

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657140

研究課題名(和文)動物細胞における温度センサーの探索と低温刺激応答シグナル伝達系の解明

研究課題名(英文)Analysis of signaling mechanisms for cellular response to low temperature in mammals

研究代表者

佐藤 孝哉 (Sato, Takaya)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20251655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物は、体内の温度がほぼ一定に保たれ、細胞を取り囲む環境は極めて安定に維持されている。しかし、哺乳動物においても、直接外界に接する皮膚、気管などは、生理的環境下で細胞が体温より低い温度にさらされる機会が存在する。このような温度変化を感知し応答する細胞内シグナル伝達系は、ほとんど解析されていない。本研究では、動物培養細胞細胞を25℃の低温刺激にさらすとリン酸化が強く誘導されることが知られているチロシンキナーゼACK1の機能解析を中心に、低温に対する細胞応答のメカニズムの解明を進めた。

研究成果の概要(英文)：Body temperature in mammals is kept constant, contributing to the maintenance of a stable environment around the cell. However, even in mammals, particular tissues such as skin and trachea are exposed to low temperature under ordinary conditions. Signaling mechanisms for cellular response to low temperature in these tissues remain obscure. In this study, we analyzed these signaling mechanisms, particularly the regulatory mechanisms and physiological function of the protein tyrosine kinase ACK1, in which tyrosine residues become phosphorylated following temperature shift down to 25 degree in mammalian cultured cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：低温刺激 チロシンキナーゼ ACK1

1. 研究開始当初の背景

動物には外界の環境の変化に適応するために様々な生体調節系が備わっている。温度変化は、程度の差はあるものの、あらゆる環境に認められ、あらゆる生物がこれに適応する必要があるという意味で、外界環境の変化の中でも最も普遍的かつ必然的なものであると考えられる。哺乳動物の場合、外界の温度変化に対しては、神経系と内分泌系を中心とした個体レベルでの高度な生理的調節系が機能するため、体内の温度はほぼ一定に保たれ、内部の細胞を取り囲む環境の恒常性は極めて安定に維持されている。

しかし、哺乳動物の場合でも、生理的環境下で細胞が体温より低い温度にさらされる機会が存在する。とくに直接外界に接する皮膚、気管などは体温より低い状態に存在することが多い。一方、哺乳動物の精巣では低体温状態において活発に精子形成が行われ、37℃では生殖細胞が死滅してしまうことはよく知られている。

体温より低い温度にさらされた場合、一般に遺伝子発現や代謝が低下するが、それだけではなく、個々の細胞において低温に应答したシグナル伝達系が刺激され、細胞レベルでの恒常性の維持機構が駆動されることが予想される。しかし現在のところ、25℃程度の弱低温刺激に应答した細胞内シグナル伝達系の解析の報告は非常に少ない。一方で、細胞内シグナル伝達に関する膨大な知識が蓄積されている現在では、シグナル伝達分子の機能に関する既知の情報から推測可能な部分も多く、本研究から具体的でかつ卓越した成果が得られる可能性は非常に高い。

さらに哺乳類の一部には冬眠によって越冬する動物が知られているが、そのときの体温や休眠の程度は動物種によってかなり異なっている。冬眠に関しても代謝レベルの低下という程度の理解しか得られていない側面がある。個体レベルで、種々の生理的变化やそれに伴う蛋白質の発現レベルの変動などは解析されつつあるが、細胞内シグナル伝達のレベルでは未解明の部分が多い。

このように、細胞を取り囲む環境の中でも温度変化は重要な位置を占めるにも拘らず、その应答シグナル伝達系は従来あまり注目されていなかった。その意味で、新しい分野を切り開く可能性を秘めつつも実現可能性が高い本研究は、斬新なアイデアとでチャレンジ性を有している。

本研究は、研究代表者が従前の研究の過程で見出した動物培養細胞の弱低温刺激に应答した ACK1 チロシンキナーゼのリン酸化反応を手掛かりとして、これまであまり注目されていなかったタイプの外界刺激への应答メカニズムの解明へと発展させようとするものである。この点で、新しい原理の発展に結びつく研究提案であると考えられる。

一昨年、神戸大学大学院医学系研究科の的

崎尚教授の研究グループより、培養細胞における弱低温刺激に应答した膜蛋白質 SIRP のチロシンリン酸化の亢進が報告された。一方、SIRP はラットを低温にさらした際に視床下部において強くチロシンリン酸化が誘導される分子としても報告されている (Taniguchi *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 178)。SIRP は、精神疾患などとの関連性が明らかにされていることから、温度感受性の細胞应答が生体の高次機能にも関係している可能性がある。温度への应答が極めて基本的な生体機能であることから、SIRP の例のみならず、そのシグナル伝達系が哺乳類の行動や社会性などの極めて高次の機能に結びつく可能性は低くない。このような観点から、本研究が成功した場合には新規のシグナル伝達系の解明という枠にとどまらない卓越した成果に結びつくことが期待できる。

また、脳が障害を受けた際に体温を 31~34℃程度に下げること代謝機能を低下させ、脳を保護する脳低温療法が知られているが、この間に細胞内で起こっている現象のシグナル伝達のレベルでの分子機構はほとんど解明されていない。本研究の成果により、細胞が低温を感知するメカニズムやその際の細胞内での情報伝達過程が明らかになれば、それに基づいたより効果的な治療法の開発が可能となる可能性がある。例えば、本研究で発見される可能性がある低温感受性のシグナル伝達系を構成する因子に作用する既存の薬剤との併用の効果などが期待できる。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞が外部環境の温度変化を感知しこれに应答するシグナル伝達系は、現在のところほとんど解明されていない。そこで本研究では、動物細胞の生理的な温度変化に対する温度センシングシステムの詳細を解明することを目的とする。具体的には、動物培養細胞レベルにおいて、外界の温度変化に应答したシグナル伝達分子(蛋白質)の活性や細胞内局在の変化を解析し、そのシグナル伝達メカニズムを明らかにすることを目標とする。

その手掛かりとして、研究代表者が見出した非受容体型チロシンキナーゼ ACK1 の弱低温刺激应答性のチロシンリン酸化誘導のシグナル伝達系の詳細な解析を目指し、そこから得られる知見をより一般的な弱低温刺激应答性シグナル伝達メカニズムの解明へと発展させたい。ACK1 は、相互作用する分子種が多く、多種多様な細胞内シグナル伝達系に関与しているので、弱低温刺激への应答系と既知のシグナル伝達系との間での新規のクロストークや調節機構が明らかにされることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) チロシンキナーゼ ACK1 の弱低温刺激応答性チロシンリン酸化のメカニズムの解析

チロシンキナーゼ ACK1 は、低分子量 GTP 結合蛋白質 Cdc42 の標的として同定されたチロシンキナーゼであり、活性型 Cdc42 との相互作用に必要な Cdc42/Rac interactive binding (CRIB)ドメインが一次構造上中央に存在する。CRIB ドメイン以外にも、sterile alpha motif domain (SAM)ドメイン、Src homology 3 (SH3)ドメイン、クラスリン結合モチーフ、Mig6 homology ドメイン、ubiquitin-association (UBA)ドメインなどをもつマルチドメインタンパク質である。また、C 末端近傍に存在する Proline-rich モチーフを介してアダプター分子 Grb2 に結合し、上皮増殖因子受容体と複合体を形成する。まずはこれらのドメインの欠失変異体を作成し、弱低温刺激によるチロシンリン酸化への関与を検討する。内在性 ACK1 を RNAi 法により発現抑制した後、キナーゼ触媒ドメインの不活性型変異体の弱低温刺激応答性を検討することで、弱低温刺激応答性のチロシンリン酸化が、自己リン酸化反応であるか他のチロシンキナーゼによる反応であるのか決定することが可能である。また、自己リン酸化反応である場合は、キナーゼ触媒ドメインの不活性型変異体と各種変異体を共発現させ、キナーゼ触媒ドメインの不活性型変異体のリン酸化を計測することで、温度刺激にตอบสนองするために必要なドメインを同定することができる。

また、Cdc42 の活性化が弱低温刺激応答性の ACK1 のリン酸化に必要であるか検討する。特異的 siRNA により、各種培養細胞株において Cdc42 をノックダウンした後、弱低温刺激応答性の ACK1 のリン酸化が減少するか検討を加える。

(2) 各種細胞における ACK1 の弱低温刺激応答性チロシンリン酸化

種々の培養細胞株において、弱低温刺激後、細胞を破碎する。細胞の可溶化液を用いて、抗 ACK1 抗体による免疫沈降法および抗リン酸化チロシン抗体によるイムノプロット法により、ACK1 のチロシンリン酸化を検出する。

さらに、生理的条件下で弱低温刺激にさらされる組織である皮膚の表皮細胞での ACK1 のチロシンリン酸化の検討を行う。マウス胎児より表皮細胞を採取し、弱低温刺激後、他の細胞と同様の方法により、ACK1 のチロシンリン酸化を検出する。

4. 研究成果

(1) チロシンキナーゼ ACK1 の弱低温刺激応答性チロシンリン酸化のメカニズムの解析

現在、各種変異体を作成している段階である。また、異所性発現させた ACK1 は、刺激

非存在下でのチロシンリン酸化レベルが高く、弱低温刺激への応答性が低い。このため、細胞あたりの発現量を減らす必要があり、プロモーターの種類などの検討を行っている。このため、現在のところ、各ドメインの役割に関して、最終的な結論は得られていない。一方、各種細胞における内在性 Cdc42 に対する siRNA を用いた発現抑制を行うための条件検討を進めている。

(2) 各種細胞における ACK1 の弱低温刺激応答性チロシンリン酸化

種々の培養細胞株において、弱低温刺激応答性の ACK1 のチロシンリン酸化を検討した。図 1 に示すように、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞の他、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、サル腎由来 COS7 細胞においても、弱低温刺激応答性の ACK1 のチロシンリン酸化が検出された。いずれの細胞株においても、刺激後 10 分以内にチロシンリン酸化が誘導された。



図 1 各種培養細胞株における弱低温刺激応答性の ACK1 のチロシンリン酸化。各時間の 25 °C 刺激後、細胞を回収し、免疫沈降法およびイムノプロット法により、ACK1 のチロシンリン酸化を検出した。

マウス胎児表皮細胞の弱低温刺激応答性の ACK1 のチロシンリン酸化については、現在も解析が進行中で、統一的な結論を得るには至っていない。細胞の採取、培養のさらなる条件検討が必要であると考えられる。

(3) 弱低温刺激でチロシンリン酸化される蛋白質の網羅的解析

当初、ACK1 関連あるいは異なる経路のシグナル伝達分子で ACK1 と同様に弱低温刺激にตอบสนองしてチロシンリン酸化される蛋白質を網羅的に探索することを計画した。現在、共同研究を含めて準備を進めているが、これまでのところ特段の成果は得られていない。また、当初計画した *ack1* 遺伝子ノックアウトマウスの解析についても、現在は、準備中の段階にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takaya Satoh: Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. Small GTPases In press (2014) (査読有)

DOI: 10.4161/sgtp.28102

2. Nobuyuki Takenaka, Rumi Izawa, Junyuan Wu, Kaho Kitagawa, Yuma Nihata, Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Wataru Ogawa, Atsu Aiba, and Takaya Satoh: A critical role of the small GTPase Rac1 in Akt2-mediated GLUT4 translocation in mouse skeletal muscle. *FEBS J.* 281 (05), 1493-1504 (2014) (査読有)
DOI: 10.1111/febs.12719

3. Shinsuke Nozaki, Tomoya Takeda, Takuya Kitaura, Nobuyuki Takenaka, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Akt2 regulates Rac1 activity in the insulin-dependent signaling pathway leading to GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle cells. *Cell. Signal.* 25 (06), 1361-1371 (2013) (査読有)
DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.02.023

4. S. Asahara, Y. Shibutani, K. Teruyama, H. Y. Inoue, Y. Kawada, H. Etoh, T. Matsuda, M. Kimura-Koyanagi, N. Hashimoto, M. Sakahara, W. Fujimoto, H. Takahashi, S. Ueda, T. Hosooka, T. Satoh, H. Inoue, M. Matsumoto, A. Aiba, M. Kasuga, and Y. Kido: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. *Diabetologia* 56 (05), 1088-1097 (2013) (査読有)
DOI: 10.1007/s00125-013-2849-5

5. Daisuke Ibi, Taku Nagai, Akira Nakajima, Hiroyuki Mizoguchi, Takahiro Kawase, Daisuke Tsuboi, Shin-ichi Kano, Yoshiaki Sato, Masahiro Hayakawa, Ulrike C. Lange, David J. Adams, M. Azim Surani, Takaya Satoh, Akira Sawa, Kozo Kaibuchi, Toshitaka Nabeshima, and Kiyofumi Yamada: Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia* 61 (05), 679-693 (2013) (査読有)
DOI: 10.1002/glia.22461

6. Shinsuke Nozaki, Shuji Ueda, Nobuyuki Takenaka, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Role of RalA downstream of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells. *Cell. Signal.* 24 (11), 2111-2117 (2012) (査読有)
DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.07.013

〔学会発表〕(計6件)

1. 新畑有麻, 安田直人, 竹中延之, 佐藤孝哉: 骨格筋においてインスリン応答性の Rac1

活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子の解析. 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月03日-2013年12月06日, 神戸) 演題番号 P1-0508

2. 北川花穂, 猪澤瑠美, 呉俊元, 新畑有麻, 竹中延之, 佐藤孝哉: 骨格筋でのインスリン依存性糖取り込みにおける Akt2 による Rac1 の制御. 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月03日-2013年12月06日, 神戸) 演題番号 P1-0507

3. 佐藤孝哉, 竹中延之: DbI ファミリーグアニンヌクレオチド交換因子による細胞機能の調節. 第86回日本生化学会大会(2013年09月11日-2013年09月13日, 横浜) 演題番号 3S16p-2

4. Yusuke Kirimura, Shuji Ueda, Minoru Yamanoue, Takaya Satoh, Yasuhito Shirai: Analysis of RhoA activity in IGF-I induced hypertrophic myotubes of C2C12 cells. 第86回日本薬理学会年会(2013年03月21日-2013年03月23日, 福岡)

5. 野崎真輔, 武田朋也, 北浦拓也, 竹中延之, 片岡徹, 佐藤孝哉: 骨格筋細胞でのインスリン依存性糖取り込みにおける Akt2 による Rac1 の制御. 第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11日-2012年12月14日, 福岡) 演題番号 4W9I-2、4P-0299

6. 野崎真輔, 上田修司, 竹中延之, 片岡徹, 佐藤孝哉: 骨格筋細胞へのインスリン依存性糖取り込みにおける Rac1 下流での RalA の役割. 第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11日-2012年12月14日, 福岡) 演題番号 3ST4-049、3P-0357

〔図書〕(計3件)

1. Takaya Satoh: The Ras superfamily of small GTP-binding proteins in glucose transporter type 4-mediated glucose uptake signaling in insulin-responsive tissues. *Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications* (Carter C. Johnson and Davis B. Williams, ed; Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA) Chapter 9 (pp. 235-252) (2013) (査読有)
ISBN: 978-1-62618-670-5

2. 佐藤孝哉: RAS スーパーファミリー. 岩波生物学辞典(第5版) (巖佐庸, 倉谷滋, 斎藤成也, 塚谷裕一 編, 岩波書店) 1435 (2013) (査読無)
ISBN: 978-4-00-080314-4

3. 佐藤孝哉: 「デブリン生化学 -臨床の理

解のために- (原書 7 版) (上代淑人, 澁谷正史, 井原康夫 監訳, 丸善出版) (原著: Thomas M. Devlin, ed "Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations, Seventh Edition" John Wiley & Sons, Inc.) 第3章 (翻訳) (2012) (査読無)
ISBN:978-4-621-08561-5

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~tsato/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
佐藤 孝哉 (SATO, Takaya)
大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 2 0 2 5 1 6 5 5

(2)研究分担者
竹中 延之 (TAKENAKA, Nobuyuki)
大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 2 0 6 1 0 5 0 4

(3)連携研究者
なし