

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07357

研究課題名(和文) II型膜タンパク質CKAP4の個体レベルでの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of type II membrane protein CKAP4 at the individual level

研究代表者

原田 武志 (Takeshi, Harada)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30362768

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)：CKAP4は主に小胞体に局在し、小胞体の構造維持に関わる分子量63kDaのII型1回膜貫通タンパク質として25年以上前に同定された。CKAP4の機能についてはこれまで主に培養細胞を用いた細胞レベルでの実験によって解析されてきた。しかし、CKAP4 KOマウスについての文献報告は私共以外にはまだなく、個体レベルでの機能解析はこれまで全く行われてこなかった。私共が独自に作製したCKAP4 KOマウスを用いることで、これまで培養細胞を用いた実験で明らかになってきたCKAP4の多彩な機能が個体における糖・脂質代謝調節に如何に関連するかを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKAP4の多彩な機能が個体における糖・脂質代謝調節に如何に関連するかを明らかにすることにより、これまで明らかになっていない小胞体構造タンパク質と糖・脂質代謝調節との関連が明らかとなった。この研究から、糖尿病や脂質異常症・高血圧症・心血管疾患などの生活習慣病の病態解明につながることを期待され、医療という側面からも社会的意義も大きく、創造性の高い研究であったと考えている。

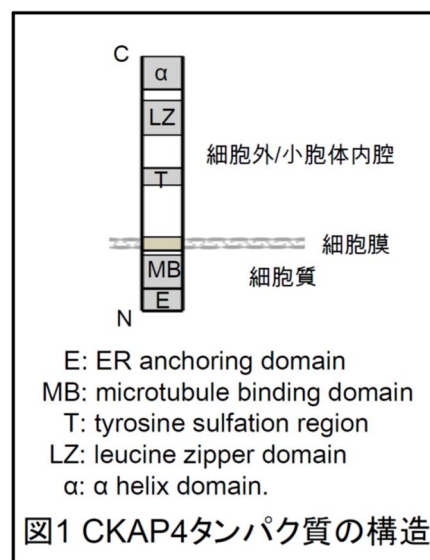
研究成果の概要(英文)：CKAP4 was identified more than 25 years ago as a type II single transmembrane protein with a molecular weight of 63 kDa that is mainly localized in the endoplasmic reticulum and is involved in the structural maintenance of the ER. However, there have been no reports on CKAP4 KO mice other than ours, and functional analysis at the individual level has not been performed at all. By using CKAP4 KO mice, we were able to clarify how the various functions of CKAP4, which have been clarified in cultured cell-based experiments, are related to the regulation of glucose and lipid metabolism in the individual.

研究分野：分子生物学

キーワード：CKAP4 ミトコンドリア 小胞体 脂質

1. 研究開始当初の背景

CKAP4(cytoskeleton-associated protein 4)は主に小胞体に局在し、小胞体の構造維持に関わる分子量 63KDa の II 型 1 回膜貫通タンパク質として 20 年以上前に同定された (Mundi, D. et al., J. Cell Biol. 1992, Schweizer, A. et al., J. Cell Sci. 1993)。CKAP4 は N 端側を細胞質側に、C 端側を小胞体内腔側に向ける II 型膜タンパク質であり (図 1) 粗面小胞体に主として存在し、微小管を束化して小胞体に係留させ、小胞体のシート状の構造を細胞中心側 (核側) に維持する役割がある。siRNA を用いて CKAP4 をノックダウンすることにより小胞体のシート状の構造が細胞周縁へ広がることや内腔の厚さが減少することが報告されている (Shibata, Y. et al., Cell 2010, Noda, C. et al., J. Biol. Chem. 2014)。一方、CKAP4 は小胞体タンパク質であるものの、ある種の細胞ではその一部が細胞膜に局在して受容体として機能することが報告された (Sandoz, P. et al., Biochem. Soc. Trans. 2015)。例えば、肺胞上皮の細胞膜に発現した CKAP4 はサーファクタントプロテイン A (SP-A) の受容体として機能し、サーファクタントのクリアランスを制御する。私の所属する研究室では、Wnt シグナル阻害分泌タンパク質 Dickkopf1 (DKK1) の細胞膜上での結合タンパク質として CKAP4 を同定した (Kimura, H. et al., J. Clin. Invest. 2016)。また、細胞膜に局在する CKAP4 は DKK1 の新規受容体として機能し、PI3 キナーゼ AKT 経路を活性化する結果、細胞増殖を促進することを見出し、DKK1 と CKAP4 が過剰発現する肺癌と膵癌、食道癌症例は予後が悪いことも明らかにした (Shinno, N. et al., Oncogene 2018)。一方、私は、CRISPR/Cas システムを用いて作製した CKAP4 ノックアウト (KO) 細胞において、これまでに報告されている小胞体の構造異常に加えて、ミトコンドリアの膜電位が低下するとともに ATP 産生が低下することを新たに見出した。しかしながら、主に小胞体に局在するタンパク質である CKAP4 がミトコンドリアの機能を制御するメカニズムは不明であった。そこで CKAP4 の新規結合タンパク質を探索し、ミトコンドリア外膜に存在するチャネルタンパク質 VDAC2 と結合することを見出した。VDAC2 はミトコンドリアと接触する小胞体領域 MAM (Mitochondria-associated membrane) において、イノシトール三リン酸受容体 (IP3R) や GRP75 と相互作用し、小胞体からミトコンドリアへの Ca²⁺ の受け渡しに関わることが報告されている。CKAP4 KO 細胞ではミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇しており、低グルコース条件下での細胞増殖が低下した。これらの CKAP4 KO 細胞で観察されたミトコンドリアの機能異常は野生型の CKAP4 ではレスキューできたが、VDAC2 と結合できない変異型 CKAP4 ではレスキューできなかった。これらの結果から CKAP4 は MAM において VDAC2 と結合し、過剰なカルシウム流入を抑制することで、ミトコンドリアの機能を制御することが示唆された。



2. 研究の目的

本研究では個体レベルでの CKAP4 の機能をミトコンドリア代謝と神経変性疾患に注目して解明することを目的とする。CKAP4 の機能についてはこれまで主に培養細胞を用いた実験によって解析されてきた。CKAP4 KO マウスについての文献報告は私共以外にはまだなく、個体レベルでの機能解析はほとんど行われてこなかった。私共が作製した CKAP4 KO マウスを用いることで、これまで培養細胞を用いた実験で明らかになってきた CKAP4 の多彩な機能が個体における生命現象に如何に関連するかを明らかになることが期待され、独自性も高い。神経変性疾患の病態解明につながることを期待され、医療という側面からも社会的意義も大きい創造性の高い研究であると考えている。

3. 研究の方法

(1) CKAP4 KO マウスの加齢および神経変性疾患に伴う表現型の解析

CKAP4 KO マウスの加齢に伴う表現型を網羅的に解析するため、CKAP4 KO マウスとコントロールの野生型マウスを各 20 匹程度、一年半から二年間長期飼育を行う。ロタロッドテスト等で運動失調の有無について検討する。運動失調が有意に観察された時点で、マウスを安楽死させ、解剖して各組織、特に脳に注目して形態学的解析を行う。ニッスル染色により神経細胞を染色し、細胞の脱落や軸索の異常等の有無を検討する。また CKAP4 KO マウスをアルツハイマー病モデルマウス (アミロイド前駆体タンパク質ノックイン (App KI) マウス, Sato T. et al., Nature Neurosci. 2014 理化学研究所西道博士より入手予定) と交配し、CKAP4 の有無がアルツハイマー病の発症に与える影響について検討する。App KI マウスでは通常生後 6 カ月から脳内のアミロイドの沈着が観察される。CKAP4 KO マウスではミトコンドリア機能が低下することによりアルツハイマー病モデルマウスの症状が重篤になる可能性がある。CKAP4 KO/App KI マウスの脳

を抽出し、病理学的解析を行う。

(2) CKAP4 KO マウスの神経細胞の初代培養を用いた神経細胞における CKAP4 の機能

野生型および CKAP4 KO マウスより大脳皮質神経細胞の初代培養を作製し、小胞体の構造の異常の有無を Calnexin 染色や電子顕微鏡観察により明らかにする。さらにミトコンドリアの膜電位、ミトコンドリア内のカルシウム濃度、ATP 産生について異常の有無を検討する。次に大脳皮質神経細胞をアミロイド ペプチドで処理し、神経細胞死を野生型と CKAP4 KO で比較する。

(3) ヒトおよびマウスの老化脳や神経変性疾患における CKAP4 の発現解析

老化したヒト脳やアルツハイマー病患者やパーキンソン病患者の脳もしくは老化マウスや神経変性疾患モデルマウスにおける CKAP4 の発現量の変化をリアルタイム PCR、ウエスタンブロット、免疫組織化学で検討する。正常若齢コントロールのサンプルと比較して、CKAP4 の加齢や神経変性疾患に伴う発現量の変化の有無を検討する。

(4) 神経変性疾患における CKAP4 によるミトコンドリア代謝制御の網羅的解析

生体内の神経細胞における CKAP4 によるミトコンドリア代謝制御の全容を明らかにするため、CKAP4 KO マウスもしくは CKAP4 KO/App KI マウスおよびそのコントロールマウスの脳を用いてメタボロミクス解析を行う。CKAP4 KO マウスで神経変性疾患に伴うミトコンドリア機能異常に関連して代謝産物の量が増加した遺伝子については、リアルタイム PCR やウエスタンブロット等で発現の変動を確認する。変動が確認できた遺伝子については siRNA を合成し、野生型および CKAP4 KO の大脳皮質神経細胞でノックダウン実験を行う。CKAP4 KO マウスもしくは CKAP4 KO/App KI マウスおよびそのコントロールマウス由来の大脳皮質神経細胞を用いて、小胞体の構造やミトコンドリア機能についてノックダウンの影響の有無を検討する。

4. 研究成果

CKAP4 KO マウスの加齢に伴う表現型を網羅的に解析するため、CKAP4 KO マウスとコントロールの野生型マウスの複数のペアの交配を同時に開始し、誕生日に近い CKAP4 KO マウスと野生型マウス各 20 匹程度得ることであった。今後、一年半から二年間の長期間飼育を行っていく予定である。既に二年間長期飼育を行った CKAP4 KO マウスと野生型マウスの脳、心臓、肺、肝臓、腎臓を抽出してホルマリン固定した後、薄切し HE 染色を行った。HE 染色による組織観察では小脳プルキンエ細胞の部分的脱落以外は顕著な組織構造の異常は検出出来なかった。また、CKAP4 がミトコンドリア代謝を制御するメカニズムを明らかにするため、野生型細胞と CKAP4 KO 細胞の遺伝子発現の違いを RNAseq により網羅的に解析し、CKAP4 シグナルにより発現が制御される候補遺伝子を複数同定した。次に成体での CKAP4 の機能を明らかにするため、野生型マウスに CKAP4 の機能阻害抗体を半年間、週に一回、200 μ g 腹腔内投与を行った。半年後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓を抽出してホルマリン固定した後、薄切し HE 染色を行ったが、組織構造の大きな異常は検出されなかった。CKAP4 KO マウスと野生型マウスの経過観察を引き続き行った。また、CKAP4 がミトコンドリア代謝を制御するメカニズムを明らかにするため、野生型細胞と CKAP4 KO 細胞におけるミトコンドリア呼吸に関連する遺伝子の発現量をウエスタンブロッティングにより比較したが、発現量に有意な差はなかった。最近、脂肪肝において CKAP4 の発現が低下し、肝細胞の小胞体の構造が異常になることが個体の代謝異常を引き起こすことが報告された (Parlakgul, et al., Nature 2022)。

そこで CKAP4 KO マウスと野生型マウスに高脂肪食を 10 週間飼育した後血糖値を測定したところ、CKAP4 KO マウスは空腹時、グルコース負荷 2 時間後共に高血糖を呈することを見出した (図 2)。また肝臓の切片を作製し HE 染色を行ったところ、高脂肪食飼育した CKAP4 KO マウスの肝臓は野生型マウスと比較して多くの脂肪が蓄積していることが明らかとなった (図 3)。また肝臓内における CKAP4 の発現を免疫染色で確認したところ、CKAP4 は肝細胞にはほとんど発現しておらず、クッパー細胞に多く発現していることを見出した。さらに高脂肪食飼育した CKAP4 KO マウスにおいては野生型マウスと

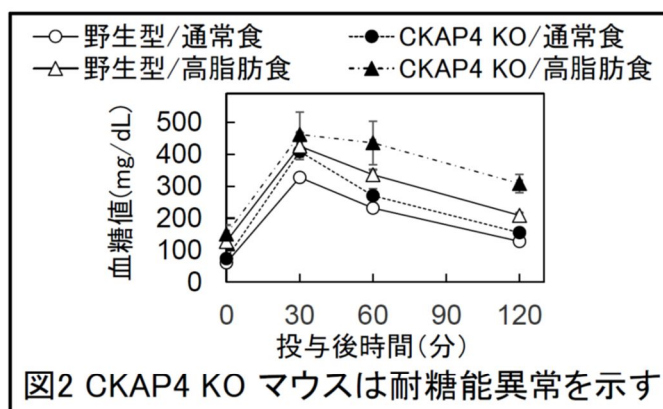


図2 CKAP4 KO マウスは耐糖能異常を示す

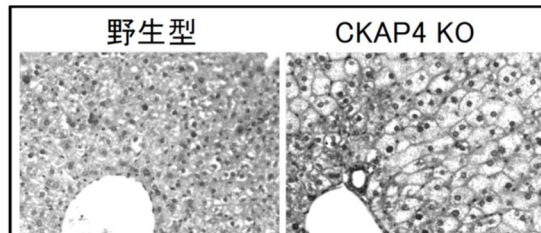


図3 高脂肪食で飼育したCKAP4 KOマウスの肝臓には脂肪が異常に蓄積する

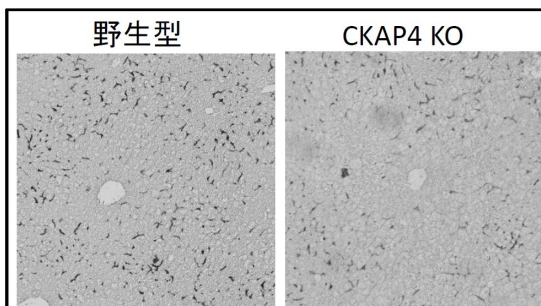


図4 高脂肪食で飼育したCKAP4 KOマウスの肝臓ではクッパー細胞が減少する

比較してクッパー細胞が減少していた（図4）。

本研究では個体レベルでの CKAP4 の機能を糖代謝と脂質代謝に注目して解明した。CKAP4 の機能についてはこれまで主に培養細胞を用いた細胞レベルでの実験によって解析されてきた。しかし、CKAP4 KO マウスについての文献報告は私共以外にはまだなく、個体レベルでの機能解析はこれまで全く行われてこなかった。私共が独自に作製した CKAP4 KO マウスを用いることで、これまで培養細胞を用いた実験で明らかになってきた CKAP4 の多彩な機能が個体における糖・脂質代謝調節に如何に関連するかを明らかにすることが出来た。これまで明らかになっていない小胞体構造タンパク質と糖・脂質代謝調節との関連が明らかになり、糖尿病や脂質異常症・高血圧症・心血管疾患などの生活習慣病の病態解明につながることを期待され、医療という側面からも社会的意義も大きく、創造性の高い研究であったと考えている。

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 1件）

1. 著者名 Harada Takeshi, Sada Ryota, Osugi Yoshito, Matsumoto Shinji, Matsuda Tomoki, Hayashi-Nishino Mitsuko, Nagai Takeharu, Harada Akihiro, Kikuchi Akira	4. 巻 133
2. 論文標題 Palmitoylated CKAP4 regulates mitochondrial functions through an interaction with VDAC2 at ER-mitochondria contact sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs249045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.249045	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 Kishimoto Hiroshi, Iwasaki Masayoshi, Wada Kensaku, Horitani Keita, Tsukamoto Osamu, Kamikubo Kenta, Nomura Seitaro, Matsumoto Shinji, Harada Takeshi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Takashima Seiji, Komuro Issei, Kikuchi Akira, Shiojima Ichiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Wnt5a-YAP signaling axis mediates mechanotransduction in cardiac myocytes and contributes to contractile dysfunction induced by pressure overload	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107146 ~ 107146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田武志、原田昭和、香山尚子、佐藤朗、菊池章
2. 発表標題 AOM/DSS大腸がんマウスモデルにおいて、Wnt5aは線維芽細胞サブタイプを制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 原田武志、原田昭和、香山尚子、佐藤朗、菊池章
2. 発表標題 AOM/DSS大腸がんマウスモデルにおけるWnt5a発現線維芽細胞サブセットの同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 原田武志、佐田僚太、大杉祥仁、松本真司、菊池章
2. 発表標題 パルミトイル化CKAP4はVDAC2を介してミトコンドリア機能を制御する
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
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
---------	---------