

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790314

研究課題名(和文)新しい組織・細胞恒常性保護因子PERIPLAKINの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the functional roles of Periplakin in homeostasis

研究代表者

伊藤 慎二(Ito, Shinji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定助教

研究者番号：50362512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPeriplakin結合タンパク質の同定や, periplakinノックアウトマウスの表現型解析を通して, Periplakinが胆汁鬱滞下で生体恒常性維持に寄与する仕組みの解明を目指した. 複数のPeriplakin結合タンパク質をマウス肝臓で同定した. また, Periplakinを欠損する肝臓で発現量が変わる分子や, 組織学的に認められる変化を見出したが, これらは遺伝的背景や飼育環境が変わると再現せず, 胆汁鬱滞下の肝臓でのPeriplakinの役割は限定的か補完可能であることが分かった. 興味深いことに, periplakinノックアウトマウスでは絶食時の血糖値が野生型マウスに比べ有意に低かった.

研究成果の概要(英文)：We sought the functional roles of periplakin in homeostasis. Periplakin-interacting proteins were screened in normal- and cholestatic mouse liver. Several candidates were identified in cholestatic liver. The gene- and protein expression profiles were also examined. The loss of periplakin function influenced on the expressions of several hepatic molecules during cholestasais; however, the difference were highly susceptible to the genetic background and breeding conditions. These results indicate that the roles of periplakin in cholestatic liver might be limited; otherwise, the functional redundancy for periplakin may exist in mouse liver. Interestingly, the fasting blood glucose levels were reproducibly lowered in periplakin-null mice compared to the gender-matched wild-type littermates. Thus, a functional role of periplakin in fasting blood glucose metabolism was suggested.

研究分野：病態医化学

科研費の分科・細目：分子病態学

キーワード：Periplakin 肝臓 胆汁鬱滞 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

Plakin は、サイトリンカーとも呼ばれる棒状巨大分子の一群であり、細胞接着複合体と細胞内骨格とを接続することによって、組織や細胞の構造維持に寄与することが主要な役割と考えられている。

Periplakin は Plakin の一つであり、皮膚の角質層や上皮系細胞で強く発現することから、これらの組織や細胞の構造維持に寄与する構造分子であると考えられてきた。一方で、Periplakin は、細胞骨格や細胞接着複合体の構成因子だけでなく、細胞膜に局在する受容体や、細胞内のリン酸化酵素などとも直接結合することから、組織や細胞の構造維持のみならず、何らかの生理機能調節に関わる可能性が示唆されていた。しかしながら、2004年に報告された *periplakin* ノックアウトマウスには、通常の飼育条件下では表現型が認められず、Periplakin の生体内での実際の機能については長らく不明のままであった。

我々は Periplakin の肝臓における発現量が胆汁酸受容体 FXR (Farnesoid X receptor) の有無や、胆汁酸負荷により著明に変動することを見出したことから、Periplakin の肝臓における機能に着目して研究を開始した。最初に、肝臓における Periplakin の発現に影響を与える因子を幅広く探索し、Periplakin が胆汁鬱滞を惹起する様々な刺激にตอบสนองして、肝細胞の細胞境界面に烈しく蓄積することを明らかにした。この蓄積は刺激の種類によるものではなく、胆汁鬱滞が惹起されると必ず認められたことから、Periplakin が胆汁鬱滞下で何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。また Periplakin の顕著な蓄積は胆汁鬱滞が始まって2日目までには認められ、胆汁鬱滞が解消すると見られなくなったことから、比較的早い段階で起こる可逆的な現象であることが分かった。さらに、同様の細胞境界面への Periplakin の蓄積が尿鬱滞時の尿細管細胞においても認められたことから、Periplakin が体液鬱滞ストレスに対するこれまでに知られていない生理応答に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

我々は、我々自身が見出した、胆汁鬱滞や尿鬱滞といった体液鬱滞にตอบสนองし、特徴的な発現亢進を示す興味深い分子、Periplakin が、生体恒常性の維持に寄与する仕組みを解明することを目的として本研究を始めた。

Periplakin 結合分子の同定や *periplakin* ノックアウトマウスの表現型の解析を通して、Periplakin の生体内における作用点を明らかにし、分子レベルでの作用機序解明に資する基礎的知見を集積することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *periplakin* ノックアウトマウスの遺伝的背景の純化

involucrin-envoplakin-periplakin トリプルノックアウトマウスと C57BL/6Jcl マウス(日本クレア)とを掛け合わせることで得られた仔マウスから、*periplakin* 遺伝子のみを欠損し、*involucrin* および *envoplakin* 遺伝子を野生型のまま保有する個体を選別し、*periplakin* 遺伝子のみを単独で欠損するマウス(*periplakin* ノックアウトマウス)を得た。得られたマウスと C57BL/6Jcl マウスとの間で複数回の戻し交配を行い、遺伝的背景を C57BL/6Jcl に純化した。当初の解析には C57BL/6Jcl に3回の戻し交配を行った群を用いた。その後さらに戻し交配を進め、総計8回の戻し交配を経た群についても解析に供した。

(2) Periplakin 結合タンパク質の同定

通常時と胆汁鬱滞時の *periplakin* ノックアウトマウスおよび野生型マウス肝臓から総タンパク質を抽出し、抗 Periplakin 抗体 (Bethyl laboratories) および Dynabeads Co-immunoprecipitation kit (Veritas) を用いて Periplakin と結合するタンパク質を免疫共沈降させた。免疫共沈降物を SDS-PAGE により分離し、野生型マウスの肝臓に由来する検体には見られ、*periplakin* ノックアウトマウスの肝臓に由来する検体には見られないバンドを切り出した後、ゲル内でトリプシン消化し、LC-MS/MS 解析することによって、タンパク質の種類を同定した。

(3) *periplakin* ノックアウトマウス肝臓の遺伝子およびタンパク質発現プロファイルの解析

通常時と胆汁鬱滞時の野生型および *periplakin* ノックアウトマウス肝臓から総 RNA または総タンパク質を抽出した。総 RNA を cDNA マイクロアレイ解析に供し、得られた結果を定量的 PCR によって検証した。総タンパク質については、総 RNA の解析結果に基づき、Western blotting や免疫組織染色によるタンパク質レベルでの発現変化の検証に用いた。また、溶液内で直接トリプシン消化を行い、プロテオーム解析を行うことによって、Periplakin 欠損により肝臓で発現量が変化するタンパク質を網羅的に探索した。

(4) *periplakin* ノックアウトマウスの絶食 C57BL/6Jcl マウスに8回の戻し交配を行った *periplakin* ヘテロ接合型マウス (*periplakin* 遺伝子座を野生型/欠損型ヘテロ接合型で持つマウス) 同士を掛け合わせ、遺伝的背景や飼育条件が完全に一致する *periplakin* ノックアウトマウスと野生型マウスの組み合わせを同性同腹仔として得た。こ

これらのマウスを2～3ヶ月齢まで同一のケージ内で飼育し、同じ日に24時間絶食させた後、眼底から採血し遠心分離によって血清サンプルを得た。得られた血清サンプルに含まれる血中グルコース濃度をhexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase法により測定した。

4. 研究成果

(1) 生体内での Periplakin 結合分子の同定

これまでに複数の Periplakin 結合タンパク質が主に培養細胞を用いた *in vitro* 解析から見出されている。当初は主に細胞骨格や細胞接着複合体の構成因子との結合が示されていたが、最近になって、Fc RI, family A に属する G タンパク質結合型受容体, Akt (Protein Kinase B (PKB)) といった、細胞内外のシグナル伝達に関わる分子との結合が相次いで報告された。しかしながら、実際に *in vivo* で Periplakin と直接的に相互作用する分子については、これまでに報告がなく、全く不明であった。

我々は通常時と胆汁鬱滞時のマウス肝臓を用いることによって、それぞれの条件下で Periplakin と結合するタンパク質を網羅的に探索した。periplakin ノックアウトマウスの肝臓に由来する検体を陰性コントロールとして用いることにより、非特異的に抗 Periplakin 抗体と結合し沈降する産物を選別し候補から除外した。通常の飼育条件下のマウス肝臓では Periplakin の発現量が胆管上皮細胞を除けば非常に低いことから、肝臓の総タンパク質を用いた分析では Periplakin 結合タンパク質を同定することは困難であった。一方で、肝細胞における Periplakin の発現量が著しく亢進する胆汁鬱滞時においては、Periplakin 結合タンパク質の候補として、複数のタンパク質を同定することに成功した。これらのタンパク質が胆汁鬱滞下における Periplakin の作用点である可能性が示唆されたが、実際の Periplakin との機能的連関を明らかにすることはできなかった。

(2) Periplakin を欠損する肝臓で見られる遺伝子およびタンパク質発現プロファイルの分析

当初は C57BL/6JJcl に3回の戻し交配を行った periplakin ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて、通常時と胆汁鬱滞時の肝臓における遺伝子発現プロファイルを、cDNA マイクロアレイによって解析した。得られた結果を定量的 PCR, Western blotting および免疫染色等により検証した結果、胆汁鬱滞下のマウス肝臓において、線維産生細胞群の活性や活性調節に関わる遺伝子やタンパク質の発現量が、Periplakin の有無や鬱滞期間の長さに応じ特徴的に変化することを

見出した。しかしながら、その後、C57BL/6JJcl へ8回の戻し交配を行った群や、飼育条件が異なる群を用いて同様の解析を行ったところ、これらの遺伝子やタンパク質の発現変化は再現されなかった。したがって、Periplakin の有無の影響は、遺伝的背景や飼育環境の影響に比べると限定的なものであり、Periplakin の有無による表現型の変化を精査するためには、遺伝的背景や飼育環境の影響を可能な限り排除した環境で、より繊細な比較分析を行う必要があることが分かった。そこで、8回の戻し交配を経た群を用いて、再度、cDNA マイクロアレイ解析や、網羅的プロテオーム解析を行ったところ、periplakin ノックアウトマウスと野生型マウスの肝臓トランスクリプトームやプロテオームの構成は、通常時、胆汁鬱滞時の別によらず非常によく似ており、Periplakin の欠損により有意かつ安定的な量的変動を示す遺伝子やタンパク質を見出すことは難しいことが分かった。

(3) periplakin ノックアウトマウスの絶食に対する応答の検討

periplakin ノックアウトマウスに胆汁鬱滞とは直接関係のない、様々なゆらぎを与えることにより、新たに Periplakin の作用点を見出すことを試みた。C57BL/6JJcl に8回の戻し交配を行った periplakin ヘテロ接合型マウス同士を掛け合わせ、生まれた同腹仔に含まれる periplakin ノックアウトマウスと野生型マウスの組み合わせのみを解析に用いることによって、遺伝的背景や飼育環境をほぼ完全に揃えた条件下で、periplakin ノックアウトマウスと野生型マウスの表現型を比較した。絶食と胆汁分泌との連関が知られていることから、絶食ストレスを与えた際の periplakin ノックアウトマウスの挙動について、まず調べてみたところ、24時間の絶食を行った際、periplakin ノックアウトマウスの血糖値が、同性同腹仔の野生型マウスのものに比べて、性別によらず、ほぼ例外なく、有意に低値となることを見出した。

(4) まとめと考察

本研究では、当初、胆汁鬱滞や尿鬱滞といった体液鬱滞下での Periplakin の機能や作用点の解明を通して、Periplakin が生体恒常性維持に寄与する仕組みを明らかにすることを目指した。しかしながら、胆汁鬱滞下の肝臓における Periplakin の役割は限定的であるか、他の分子の代償的作用によって補完可能であり、胆汁鬱滞と Periplakin との関係の起点として、研究開始当初の目的を達成することは今回のアプローチでは難しかった。今後は、尿鬱滞下での Periplakin の役割についても同様に限定的なものであるかについて、確認する必要がある。

なお、本研究では、体液鬱滞とは直接関係

がない Periplakin の作用点についても探索し、24時間の絶食後、periplakinノックアウトマウスの血糖値が野生型の同性同腹仔に比べて低値となるという、非常に興味深い結果を得ることができた。これまでに Periplakin のような構造分子が血糖制御に関与しているとの報告はないことから、非常に斬新な血糖制御システムの存在を明らかにできる可能性がある。

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 1件)

(1) Cholestasis induces reversible accumulation of Periplakin in mouse liver.
Shinji Ito, Junko Satoh, Tsutomu Matsubara, Yatrik M Shah, Sung-hoon Ahn, Cherie R Anderson, Jeffrey M Peters, Frank J Gonzalez.

BMC Gastroenterology 2013, 13:116

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0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:

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

伊藤 慎二 (ITO SHINJI)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号: 50362512

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: