

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790205
 研究課題名（和文） 上皮系細胞におけるアピカルソーティングの分子基盤
 研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying the apical sorting of membrane proteins in epithelial cells
 研究代表者
 村田 陽二（MURATA YOJI）
 群馬大学・生体調節研究所・助教
 研究者番号：60400735

研究成果の概要:本研究では、受容体型チロシンホスファターゼ SAP1、PTP-R0 をモデルとして、上皮系細胞における膜型分子のアピカル面への局在制御機構の解明を目指した。その結果、SAP1、PTP-R0 のアピカル面への局在化には、両者の細胞内領域を除く領域が必須であるが、その一方で、膜型分子の細胞膜上での発現制御に関与する Grb2 と相互作用して、アピカル面での局在やその発現が制御される可能性も示唆された。また、SAP1 の下流で機能するシグナル分子の同定し、これらの分子が SAP1 の局在制御に関与するかについて解析を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：上皮系細胞、アピカル、受容体型チロシンホスファターゼ、SAP1

1. 研究開始当初の背景

上皮系細胞はアピカル面（先端面）-バソラテラル面（側底面）と呼ばれる機能的に異なる非対称性の細胞構造を持つ極性細胞であり、種々の機能分子を細胞内の特定の部位に配置（局在化）させることにより極性を持った細胞構造の形成・維持が行われ、多種多様な細胞機能の発現が制御されている。このような上皮系細胞において機能分子の一つである膜型分子がアピカル面やバソラテラル面へと局在化するこ

とは、外界からの的確な刺激の受容、細胞膜上で相互作用する他の膜型分子の局在やその活性を制御する上で重要であり、その局在制御の分子メカニズムの解析が精力的に行われてきた。特にバソラテラル面への局在化の制御機構については分子レベルでの解析が進んでおり、多くの膜型分子の局在化にはその細胞内領域に局在制御に関与するアミノ酸配列が存在し、チロシン酸基をベースにした Yxx ϕ および NPxY モチーフ、また di-leucine やロイシンリ

ピートモチーフなどがその配列として同定されている。膜型分子はこれらいくつかの配列を介して上皮系細胞のバソラテラル面への分別輸送を制御するアダプター分子である AP1B や AP4 と結合して複合体を形成することで、特異的にバソラテラル面へと輸送され配置されることが明らかとなっている。一方、アピカル面への膜型分子の局在化については、その細胞外領域の N 型糖鎖修飾をはじめ、細胞内・外領域、膜貫通領域やその近傍の領域に局在制御領域が存在すること、さらに脂質ラフトとの相互作用、また、輸送小胞と細胞膜の融合を制御する Syntaxin-3 との相互作用などが関与することが報告はされているが、未だ膜型分子のアピカル面への局在制御機構の具体的かつ詳細な分子メカニズムについては十分に明らかとはなっていない。

研究代表者は受容体型チロシンホスファターゼである SAP1 および PTP-RO の上皮系細胞での細胞内局在を検討し、両者がアピカル面に限局し発現することを見出していた。SAP1 は、研究代表者の所属する研究グループにおいて独自に見出された一回膜貫通型の受容体型チロシンホスファターゼであり、細胞外領域にフィブロネクチン様ドメイン、細胞内領域に 1 つのチロシンホスファターゼドメインを持つ。研究代表者の研究グループでのこれまでの解析から、SAP1 は細胞増殖や細胞運動を抑制的に制御することなどを明らかにしている。一方、PTP-RO は SAP1 と同様なドメイン構造をもつ一回膜貫通型の受容体型チロシンホスファターゼであり、上皮系細胞、神経系細胞で発現が認められ、マウス個体において腎臓の形態形成、神経細胞の突起伸長や軸索ガイダンスの制御に関与することなどが報告されている。しかしながら、上皮系細胞における両者の細胞内局在および、その分子メカニズムについては、十分に明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が研究開始時に得ていた知見をもとに、膜型分子の上皮系細胞におけるアピカル面への局在制御の分子メカニズムにつき、共通の機能ドメイン構造をもつチロシンホスファターゼである SAP1 および PTP-RO をモデルとして解明することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) アピカル面への局在化の責任領域の決定：上皮系細胞において膜型分子のアピカル面やバソラテラル面への局在化には、その細胞外領域、細胞膜貫通領域、また

は細胞内領域に責任領域が存在することが知られている。そこで、SAP1 および PTP-RO の細胞外領域および細胞内領域の欠変異体を作製し、イヌ腎上皮細胞である MDCK 細胞に発現させることにより、これら膜型分子のアピカル面への局在化制御に関与する領域を検討した。

- (2) N 型糖鎖修飾による局在制御の関与：上皮系細胞において膜型分子のアピカル面への局在化には、その細胞外領域の N 型糖鎖修飾による制御が報告されている。SAP1、PTP-RO は細胞外領域に N 型糖鎖修飾を受けると予想されるアミノ酸配列 (N-x-T/S) をもつ。そこで、SAP1、PTP-RO が N 型糖鎖修飾を受けるかにつき検討するとともに、SAP1 または PTP-RO を発現した MDCK 細胞に対して N 型糖鎖修飾の阻害剤であるツニカマイシン処理を行い、両者のアピカル面への局在化に対する影響を検討した。
- (3) 局在制御に関与する細胞外・内領域結合タンパク質の探索と同定：膜型分子のアピカル面への局在化には、トランスゴルジからアピカル面への輸送やアピカル面を構成する細胞膜上でのこれら膜分子の安定化が重要であると考えられている。また、これらの制御にはアピカル面に局在する膜型分子と相互作用する分子が関与することが知られている。そこで、SAP1 および PTP-RO の細胞外、細胞内領域に相互作用する分子をアフィニティー精製により同定を進めるとともに、SAP1 および PTP-RO が持つタンパク質相互作用に関与する可能性の高いアミノ酸モチーフに結合する分子との結合能について検討した。
- (4) SAP1 シグナル経路に関与する分子の同定：アピカル面への局在化やその局在の安定化に関与する分子には、SAP1 により脱リン酸化を受ける基質もしくはそれ以外の SAP1 シグナルに関与するタンパク質などである可能性が考えられる。そこで、SAP1 遺伝子破壊 (KO) マウス由来の細胞を用いて、野生型マウス由来細胞に比べチロシンリン酸化の促進しているタンパク質を抗チロシンリン酸化抗体カラムによるアフィニティー精製後、質量分析法にて同定した。

4. 研究成果

膜型分子の局在機構の解析に有効なイヌ腎上皮細胞である MDCK 細胞を用い SAP1 のアピカル面への局在制御に関与する責任領域の検討を行なったところ、SAP1 の細胞内領域よりはむしろ膜貫通領域を含めた細胞外領

域がアピカル面への局在化に重要であることが明らかとなった。また、PTP-R0 も SAP1 と同様に細胞内領域よりはむしろ膜貫通領域を含めた細胞外領域がアピカル面への局在化に関与することが示唆された。一方、膜型分子のアピカル面への局在化には、その細胞外領域に受ける N 型糖鎖修飾が関与することが示唆されている。実際に、SAP1 と PTP-R0 は細胞外領域に N 型糖鎖修飾を受けると予想されるアミノ酸配列 (N-x-T/S) を持つ。そこで、N 型糖鎖修飾が両者の局在制御に関与するかにつき検討を行なった。その結果、SAP1、PTP-R0 を過剰発現する HEK293T 細胞を N 型糖鎖修飾の阻害剤であるツニカマイシンで処理したところ、両者の見かけ上の分子量の減少が認められたことから N 型糖鎖修飾を受けていることが確認された。SAP1 について、さらに解析を進め、MDCK 細胞に対してツニカマイシン処理を行なうことにより SAP1 のアピカル面への局在化を検討した。しかしながら、SAP1 のアピカル面への局在化には著明な変化が認められず、その局在の制御に N 型糖鎖修飾の関与は低いと考えられた。

膜型分子のアピカル面への局在化には、トランスゴルジからアピカル面への輸送やアピカル面を構成する細胞膜上での膜型分子の安定化が重要であり、これらの制御には膜型分子と相互作用するタンパク質が関与すると考えられている。そこで、詳細な上皮細胞での SAP1、PTP-R0 のアピカル面への局在化制御機構を明らかにするため、SAP1 に注目し、その結合タンパク質の同定を試みた。SAP1 の細胞外領域に結合するタンパク質の検索と同定を行なう目的で、MDCK 細胞を用いて細胞内領域のほぼすべてを Myc タグに置き換えた SAP1 を過剰発現する細胞株の樹立を行なった。さらに、現在、この樹立した細胞を用いて抗 Myc タグ抗体カラムによるアフィニティー精製を行い、結合タンパク質の単離と同定を進めつつある。一方、SAP1 および PTP-R0 の細胞内領域に類似したアミノ酸モチーフ (YxxN モチーフ) が存在し、このモチーフを介して SH2 ドメインを持つアダプター分子である Grb2 と両者が結合することを見出した。また、YxxN モチーフがチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的に Grb2 と結合することも明らかとなった。Grb2 は、EGF 受容体などの受容体型チロシンキナーゼの下流で機能するシグナル分子の一つであり、これら受容体のエンドサイトーシスを制御する分子であることが知られている。このことから、現在、SAP1 や PTP-R0 のアピカル面での局在や発現制御に Grb2 との会合が関与するかにつき更なる解析を進めている。

ところで、受容体型タンパク質の細胞膜上での発現制御には Grb2 などのタンパク質チロシンリン酸化シグナル系の制御分子が関

与することが知られている。また、受容体型タンパク質の下流で機能するシグナル伝達分子とその制御分子が一致もしくは密接に関連していることも知られている。そこで、SAP1 の下流で機能するタンパク質の検索を行なう目的で、SAP1 KO マウスを用いた解析を試みたところ、野生型マウスに比べ SAP1 KO マウス由来の消化管粘膜上皮細胞において強くチロシンリン酸化を受ける複数のタンパク質が存在することを見出した。すなわち、これらのタンパク質は SAP1 の欠損によりリン酸化状態が変化したと考えられ、SAP1 シグナルにおけるシグナル伝達分子として機能している可能性が高いと考えられた。そこでさらに、抗リン酸化チロシン抗体カラムを用いたアフィニティー精製を行い、これらのタンパク質の精製と同定を試みた。その結果、電気泳動上、約 100 kDa および 60 kDa の分子量に相当する複数のタンパク質の同定に至った。今回同定されたタンパク質は、SAP1 シグナルの制御分子であり、また、SAP1 のアピカル面への局在化やアピカル面での発現制御に寄与する可能性が考えられることから、これらのタンパク質につき更なる解析を進めている。

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 9 件)

- (1) Matozaki T., Murata Y., Okazawa H., and Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol.*, 19 巻, 72-80, 2009, 査読有
- (2) Sadakata H., Okazawa H., Sato T., Supriatna Y., Ohnishi H., Kusakari S., Murata Y., Nishiyama U. Minegishi, T., Harada A., and Matozaki T. SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that modulates intestinal tumorigenesis. *Genes Cells*, 14 巻, 295-308, 2009, 査読有
- (3) Motegi S., Okazawa H., Murata Y., Knazawa Y., Saito Y., Kobayashi H., Ohnishi H., Oldenborg PA., Ishikawa O., and Matozaki T. Essential Roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol. Lett.*, 121 巻, 52-60, 2008, 査読有
- (4) Kobayashi M., Ohnishi H., Okazawa H., Murata Y., Hayashi Y., Kitamura T., and Matozaki T. Expression of SHPS-1 in pancreatic β cells and its role in promotion of insulin secretion and

protection against diabetes. *Endocrinology*, 149 巻, 5662-5669, 2008, 査読有

- (5) Okuzawa C., Kaneko Y., Murata Y., Miyake A., Saito Y., Okajo J., Tomizawa T., Kaneko Y., Okazawa H., Ohnishi H., Matozaki T., and Nojima Y. Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371 巻, 561-566, 2008, 査読有
- (6) Miyake A., Murata Y., Okzawa H., Ikeda H., Niwayama Y., Ohnishi H., Hirata Y., and Matozaki T. Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes Cells*, 13 巻, 209-219, 2008, 査読有
- (7) Kusakari S., Ohnishi H., Jin F. J., Kaneko Y., Murata T., Murata Y., Okazawa H., and Matozaki T. Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system. *J. Cell Sci.*, 121 巻, 1213-1223, 2008, 査読有
- (8) Tomizawa T., Kaneko Y., Kaneko Y., Saito Y., Ohnishi H., Okajo J., Okuzawa C., Ishikawa-Sekigami T., Murata Y., Okazawa H., Okamoto K., Nojima H., and Matozaki T. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in SHPS-1 mutant mice. *J. Immunol.*, 179 巻, 869-877, 2007, 査読有
- (9) Okajo J., Kaneko Y., Murata Y., Tomizawa T., Okuzawa C., Saito Y., Kaneko Y., Ishikawa-Sekigami T., Okazawa H., Ohnishi H., Matozaki T., and Nojima H. Regulation by SHPS-1 of α -GalCer-induced antimetastatic activity. *J. Immunol.*, 178 巻, 6164-6172, 2007, 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 村田陽二、草苺百合子、三宅敦子、岡澤秀樹、大西浩史、的崎尚 受容体型チロシンホスファターゼSAP-1 のチロシンリン酸化とその生理的意義。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 月 12 日、神戸国際会議場
- (2) 定方久延、村田陽二、岡澤秀樹、Yana Supriatna、佐藤隆史、大西浩史、原田彰宏、峯岸敬、的崎尚、腸微絨毛特異名発現を示すチロシンホスファターゼ

SAP-1 による腸管腫瘍形成の制御。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 月 12 日、神戸国際会議場

- (3) Yana Supriatna、岡澤秀樹、村田陽二、大西浩史、的崎尚、クラス 3 受容体型チロシンホスファターゼの機能と病態への関与。第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 月 12 日、神戸国際会議場
- (4) 齋藤泰之、金子和光、岩村紘子、金澤義丈、村田陽二、大西浩史、野島美久、的崎尚、SHPS-1 は樹状細胞の恒常性に重要である。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日-12 月 3 日、京都国際会館
- (5) 金澤義丈、齋藤泰之、ヤナ、スプリアトナ、村田陽二、岡澤秀樹、大西浩史、下瀬川透、的崎尚、腸管におけるSHPS-1 発現と腸管免疫制御。第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日-12 月 3 日、京都国際会館
- (6) 的崎尚、岡澤秀樹、村田陽二、大西浩史、チロシンホスファターゼによるがん、炎症性腸炎の制御。第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日-10 月 30 日、名古屋国際会議場
- (7) Saito Y., Iwamura H., Kanazawa Y., Murata Y., Ohnishi H., Kaneko Y., Nojima Y., and Matozaki T. Defective Development of Dendritic Cells in SHPS-1 Mutant Mice. 第 8 回国際プロテインホスファターゼカンファレンス、2008 年 10 月 28 日-10 月 30 日、前橋テルサ
- (8) Kusakari S., Ohnishi H., Okazawa H., Murata T., Murata Y., and Matozaki T. Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system. 第 8 回国際プロテインホスファターゼカンファレンス、2008 年 10 月 28 日-10 月 30 日、前橋テルサ
- (9) 齋藤泰之、金子和光、岩村紘子、金澤義丈、村田陽二、大西浩史、野島美久、的崎尚、Essential roles of SHPS-1 in homeostasis of dendritic cells. 第 10 回国際樹状細胞シンポジウム、2008 年 10 月 1 日-10 月 5 日、神戸国際会議場
- (10) Sadakata H., Okazawa H., Supriatna Y., Ohnishi H., Murata Y., and Matozaki T. SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that regulates intestinal tumorigenesis. FASEB Summer Research Conferences, 2008 年

- 7月13日-7月18日, Snowmass, Colorado, USA
- (11) 大西浩史、草苺伸也、村田考啓、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚、CD47とSHPS-1のトランスエンドサイトーシスとCD47-SHPS-1系の制御における役割。第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月29日-7月1日、パシフィコ横浜
- (12) 小林雅樹、大西浩史、岡澤秀樹、村田陽二、林由里子、北村忠弘、的崎尚、受容体型膜蛋白質SHPS-1のインスリン分泌制御における機能解析。第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008年5月22日-5月24日、東京国際フォーラム
- (13) 三宅敦子、村田陽二、池田洋、岡澤秀樹、大西浩史、平田結喜緒、的崎尚、SHPS-1によるToll-like receptorを介したサイトカイン産生の制御。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-12月13日、パシフィコ横浜
- (14) 的崎尚、大西浩史、岡澤秀樹、村田陽二、CD47-SHPS-1シグナルシステムの機能とその分子機構。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-12月13日、パシフィコ横浜
- (15) Miyake A., Murata Y., Okazawa H., Ikeda H., Ohnishi H., Hirata Y., and Matozaki T., Regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-mediated cytokine production in macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、グランドプリンスホテル新高輪
- (16) Saito Y., Kaneko Y., Kaneko Y., Okuzawa C., Sekigami T., Okajo J., Tomizawa T., Murata Y., Okazawa H., Ohnishi H., Matozaki T., and Nojima Y. An essential role of SHPS-1 in proper development of dendritic cells for induction of Th17-mediated autoimmune diseases. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、グランドプリンスホテル新高輪
- (17) Motegi S., Okazawa H., Kobayashi H., Murata Y., Ohnishi H., Ishikawa O., and Matozaki T. Regulation by SHPS-1 of skin immunity and of Toll-like receptor-mediated cytokine production. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、グランドプリンスホテル新高輪
- (18) Murata T., Ohnishi H., Kusakari S., Murata Y., Okazawa H., Furuya N., and Matozaki T. Regulation by CD47-SHPS-1 system of neurite development. Neurosciense 2007, 2007年11月3日-11月7日, San Diego Convention center
- (19) 村田考啓、大西浩史、草苺伸也、村田陽二、岡澤秀樹、古屋信彦、的崎尚、Regulations by CD47-SHPS-1 system of neurite development. 第30回日本神経科学大会 第50回日本神経化学学会大会 第17回日本神経回路学会大会 合同大会、2007年9月10日-9月12日、パシフィコ横浜
- (20) 大西浩史、草苺伸也、金鋒杰、村田考啓、篠原将彦、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚、Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its molecular mechanism. 第30回日本神経科学大会 第50回日本神経化学学会大会 第17回日本神経回路学会大会 合同大会、2007年9月10日-9月12日、パシフィコ横浜
- (21) Murata Y., Shinohara M., Morimoto N., Okazawa H., Ohnishi H., and Matozaki T. Regulation by CD47 of epithelial cell spreading and migration and its signal transduction. EuroPhosphatases 2007, 2007年7月24日-7月28日, Aveiro, Portugal
- (22) Ohnishi H., Kaneko Y., Okazawa H., Murata Y., and Matozaki T. An essential role of SHPS-1 in development of Th17-mediated inflammatory autoimmune diseases. EuroPhosphatases 2007, 2007年7月24日-7月28日, Aveiro, Portugal
- (23) Murata Y., Shinohara M., Morimoto N., Okazawa H., Ohnishi H., Ishikawa O., and Matozaki T. Regulation by CD47 of epithelial cell spreading and migration and its signal transduction. 第59回日本細胞生物学会大会 第40回日本発生生物学会大会 合同大会、2007年5月28日-5月30日、福岡国際会議場
- (24) Okazawa H., Motegi S., Ikeda H., Morimoto N., Ishikawa-Sekigami T., Hayashi A., Murata Y., Ohnishi H., and Matozaki T. Roles of SHPS-1 and its family protein SIRP β in regulation of macrophage phagocytosis. 第59回日本細胞生物学会大会 第40回日本発生生物学会大会 合同大会、2007年5月28日-5月30日、福岡国際会議場
- (25) Ohnishi H., Murata T., Miyashita M., Kusakari S., Okazawa H., Murata Y., Itoh H., Furuya N., and Matozaki T. Regulation by CD47-SHPS-1 system of neurite development and its molecular mechanism. 第59回日本細胞生物学会大

会 第 40 回日本発生生物学会大会 合同
大会, 2007 年 5 月 28 日-5 月 30 日, 福
岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/biosig/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 陽二 (MURATA YOJI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号 : 60400735

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :