

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710265

研究課題名(和文) 癌制御法開発のためのKRAP-IP3R相互作用機序解析とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the molecular interaction between KRAP and IP3R and its application for drug discovery

研究代表者

藤本 崇宏 (Fujimoto, Takahiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10446114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：KRAP相同遺伝子を同定し、同分子がリンパ球におけるIP3R制御分子であり、小胞体(ER)とミトコンドリアといった細胞内小器官の連関に関わる可能性を示唆するとともに、細胞外カルシウムイオン流入依存的なKRAP相同分子のリン酸化という新たな現象を見出した。興味深いことに、KRAP分子に関しても癌細胞においてカルシウムイオン流入依存的なリン酸化の現象が認められた。細胞外カルシウムイオン貯蔵と細胞内カルシウムイオン貯蔵であるERとの間で、密接な連携が存在し、互いに制御しあう機構の存在が示唆される。さらなるカルシウムイオンシグナリング制御機構の理解が制癌法の開発には必要である。

研究成果の概要(英文)：Through the analysis of the molecular interaction between KRAP and IP3Rs, KRAP homolog gene was identified. KRAP homolog protein was specifically expressed in T- and B-lymphocytes and was found to interact with IP3Rs. KRAP homolog protein was localized around microdomain between ER and mitochondrial membranes, and appeared to regulate calcium ion flow from ER to mitochondria. It was worthy to note that both KRAP homolog and KRAP were phosphorylated upon extracellular calcium ion influx in lymphocytes and cancer cells, respectively. In this study, chemical screening to explore candidate of cancer drug targeting to KRAP-IP3R interaction was failed. However, elucidation of the molecular mechanisms underlying posttranslational modification of KRAP family proteins may provide a novel strategy for cancer therapy.

研究分野：分子・細胞生物学、分子病態学

キーワード：分子間相互作用 分子標的 カルシウムイオンシグナル 癌 リンパ球 翻訳後修飾 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

KRAP 遺伝子は癌で高発現している遺伝子として我々が独自にクローニングしたものであり、癌病態に及ぼす影響について研究を行ってきた。

さらに KRAP の生理的機能を解析する目的で、KRAP 欠損マウスの樹立・表現型解析を行った。興味深いことに、同マウスは顕著な糖・脂質代謝異常を呈し、肥満・糖尿病発症に対して強い耐性を示したことから、全身性(個体レベル)でのエネルギー恒常性の制御に重要な役割を果たす遺伝子であることが明らかにされていた。

開始当初、KRAP 分子機能の解明を目的とした KRAP 結合蛋白探索において、細胞内カルシウムシグナリングに重要な役割を担うイノシトール 3 リン酸受容体(IP3R)分子を同定し、KRAP 分子機能の一端を明らかにする手掛りを掴んだ。

2. 研究の目的

癌制御法開発の基盤構築を目的とした、KRAP-IP3R 間相互作用の機序および生物学的意義の解明の一環として、KRAP-IP3R の分子レベルでの結合機序および、細胞レベルでの同相互作用を基点とするシグナル経路の同定を行う。また応用研究として、IP3R との相互作用に重要な KRAP 分子領域をプローブに用いた化合物アレイライブラリースクリーニングを展開することで、KRAP-IP3R 相互作用を阻害するバイオプローブの取得を目指す。

得られるバイオプローブは将来的な KRAP 機能制御剤、IP3R 機能制御剤、癌・代謝疾患制御剤開発のためのリード化合物になり得る可能性を有する。KRAP-IP3R 間の相互作用機序に関する情報は、将来的な高次構造解析による分子構造情報取得に必要であり、化合物アレイライブラリースクリーニングとは異なる手法による KRAP/IP3R 機能制御剤開発に通じるものである。また、KRAP-IP3R 相互作用が制御するシグナル経路の同定は、癌・代謝疾患を対象とした、KRAP-IP3R 相互作用部位を標的とする第一標的に続く、第二・第三の創薬標的の同定に繋がるものである。

KRAP に関する研究は、我々のグループが世界的にリードしている状況であるため、保持しているマテリアルや関連情報をもとに、KRAP-IP3R 相互作用に限定することなく、より広い視野の下で研究を発展させるべく結果に応じて臨機応変に軌道修正しつつ取り組む。

3. 研究の方法

KRAP-IP3R 相互作用の結合機序解析

KRAP-IP3R 間の相互作用を司る必要最小領域を同定するために、各蛋白の欠損変異体を作成し、共免疫沈降による検討を行うことで相互作用に必要な領域を決定する。さらに必要に応じて点変異体を作成することで、より詳細な相互作用必須領域を絞り込む。

バイオプローブ(KRAP-IP3R 相互作用に対する阻害化合物)の取得

化合物アレイライブラリーにタグ付きプローブ蛋白を反応させ、1 次抗体として抗タグ抗体を、2 次抗体として蛍光標識 2 次抗体を用いて、各スポットの蛍光強度を検出する流れである。タグ付きプローブ蛋白は大腸菌リコンビナント蛋白として作製する。

バイオプローブの機能的検証

上記のスクリーニングで陽性と判定される化合物は、KRAP 部分蛋白への結合能を有するものである。この中から KRAP-IP3R 相互作用を機能的に阻害する化合物(バイオプローブ)を選別する。

KRAP-IP3R 複合体の癌における役割の解明

機能的なバイオプローブが入手できた場合、これを研究のツールとして、癌細胞における KRAP-IP3R 複合体の生物学的役割を明らかにするための研究を行う。

4. 研究成果

(1) IP3R との分子レベルでの物理的相互作用に必要な KRAP 蛋白分子の最小領域を N 末端領域 220 アミノ酸長(human KRAP)または 218 アミノ酸長(mouse KRAP)と同定した。また、この領域内の 202, 203 番目(human KRAP の場合) または 204, 205 番目(mouse KRAP の場合)の連続するフェニルアラニン残基が同相互作用に重要であることを明らかにした。

同定された最小領域を大腸菌リコンビナント蛋白として作製に成功し、化合物アレイライブラリースクリーニングのプローブとして用い、弱いながらも結合能を有するヒット化合物を 1 つ得るに至った。

しかし、その後の検証実験において、培養細胞を用いた免疫複合体形成阻害能を指標としたアッセイでは候補化合物の機能的効果は認められなかった。大腸菌由来リコンビナント蛋白と哺乳類細胞由来の蛋白では構造が異なるためか、あるいは化合物の細胞透過性や蛋白抽出溶液中での安定性などに問題がある可能性も否定できない。

(2)KRAP と IP3R の相互作用領域を解析するなか、KRAP の N 末端領域とアミノ酸一次配列上、相同性を示す遺伝子を同定するに至った。その遺伝子機能解析の結果、同分子がリンパ球における IP3R 制御分子であることを見出し、同分子が小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオン流入に参与する可能性を示唆するとともに、新たな現象「KRAP/KRAP 相同分子が細胞外カルシウムイオン流入依存的にリン酸化される」を導き出した。KRAP は高分子量蛋白であることから、これまでの研究においては翻訳後修飾の存在は全く知られておらず、より低分子量の KRAP 相同分子での知見を手掛かりに明らかにされた点で予想しえない成果に繋がった。すなわち、多岐の生命現象において重要な役割を果たすカルシウムシグナリング制御に IP3R 制御を介して KRAP/KRAP 相同分子が関与するのみならず、細胞外カルシウムイオンといった ER とは物理的に離れた場所に貯蔵されているカルシウムイオン動態によって、細胞内カルシウムイオン貯蔵場所にアンカーリングする KRAP/KRAP 相同分子がシグナル制御を受けることが示唆された。細胞外と細胞内のカルシウムイオン制御部位を結ぶシグナル経路をより詳細に解析することは、新たな制癌法の開発に繋がるかもしれない。

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 4 件)

Tespa1 protein is phosphorylated in response to store-operated calcium entry. Fujimoto T, Matsuzaki H, Tanaka M, Shirasawa S. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Apr 26;434(1): 162-165. doi: 16/j.bbrc.2013.02.128

Tespa1 is a novel component of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and affects mitochondrial calcium flux. *Matsuzaki H, *Fujimoto T, Tanaka M, Shirasawa S. *: equal contribution Biochem Biophys Res Commun. 2013 Apr 12;433(3): 322-326. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.099

Identification of KRAP-expressing cells and the functional relevance of KRAP to the subcellular localization of IP₃R in the stomach and the kidney.

Fujimoto T, Shirasawa S. Int J Mol Med. 2012 Dec;30(6): 1287-1293. doi: 10.3892/ijmm.2012.1126

Tespa1 is a novel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding protein in T and B lymphocytes. *Matsuzaki H, *Fujimoto T, Ota T, Ogawa M, Tsunoda T, Doi K, Hamabashiri M, Tanaka M, Shirasawa S. *: equal contribution FEBS Open Bio. 2012; 2: 255-259. doi: 10.1016/j.fob.2012.08.005

〔学会発表〕(計 1 件)

日本人類遺伝学会第 57 回大会(東京)2012 年 10 月 25,26 日
癌・代謝関連遺伝子 KRAP の細胞内カルシウムイオン制御機構に関する研究
藤本崇宏、白澤専二

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
藤本 崇宏 (FUJIMOTO Takahiro)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 1 0 4 4 6 1 1 4

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：