

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590202

研究課題名（和文） サイクリック ADP リボース合成酵素 CD38 を活性化する細胞内シグナルの解明

研究課題名（英文） Activation mechanism of cyclic ADP-ribose-synthesizing enzyme CD38

研究代表者 橋井 美奈子
(MINAKO HASHII)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・協力研究員

研究者番号：10272957

研究成果の概要（和文）：

CD38 は細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 上昇に働くセカンドメッセンジャーであるサイクリック ADP リボース合成酵素としての働きを有する。質量分析により CD38 に結合するキナーゼ (PK と略) を見いだしたので、CD38 により活性化する生理作用が PK の調節を受けるかを検討した。CD38 発現細胞では Ca^{2+} 振動など Ca^{2+} シグナル増強作用がみられ、PK 阻害によりこの効果は抑制された。よって CD38 により増強する細胞内 Ca^{2+} シグナルに PK が関与していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Human CD38 has enzymatic function that catalyzes multiple reactions to produce Ca^{2+} -mobilizing second messenger, cyclic ADP-ribose. In this study, we try to detect CD38-interacting proteins those may influence CD38 activity using proteomic analysis. We find protein kinase (PK) as a binding partner of CD38, and show that enhanced Ca^{2+} signaling including cytosolic Ca^{2+} oscillations were suppressed by inhibition of PK. Therefore it is suggested that PK is involved in activation mechanism of CD38.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：CD38、サイクリック ADP リボース、カルシウムイオン、結合蛋白、
プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

リンパ球表面抗原 CD ファミリーの一つである CD38 には、細胞外領域に酵素部位を持ち、細胞外へくみ出された $\beta\text{-NAD}^+$ を基質にして、サイクリック ADP リボース (cADPR) など細胞内 Ca^{2+} 上昇に働くセカンドメッセンジャーを合成するというユニークな働きが

ある。CD38 により細胞外で産生された cADPR は細胞内に入り、 Ca^{2+} チャネルの働きを活性化する。これらチャネルの一つは細胞内リアノジン受容体- Ca^{2+} チャネルであり、CICR 機構を活性化し、細胞質 Ca^{2+} 動員を起こす (Okamoto, Takasawa *et al.*, 1993・1997)。細胞膜では温度センサー TRPM2 チャネルに

働いて体温付近で活性化される Ca^{2+} 流入を促進し (Tominaga *et al.*, 2006)、また神経細胞ではL型 Ca^{2+} チャネルの活性化による細胞内 Ca^{2+} 増加を増強する事が分っている (Kuba *et al.*, 1994年; Hashii *et al.*, 2000・2005)。そこで cADPR 産生酵素としての CD38 の生体への生理作用が注目されてきた。

ニューロンでの役割については、最近私たちは CD38 が cADPR 産生を介して視床下部神経終末からのオキシトシン遊離を促進することを見だし、母性愛などの社会行動に重要な役割を果たす可能性を想定している (Jin *et al.*, 2007)。

疾患との関連では、CD38 は急性リンパ性白血病 (CLL)、HIV 等の予後マーカーとして臨床で使われており、また糖尿病における CD38 自己抗体、自閉症におけるポリモルフィズム (Munesue *et al.*, 2010) も報告されている。治療面においても、CD38 による外傷性脳損傷からの回復促進作用が報告され、さらにはがん治療の標的としても期待されている。CD38 の活性化機構を調べる本結果は、これら疾患の病因解明や治療戦略に将来的に役立つと考えられる。

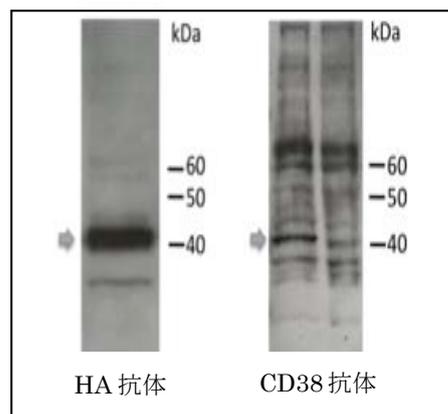
2. 研究の目的

上記のように CD38 が活性化した後の下流のシグナル伝達については明らかになってきたが、CD38 がどのような上流シグナルにより活性化されるのか、特にどのキナーゼによりリン酸化を受けるのかについて明らかにすることは、上述の治療戦略にとって重要な意味をもつ。しかしながら現時点では不明な点が多い。その理由として現在まで CD38 に特異的な抗体が作られていないこと等があげられている。

そこで次のステップとして、キナーゼの本体を明らかにするために、二次元電気泳動と質量分析の組み合わせにより CD38 に結合するキナーゼ蛋白の同定、さらにその生理学的解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) N 末に HA 配列を付加した human CD38 cDNA を PCR にて作製し、fugene により HEK293T 細胞に導入、24 時間後に HA-CD38 融合タンパクを発現させ、全細胞ライゼートを得る。HA-CD38 融合蛋白発現効率を免疫染色とウエスタンブロットで確認しておく (図 1)。



(図 1)

ついで HA 抗体を用いて免疫沈降し、HA ペプチドを用いて競合的に結合タンパクを溶出する。これを二次元電気泳動で展開し、分離されたスポットを抜き取り MALDI-TOF/MS 質量分析とマスコット解析を行い、CD38 に結合する蛋白を網羅的に調べ、キナーゼタンパクの候補を得る。

(2) HA-hCD38 cDNA を fugene を用いて HEK 細胞に導入し、一過性に融合タンパクを発現させる。トランスフェクション 24 時間後にこの細胞よりライゼートを取り、HA 抗体、もしくはヒト CD38 抗体を用いてそれぞれ免疫沈降し、免疫沈降タンパクを溶出し、ついで PK 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、CD38 結合タンパクとしての PK アイソフォームの同定を行う。

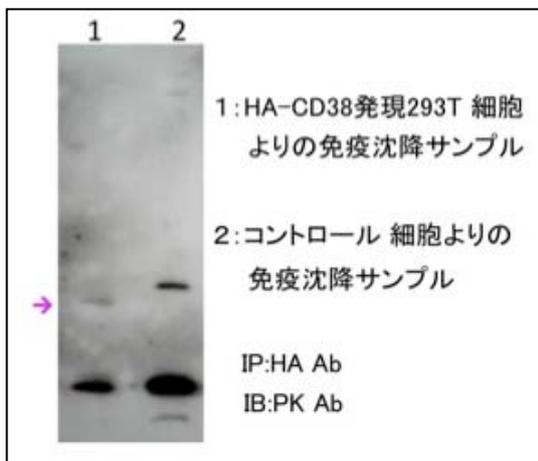
(3) C 末に flag 配列を付加した PK (アイソフォーム) cDNA を得、HA-hCD38 cDNA と共に fugene を用いて HEK 細胞に導入し、一過性に融合タンパクを共発現させる。トランスフェクション 24 時間後にこの細胞よりライゼートを取り、HA 抗体、および flag 抗体を用いてそれぞれ免疫沈降し、抗体結合タンパクを溶出し、ついでそれぞれのタグ抗体でウエスタンブロットを行い、CD38 結合タンパクとしての PK の再同定を行う。

(4) HA タグを融合した human CD38 cDNA を HEK293T 細胞にトランジェント導入させ、24 時間後にアルガス (浜松フォトニクス) を用いて細胞内カルシウム濃度を測定、非導入の対照群とカルシウム濃度変化を比較する。ついで PK 阻害処理群でも同じ方法で測定し、CD38 発現による Ca^{2+} シグナリング変化に対する PK 阻害の効果を検討する。

(5) HEK293T 細胞に HA タグを融合した human CD38cDNA をトランジェント導入、24 時間後に培養皿をスクラッチし (wound healing assay)、さらに 24 時間観察する。スクラッチにより細胞フリーのスペースを作ることで細胞移動度を測定し、CD38 タンパク発現による細胞移動促進効果を観察、ついで PK 阻害効果を検討する。

4. 研究成果

(1) HEK293T 細胞に HA-CD38 蛋白を発現させ、HA 抗体を用いて免疫沈降し、次に二次元電気泳動で展開し、染色されたスポットを網羅的に質量分析法にて測定した。マスコット解析より得られた情報により、CD38 に結合する蛋白のうち、キナーゼタン白の候補 (PK) を得た。
(2) HA-hCD38 cDNA を HEK 細胞に導入し、一過性に HA-hCD38 融合タン白を発現させた。ついでこの細胞よりの全細胞ライゼートを取り、HA 抗体、およびヒト CD38 抗体を用いてそれぞれ免疫沈降し、ついで PK 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、HA 抗体での免疫沈降サンプル、および CD38 抗体免疫沈降サンプルともに予想される PK の高さ一致してバンドが検出され、PK アイソフォームが CD38 結合タン白であるという結果が得られた (図 2)。

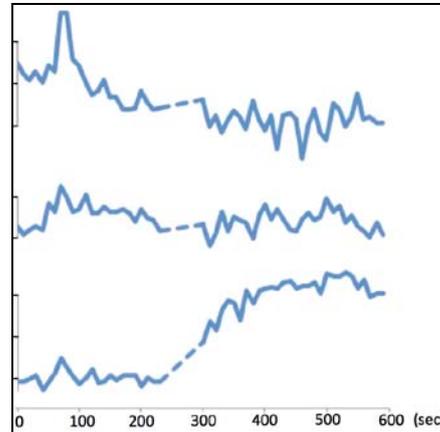


(図 2)

(3) flag 配列付加 PK cDNA を HA-hCD38 cDNA と共に HEK 細胞に導入、一過性に融合タン白を共発現させた。ついで得られた細胞ライゼートを HA 抗体、あるいは flag 抗体を用いてそれぞれ免疫沈降し、免疫沈降タン白を溶出し、タグ抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、HA 抗体あるいは CD38 抗体による免疫沈降と続く PK によるウエスタンブロットでは PK の高さにバンドが得られた。PK 抗体による免疫沈降と続く HA によるウエスタンブロットでは、HA-CD38 の高さに一致する 46kDa の部位にバンドが得られ、CD38 が PK アイソフォームと特異的に結合していることを見だし、CD38 結合タン白としての PK アイソフォームの確認を行うことができた。

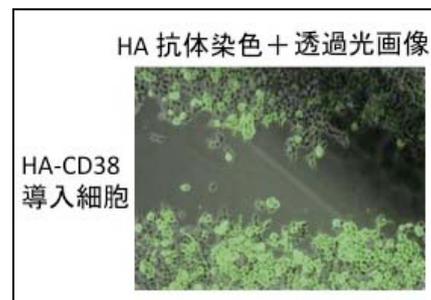
(4) HA タグを融合した human CD38 cDNA を HEK293T 細胞に発現させ、アルガスを用いて細胞内カルシウム濃度を測定、非導入の対照群とカルシウム濃度変化を比較した所、CD38 発現細胞では細胞質にカルシウムオシレー

ション (振動) あるいはサステインドな細胞内カルシウム増加反応が誘発された (図 3)。ついで PK 阻害処理群についても同じ方法で測定したがオシレーションは見られず、CD38 発現によるカルシウムシグナリング増強効果に対する PK 阻害による抑制作用があることがわかった。



(図 3)

(5) HEK293T 細胞に HA-human CD38cDNA を導入し、24 時間後に培養皿をスクラッチし、wound healing assay により細胞移動度を測定し CD38 の効果を観察した実験において、HA-CD38 導入群では細胞移動度の増加が見られた (図 4)。この細胞移動促進効果は PK 阻害により抑制された。



(図 4)

以上より、PKはCD38蛋白に結合するキナーゼであり、CD38により増強する細胞内カルシウム反応および細胞現象には関与していることがわかった。すなわちPKがCD38酵素反応の活性化に関与していることが想定される。

今後はPKがCD38のどの特定部位をリン酸化するか^のin vitroリン酸化アッセイと生理機能の検討を行うこと、およびそれらのリン酸化部位がCD38の生理機能に役割を果たしているか^の確認を得るために、野生型CD38発現細胞と変異CD38発現細胞の間での比較実験が必要と思われる。また本結果を神経系に応用し、CD38蛋白がPKと協調して作用することにより脳神経の発達や脳損傷からの機能回復に果たす役割を明らかにしたい。

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 8 件)

- ① Higashida, C., Islam, M. S., Hashii, M., Higashida, H. et al. (他 11 名, 7, 15 番目), Dopamine-Induced Regulation and Deregulation of the Catabolism of Cyclic ADP-Ribose, an Intrinsic mTOR Signal Inhibitor, During Development in the Rodent Striatum, Messenger, 査読有, 2, 2013, 33-43
DOI:10.1166/msr.2013.1019
- ② Liu, H.-X., Hashii, M., Higashida, H. et al. (他 6 名, 8, 9 番目), Intracellular calcium concentrations regulated by cyclic ADP-ribose and heat in the mouse hypothalamus, Messenger, 査読有, 1, 2012, 150-159
DOI:10.1166/msr.2012.1015
- ③ Jin, D., Hashii, M., Higashida, H. et al. (他 11 名, 9, 14 番目), Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice, Neurochem. Int., 査読有, 61, 2012, 907-912
DOI:10.1016/j.neuint.2011.12.021
- ④ 橋井美奈子, カルシウム動員セカンドメッセンジャー・サイクリック ADP リボースの脳機能における役割, 金沢大学十全医学会雑誌, 査読有, 120 巻, 2011 年, 171-176
<http://hdl.handle.net/2297/30245>
- ⑤ Higashida, H., Munesue, T., Hashii, M. et al. (他 3 名, 1, 4 番), A Missense Mutation in CD38 Associated with Autism Spectrum Disorder in Three Pedigrees. In: Eapen, V., ed. Autism - A Neurodevelopmental Journey from Genes to Behaviour, 2011
DOI: 10.5772/17774
www.intechopen.com/download/pdf/18068
- ⑥ Munesue, T., Hashii, M., Higashida, H. et al., (他 52 名, 46, 55 番目), Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls, Neurosci. Res., 査読有, 67, 2010, 181-191
DOI:10.1016/j.neures.2010.03.004
- ⑦ Lopatina, O., Liu, H. X., Amina, S., Hashii, M., Higashida, H., Oxytocin-induced elevation of ADP-ribosyl cyclase activity, cyclic ADP-ribose

or Ca(2+) concentrations is involved in autoregulation of oxytocin secretion in the hypothalamus and posterior pituitary in male mice, Neuropharmacology, 査読有, 58, 2010, 50-55

DOI:10.1016/j.neuropharm.2009.06.012

- ⑧ Amina, S., Hashii, M., Ma, W. J., Yokoyama, S., Lopatina, O., Liu, H. X., Islam, M. S., Higashida, H., Intracellular calcium elevation induced by extracellular application of cyclic-ADP-ribose or oxytocin is temperature-sensitive in rodent NG108-15 neuronal cells with or without exogenous expression of human oxytocin receptors, 査読有, J. Neuroendocrinol., 22, 2010, 460-466
DOI:10.1111/j.1365-2826.2010.01978.x

[学会発表] (計 2 件)

- ① 橋井美奈子, 周東智, 東田陽博, 合成サイクリック ADP リボースアナログ構造の違いによる神経細胞内 Ca²⁺動員効果の比較, 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 26 日, 瑠璃光 (石川県)
- ② 橋井美奈子, サラワト アミナ, オリガロバチナ, 東田陽博, サイクリック ADP リボース合成酵素 CD38 の細胞移動に対する役割, 第 53 回日本神経化学学会大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋井 美奈子 (HASHII MINAKO)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・協力研究員
研究者番号: 10272957

(2) 研究分担者

樋口 善博 (HIGUCHI YOSHIHIRO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号: 10019630

(3) 連携研究者

東田 陽博 (HIGASHIDA HARUHIRO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 30093066
(H22→H23: 研究分担者)

松川 茂 (MATSUKAWA SHIGERU)
福井大学・学内共同利用施設等・准教授
研究者番号: 00092809
(H22→H23: 研究分担者)