

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780219

研究課題名（和文） 新規なアポトーシス誘導因子の機能解明

研究課題名（英文） Study in function of novel apoptosis inducing factor

研究代表者

叶内 宏明（KANOUCHI HIROAKI）

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：10351884

研究成果の概要：

新規なアポトーシス誘導因子である Perchloric acid-soluble protein (PSP) の翻訳阻害作用は本実験では認められなかった。PSP の C 末端側に存在する IEIEAIAV 配列は核外移行シグナルとして機能し、N 末端、C 末端側はそれぞれ核の異形、細胞死誘導抑制に関わる可能性を見いだした。Two hybrid screening によって PSP と相互作用する蛋白質の遺伝子が得られた。HRPT について検討した結果、PSP と結合するが、HRPT 酵素活性に PSP は関与しなかった。PSP に対する新たな抗体作製がきっかけとなり、PSP が複数の高次構造をとることを明らかにした。PSP は肝臓組織中で 3 量体として存在し、蛋白質分解酵素に対して抵抗性があるが、培養細胞中 PSP は単量体、もしくは 3 量体よりも大きな構造をとっており、蛋白質分解酵素に対する抵抗性は低い。このような高次構造変化が PSP の多彩な性質に調節に関与している可能性があるが、生理的な意義等詳細は今後、検討されなければならない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,500,000	180,000	2,680,000

研究分野：農学・獣医学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・生理

キーワード：perchloric acid-soluble protein, two hybrid screening, prion

1. 研究開始当初の背景

Perchloric acid-soluble protein (PSP) は脂肪酸結合能、シャペロン活性、翻訳阻害活性等を有する。また、PSP の過剰発現は細胞死誘導につながる事が明らかにされているが、そのメカニズムは未解明である。PSP の性質として細胞質および小胞体に存在し、小胞体ストレスによって細胞核内に移行する。

PSP は約 137 のアミノ酸（分子量 14,303）からなるが、既知の機能ドメインが存在しない。しかしながら、多くの生物種に相同性の高い蛋白質が存在することから、重要な生理機能を有することが推測されるが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

PSP の細胞死誘導作用が翻訳阻害の結果であるのか、また、PSP の変異体を作製し細胞内局在性と細胞死の関係を明らかにする。酵母 two hybrid screening を用いて PSP と相互作用のある分子を同定し、PSP の機能との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PSP の翻訳阻害活性

T7 プロモーターの下流に GST 遺伝子を組込んだベクターを用い in vitro 転写、S35 メチオニンを添加した網状赤血球蛋白質合成を行なった。SDS-PAGE 後、合成された GST をオートラジオグラフィーで検出した。翻訳時に PSP を添加し、PSP の翻訳阻害活性を検討した。

(2) PSP 欠損変異体の細胞内発現

ΔN PSP (37-137)、 ΔC PSP (1-125)、 $\Delta N\Delta C$ PSP (37-125) の GFP 融合発現ベクターを遺伝子組換えにより作製した。各ベクターをラット肝臓細胞株に遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) Yeast two hybrid screening

PSP、 ΔN PSP (37-137)、 ΔC PSP (1-125) 遺伝子を bait 用のベクターに組換え、pray 用ベクターに肝臓 cDNA ライブラリーを組換えた。それぞれを導入した酵母から得られたクローンを β -GAL、5FOA、-Ura、3AT の寒天培地でセレクションを行なった。得られたクローンの遺伝子は DNA シーケンスによって同定し、哺乳動物 GST 発現ベクターに組換えた。組換え GST 発現ベクターをラット肝臓細胞株に導入後、GST-pull down 法を行なった。

(4) PSP の高次構造

抗 PSP 抗体を大腸菌で産生させたリコンビナント PSP を抗原として作製した。肝臓ホモジネートおよびラット肝臓細胞抽出液を Sephadex G-200 を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。PSP の蛋白質分解酵素耐性の試験は、protease K で各サンプルを処理した後、抗 PSP 抗体を用いて PSP を検出した。

4. 研究成果

(1) PSP の翻訳阻害活性

PSP に翻訳阻害活性があることが報告されているが、本実験ではその活性が認められなかった。PSP の翻訳阻害作用の有無について、再検討される必要がある。

(2) PSP 欠損変異体の細胞内発現

GFP と融合した PSP を発現するベクターをラット肝臓細胞に導入した結果、蛍光を発する多くの細胞は浮遊したが、一部の細胞はディッシュに付着したままであり観察可能であ

った。

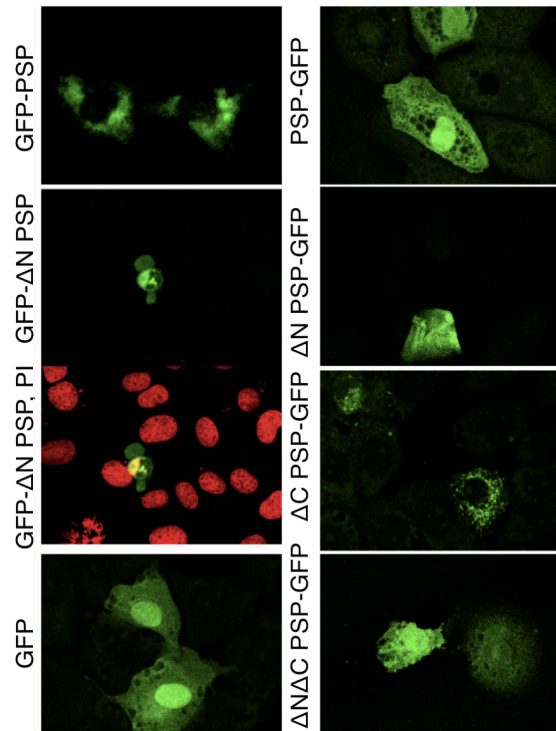


図1

GFP-PSP は細胞核外に、PSP-GFP は細胞質および細胞核内で発現が認められた (図1)。PSP の C 末端には核外輸送シグナルに似た配列 (IEIEAIAV) が存在する。この配列を GST に融合させたリコンビナント蛋白質を精製し、蛍光標識後に細胞に導入した結果、GST の細胞核外への以降が認められた (図2)。

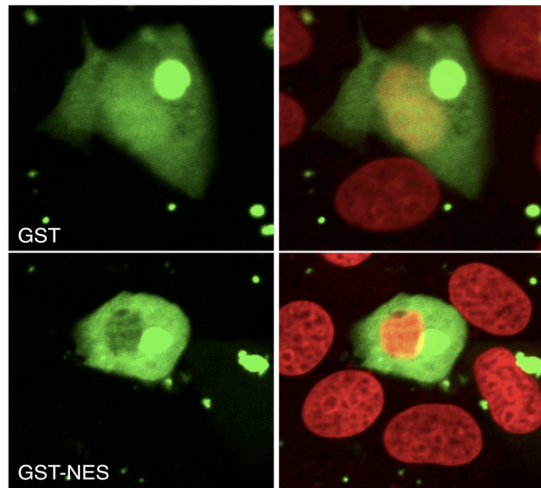


図2

一方、欠損変異体 PSP を細胞で発現させた場合、GFP- ΔN PSP を発現する細胞では細胞核の形態に異常が認められ、 ΔN PSP-GFP を発現する細胞は細胞の形態が異常であった。GFP- ΔC PSP を発現する細胞は検出できなかったが、 ΔC PSP-GFP は細胞質でドット状に認められた。PSP のペルオキシソーム局在を示す報告がある。ドット状に観察された PSP

はペルオキシソームに移行している可能性があるが、検討される必要である。ΔNΔC PSP-GFP は細胞全体に発現し、細胞の形態は異常であった。先に示した PSP の C 末が細胞核外以降シグナルに関わっていることを考慮すると、PSP は C 末端側以外に核外以降シグナルを有している、もしくは N 末端側にペルオキシソーム等他の細胞内小器官移行シグナルを有していると推測される。また、N 末端側を欠損した場合にはいずれの場合にも細胞の形態に異常が認められ、N 末端側が PSP の細胞死誘導作用を抑制する性質を有している可能性がある。

(3) Yeast two hybrid screening

bait に完全長の PSP を用いた場合、得られたクローンはすべて PSP 遺伝子であった。N 末端欠損および C 末端欠損 PSP を bait にしてスクリーニングを行なった。C 末端欠損 PSP を導入した場合にはクローンを得ることが出来なかった。②の実験において GFP-ΔC PSP の発現が動物細胞内で認められない結果に関連する可能性がある。一方、N 末端欠損 PSP を bait にした場合に得られたクローンには、PSP 遺伝子以外の遺伝子が認められた (表)。

Accession No.	gene name
M58308	Histidase
AF311311	P116RIP
M63983	HRPT
BC003306	unknown
BC023675	unknown

Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) と PSP の結合を GST pull down 法で確認されたが、PSP は HPRT 活性に影響を与えなかった。他の遺伝子と PSP の相互作用は今後、検討されなければならない。

(4) PSP の高次構造

これまで PSP の検出に用いてきた抗 PSP 抗体の残量が少なくなったため、新たに、抗体を作製する必要があった。これまで使用した抗体 (αPSP-rat) の抗原はラット肝から精製した PSP であり、新たに作製した抗体 (αPSP-rec) は大腸菌で産生させたリコンビナ

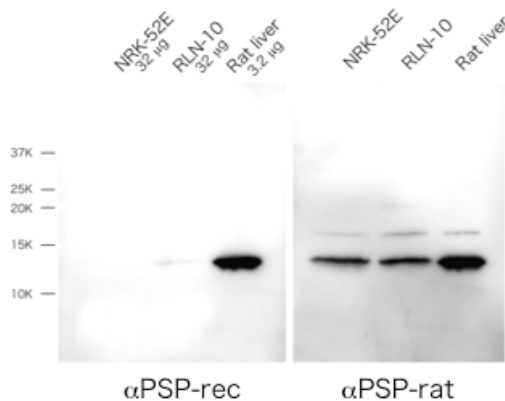


図3

ント PSP を精製して用いた。作製した αPSP-rec のチェックを行なった結果、これまで使用してきた αPSP-rat の結果と一部異なる結果が培養細胞を用いた結果で得られた。培養細胞中 (ラット肝臓細胞株, RLN-10; ラット腎臓細胞株, NRK-52E) の PSP は αPSP-rat で検出されるが、新たに作製した αPSP-rec ではほとんど検出されない。一方、肝臓や他のラット組織を用いた場合にはこのような違いは認められなかった (図3)。PSP の三次構造はスクレイピー型プリオンタンパク質 (PrP(Sc)) と酷似している。通常、プリオンタンパク質は正常型 (PrP(C)) の構造をとっているが、弧発的、もしくは PrPSc との接触によって PrP(C) から PrPSc への構造変化が起こり不溶性・蓄積し、海綿状脳症発症につながる。PSP の高次構造が複数存在する可能性を明らかにするため、培養細胞中と肝臓組織のホモジネートをゲル濾過クロマトグラフィーで分離し、それぞれの高次構造を比較した。その結果、肝臓組織中の PSP は三量体とほぼ一致する分子量のピークとして認められ、一方、培養細胞中 PSP は単量体、もしくは三量体よりも大きな分子量と一致するピークとして認められた (図4)。

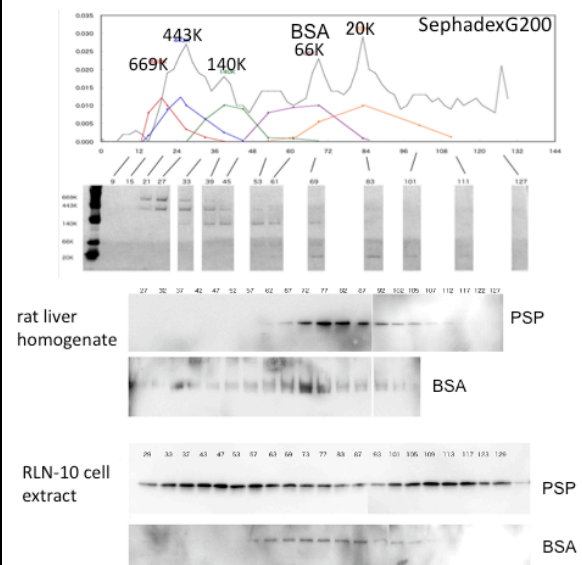


図4

プリオンタンパク質の蛋白質分解酵素に対する耐性は高次構造により変化する。PrP(C) は耐性が低く、PrP(Sc) は耐性が高い。PSP について、蛋白質分解酵素の耐性を検討した結果、肝臓中 PSP は耐性が高いのに対して、培養細胞中 PSP は耐性が低かった (図5)。三量体 PSP の結晶構造解析が報告されており、PrP(Sc) と類似するのは三量体 PSP の場合である。すなわち、PSP は単量体もしくは三量体よりも大きな構造をしている場合は PrP(Sc) と大きく異なる高次構造をしており、蛋白質分解酵素の耐性が低いことが推測さ

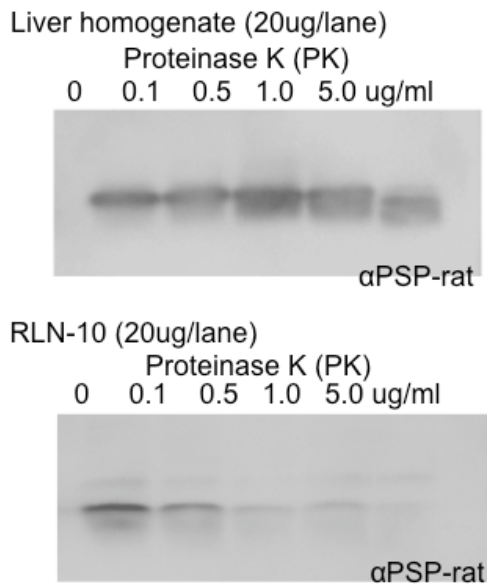


図5

れる。

PSP 蛋白質の過剰発現は細胞死を誘導するが、生体内、特に肝臓や腎臓では発現量が高い。これらの組織において PSP が細胞毒性を発揮しない原因が不明であったが、PSP の高次構造に起因する可能性を見いだした。

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 5 件)

- ① Ikeda M, Kanouchi H, Minatogawa Y. Characterization of peroxisomal targeting signals on alanine: glyoxylate aminotransferase. *Biol Pharm Bull.* 31, 131-134, 2008 査読有
- ② Okamoto T, Tone S, Kanouchi H, Miyawaki C, Ono S, Minatogawa Y. "Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue." *Cytotechnology*, 54, 107-113, 2007 査読有
- ③ Tone S, Sugimoto K, Tanda K, Suda T, Uehira K, Kanouchi H, Samejima S, Minatogawa Y, Earnshaw WC. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis *Experimental Cell Research*, 313, 3635-3644, 2007 査読有

④ Mitsuiki S, Moriyama Y, Goto M, Okabe M, Kanouchi H, Furukawa K, Oka T. "Identification of an alkaliphilic actinomycetes producing PrpSc-degrading enzyme." *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 42, 11-16, 2007 査読有

⑤ Kanouchi H, Nishizaki H, Okamoto T, Mitsuiki S, Tone S, Minatogawa Y, Oka T. Growth inhibition of *Escherichia coli* by overexpression of rat perchloric acid-soluble protein. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 42, 5-9, 2007 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 叶内宏明、陳田洋介、満生慎二、岡達三「プリオンと同様な性質を有する過塩素酸可溶性タンパク質」第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 9～12 日 於 神戸ポートアイランド

② 叶内宏明、陳田洋介、満生慎二、岡達三「過塩素酸可溶性タンパク質の高次構造多様性」平成 20 年度日本生化学会九州支部例会 2008 年 5 月 17～18 日 於 九州大学農学部 福岡

③ 叶内宏明、芝野秀和、岡部正明、岡達三「筋分化における過塩素酸可溶性蛋白質の発現」第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007 年 12 月 11 日～15 日 於 パシフィコ横浜ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル 横浜

[図書] (計 1 件)

① Kanouchi H, Heat Shock Proteins: Chapter II - Perchloric Acid-Soluble Protein, Nova Science Publishers, 29-35, 2008

[その他]

ホームページ

<http://w3vet.agri.kagoshima-u.ac.jp/V-M01/bunshibyoutai01/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶内 宏明 (KANOUCHI HIROAKI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号: 10351884