブリン様領域を丸、
選択的エキソンを白四角、
シェディングされた細胞外領域を星で示す

4. 研究成果

ALCAM の選択的エクソンがコードする 6 つの酸性アミノ酸を中性アミノ酸に置換したところ、シェディング感受性に变化したことから、これらの酸性アミノ酸が ALCAM をシェディング耐性に行っていることがわかった(図3)。6 つの酸性アミノ酸を N 末端側と C 末端側から順に置換して、どのアミノ酸がシェディング耐性の付与に必須なのか解析したところ、特定の酸性アミノ酸が重要なのではなく、酸性アミノ酸の数がシェディング耐性の付与に重要であることがわかった。シェディング感受性の ALCAM バリエーションに酸性アミノ酸を導入するとシェディング耐性になることと、シェディング耐性の ErbB4 の酸性アミノ酸を中性アミノ酸に置換するとシェディング感受性になることもわかり、酸性アミノ酸に広く膜タンパク質をシェディング耐性にする効果があることがわかった。

またシェディング感受性 ALCAM の切断部位と、酸性アミノ酸を中性アミノ酸に置換してシェディング感受性にした ALCAM の切断部位を同定し、これらのシェディング切断部位と細胞膜との距離がほぼ一定であることがわかった。これらの結果から、シェディングの基質特異性は、これまで漠然と想定されていた「有利な条件」の存在ではなく、シェディング切断部位近傍での「不利な条件の不在」によって規定されることがわかり、シェディングの特異性決定機構に対する理解が飛躍的に深まった。

CRISPR/Cas9 システムを用いて ALCAM の選択的エクソンを欠失したマクロファージ細胞を構築したところ、野生型の細胞に比べて運動能が亢進することがわかった。この結果は ALCAM のシェディングが細胞運動を制御している可能性を示唆していた。

膜貫通領域の隣に選択的エクソンを持つ膜タンパク質をスクリーニングしたところ、複数の膜タンパク質が同定された。そのうちの 1 つについて、スプライシングバリエーションごとのシェディング感受性の違いが見られている。現在これらの膜タンパク質のシェディング切断部位の同定を進めているところである。

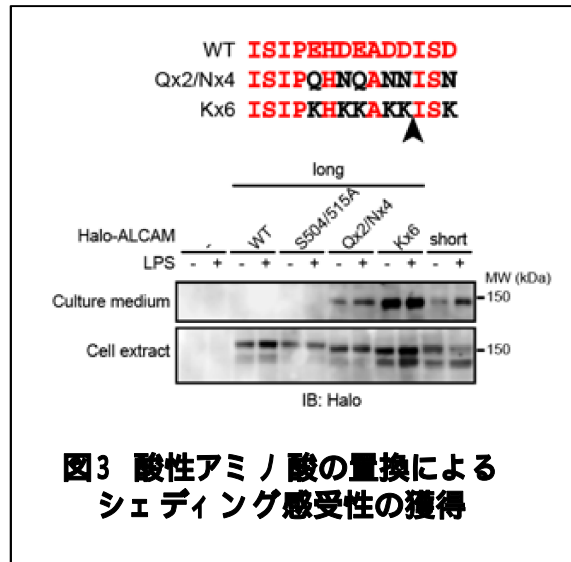


図3 酸性アミノ酸の置換によるシェディング感受性の獲得

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hanafusa Hiroshi, Yagi Takuya, Ikeda Haruka, Hisamoto Naoki, Nishioka Tomoki, Kaibuchi Kozo, Shirakabe Kyoko, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 132
2. 論文標題 LRRK1 phosphorylation of Rab7 at S72 links trafficking of EGFR-containing endosomes to its effector RILP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs228809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.228809	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 -

1. 著者名 Iwagishi Ryo, Tanaka Rika, Seto Munenosuke, Takagi Tomoyo, Norioka Naoko, Ueyama Tomoe, Kawamura Teruhisa, Takagi Junichi, Ogawa Yoshihiro, Shirakabe Kyoko	4. 巻 295
2. 論文標題 Negatively charged amino acids in the stalk region of membrane proteins reduce ectodomain shedding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12343 ~ 12352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013758	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中里佳、岩岸遼、高木淳一、白壁恭子
2. 発表標題 膜タンパク質のシェディング切断部位決定機構の解析
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩岸遼、田中里佳、白壁恭子
2. 発表標題 酸性アミノ酸クラスターによるシェディング感受性制御機構の解析
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Shirakabe, Junichi Takagi, Yoshihiro Ogawa, Seisuke Hattori
2. 発表標題 Susceptibility to ectodomain shedding of membrane proteins is determined by alternative splicing
3. 学会等名 11th General Meeting of the International Proteolysis Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩岸遼、白壁恭子
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたSIRPaのスパライシングバリエーションの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸宗之助、川村晃久、黒柳秀人、白壁恭子
2. 発表標題 選択的スパライシングによるCADM1のシェディング感受性制御が細胞の分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中里佳、白壁恭子
2. 発表標題 膜タンパク質のシェディングを介した亜鉛シグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花房洋、八木拓也、西岡明生、貝淵弘三、白壁恭子、松本邦弘
2. 発表標題 LRRK1はRab7 Ser-72をリン酸化し、エフェクター分子RILPによるEGFR含有エンドソームの輸送を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白壁恭子
2. 発表標題 あるがままで道を拓こう
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白壁恭子
2. 発表標題 膜タンパク質シェディングの選択的スプライシングによる制御
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白壁恭子、大村卓也、柴垣芳夫、高木淳一、村上善則、小川佳宏
2. 発表標題 接着分子CADM1のシェディング感受性は選択的スプライシングと糖鎖修飾により規定される
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 白壁恭子
2. 発表標題 適応応答である細胞外領域シェディングの特異性維持機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩岸遼、高木智代、植山萌恵、川村晃久、白壁恭子
2. 発表標題 膜タンパク質のストーク領域に存在する酸性アミノ酸が細胞外ドメインシェディングを抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸宗之助、田中里佳、高木淳一、白壁恭子
2. 発表標題 ADAM17による細胞外ドメインシェディングは細胞表面と切断部位の距離に依存する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青井佑里香、白壁恭子
2. 発表標題 細胞外ドメインシェディングがRab7の翻訳後修飾に与える影響の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木智代、白壁恭子
2. 発表標題 ALCAMのシェディングによる細胞運動能制御機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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