

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460338

研究課題名(和文) ストレスによるクラスリン依存性転写調節の解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of clathrin heavy chain, CHC17 and CHC22

## 研究代表者

坂本 多穂 (Sakamoto, Kazuho)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80433150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内輸送小胞の形成蛋白質として知られるクラスリン(CHC17)に近年、微小管安定化や遺伝子転写活性の調節など新たな機能が明らかにされつつある。本研究ではCHCが核移行する条件について解析を行った。生化学的実験においてCHC17がミトコンドリア呼吸阻害によって細胞質分画で減少し、核分画で増加することが明らかになった。ただし、細胞免疫染色では核内での増加が認められなかった。本研究過程において、CHCの別アイソフォームであるCHC22の生化学的性質も明らかになり、これを利用したCHC22の分離・電子顕微鏡像の観察に成功した。

研究成果の概要(英文)：Clathrin heavy chains (CHCs) are known as essential molecules for intracellular vesicular transport. Recently, some reports revealed that these play important roles in mitosis and transfer. In this study, we showed that inhibition of mitochondrial respiration increased CHC17, one of CHC isoforms, in nuclear fraction by using biochemical analysis. However, immunohistological analysis did not show this phenomenon. Through these experiments, we revealed the biochemical characteristics of CHC22, another isoform of CHC. By using this, we success to separate CHC17 and CHC22.

研究分野：薬理学

キーワード：クラスリン 細胞内小胞輸送 核移行

### 1. 研究開始当初の背景

クラスリン重鎖(CHC)は細胞内小胞輸送に関わる重要な蛋白質としてながらく認識されてきた。しかし近年、CHC が細胞分裂の際の微小管安定化に関与に重要な働きを果たしていること(1)、また CHC が転写因子 p53 の転写活性を上昇させる(2)など、新たな役割が明らかになりつつある。申請者は予備実験で HeLa 細胞を飢餓条件におくと、核分画においてクラスリン蛋白質の量が増加することを見出した。これは飢餓ストレスによりクラスリンが核内へと移行したことを示唆する。核内クラスリン量は遺伝子発現に影響する可能性があるため、クラスリン核移行のメカニズムを解明することで新たな遺伝子調節経路が発見される可能性があった。またクラスリンには CHC17 と CHC22 の 2 種類のアイソフォームが存在し、それぞれで性質の差異が存在する可能性があり、これが CHC 細胞内分布の制御に影響する可能性がある。とくに CHC22 は 2 型糖尿病時におけるインスリン抵抗性の形成に重要な役割を果たすことが報告されており(3)、この点を解明することは重要である。

### 2. 研究の目的

クラスリン核移行のメカニズムとストレス応答への関与を明らかにする。野生型 p53 を機能発現する細胞株を用いて、飢餓ストレスの他に CHC17 の核移行を引き起こすストレスがあるか調べる。さらに本研究では CHC17 と CHC22 の細胞内分布特性および生化学的特性の違いについても解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### 細胞分画法

細胞内の各構成要素内における CHC の分布変化を調べるため、細胞分画を行った。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞、ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞を培養し、各種処理を加えた後に回収した。核分画と細胞質分画を得る場合は Nu-PER kit(Thermo Scientific Fischer 社)を使用した。膜分画と細胞質分画の分離にはスクロース/フィコール密度勾配遠心法を用いた。

#### ウエスタンブロット法

各分画中の蛋白質量を調べるためにウエスタンブロット法を用いた。

#### クラスリントリスケリオンの観察

ディープエッチング法により雲母片上に固定したサンプルを走査型電子顕微鏡により観察した。

#### クラスリン被覆小胞の観察

試料を金コロイド標識した抗体で処理し、酢酸ウランでネガティブ染色をして透過型電子顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### CHC17 核移行条件の探索

HeLa 細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で 3 時間培養した飢餓ストレスを加えたのちに、核、膜、細胞質に分画した。核分画において CHC17 は有意に増加したが、CHC22 に変化は見られなかった。一方、膜分画においては CHC17 の変化は無かったが、CHC22 は減少した。この結果は CHC17 が飢餓ストレスにより核へ移行すること。そして CHC22 は飢餓ストレスにより脱被覆すると考えられる。

#### CHC17 核移行条件の探索

核において CHC17 は p53 転写活性を調節する。そこで、野生型 p53 を機能発現する MCF-7 および HCT116 細胞において HeLa 細胞と同様の核移行が飢餓ストレスにより引き起こされるか検討した。しかし、これらの細胞では PBS 条件では有意な変化はみられず、飢餓ストレス誘導実験に頻用される Earle's balanced salt solution(EBSS)も検討したが核移行しなかった。そこで、他のストレスに HCT116 細胞を曝露し、CHC17 核移行を調べた。紫外線、過酸化水素水(酸化ストレス)、低酸素、ドキシソルピシン(DNA ダメージ)、ロテノン(ミトコンドリア呼吸阻害)を試したところ、ロテノンにより核 CHC17 増加、細胞質 CHC17 減少が認められた。このとき全細胞サンプルでは CHC17 の発現量に変化は無かった。この結果から、ミトコンドリアストレスがクラスリン核移行を引き起こすと考えられた。この変化をさらに解析するため、HCT116 細胞で蛍光免疫染色によってクラスリンの分布変化を形態学的に調べたが、核局在率の有意な変化は見られなかった。

#### 2 種類の CHC の脱被覆 ATPase に対する感受性の差異

前述のとおり、HeLa 細胞を PBS 条件下におくと CHC22 は膜分画から細胞質分画への移行、つまり脱被覆を起こすことが明らかになった。現在のところ、細胞内においてクラスリン脱被覆は HSP70 とオーキシンの 2 つの蛋白質から構成される脱被覆 ATPase によって行われるとされる(ref)。申請者は CHC17 と CHC22 の間でこの酵素の働きに差異があるか調べた。膜分画に精製 HSP70 とオーキシンを加え、ATP で反応させたところ、CHC17 は脱重合したが、CHC22 はしなかった。飢餓ストレスによる CHC22 の脱被覆には未知のメカニズムが関与していることになる。

#### CHC17 と CHC22 の分離

CHC22 蛋白質の分子特性についてさらに検討するため CHC17 との分離を試みた。HeLa 細胞から細胞質、細胞膜、各分画を抽出し、CHC22 と CHC17 およびサブユニットであ

るクラスリン軽鎖(CLC)の蛋白質分布を調べた。CHC22はCHC17およびCLCと同様にCHC17とCLCsがCCV分画に多く分布していた。CHC17の重合・脱重合はpH依存的で、CHCはアルカリ条件では脱重合し単量体となる。精製したCCV分画のpHを変化させCHC22およびCHC17の被覆小胞からの遊離を観察したところ、CHC17は生理的pHで遊離したが、CHC22はよりアルカリ条件ではじめて遊離した。これは、CHC22がCHC17と比較して細胞内環境で重合状態により安定することを意味する。次にCHC22のバスケット形成能を検討した。単量体化したCHC溶液のpHを再度酸性にした。その後、重合体を超遠心により分離し、CHC22の重合を観察された。この結果は、CHC22の被覆バスケット形成能を示唆する。次にCHC22の精製をおこなった。CHC22を過剰発現させた細胞(HeLa-CHC22TetOn)からCCVを抽出。段階的にpHを変化させることでCHC22とCHC17の分離にした。

#### CHC22小胞の観察

脱被覆したCHC17は重合条件におくと試験管内で再重合することが知られている。CHC22が再重合時に実際にバスケットを形成するか調べた。前項で分離したCHC22を再重合させたところ凝集塊は形成するものの、電子顕微鏡で観察してもCHC17のようなバスケット構造は観察できなかった。そこで免疫電顕によりCHC22抗体で標識した膜分画を観察するとクラスリン特有のバスケット被覆に分布するのが観察された。このことから、CHC22は被覆形成にかかわるものの、CHC17と異なり、バスケット形成には別因子が必要であることが分かった(論文投稿中)。

以上の結果より、呼吸障害ストレスによるCHC核移行は分画サンプルにおいて観察されるものの、形態実験での裏付けを取ることが出来なかった。この相違の原因について今後の検討が必要である。一方、細胞内局在の変化を調べる過程を通じてCHC22の分離と観察、その生化学的性質に関して重要な知見を与えることにはじめて成功した。明らかになったCHC22の凝集性の高さは、細胞内小胞輸送やCHC核移行に影響を与えることが考えられ、今後の研究につながる内容といえる。

#### 参考文献

- (1) Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. *Nature*. 434(7037):1152-1157. 2005.
- (2) Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. Enari M, Ohmori K, Kitabayashi I, Taya Y. *Genes Dev*. 20(9):1087-1099. 2006.
- (3) A role for the CHC22 clathrin

heavy-chain isoform in human glucose metabolism.

Vassilopoulos S, Esk C, Hoshino S, Funke BH, Chen CY, Plocik AM, Wright WE, Kucherlapati R, Brodsky FM. *Science*. 324(5931):1192-1196. 2009.

#### 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5件)

1) The CHC22 Clathrin-GLUT4 Transport Pathway Contributes to Skeletal Muscle Regeneration. Sachiko Hoshino, Kazuho Sakamoto, Stéphane Vassilopoulos, Stéphane M. Camus, Christine A. Griffin, Christopher Esk, Jorge A. Torres, Norio Ohkoshi, Akiko Ishii, Akira Tamaoka, Birgit H. Funke, Raju Kucherlapati, Marta Margeta, Thomas A. Rando, Frances M. Brodsky. *PLOS ONE* 8(10)e77787, 2013.

2) スタチンによる横紋筋融解症のメカニズム. 坂本多穂 福島医学雑誌 63(3)145-152, 2013.

3) Mechanism of Statin-Induced Rhabdomyolysis. Kazuho Sakamoto, Junko Kimura. *Journal of Pharmacological Sciences* 123(4)289-294, 2013.

4) The inhibitory effect of shakuyakukanzoto on K<sup>+</sup> current in H9c2 cells. Azusa Suganami, Kazuho Sakamoto, Tomoyuki Ono, Hirotake Watanabe, Nohoko Hijioka, Masahiro Murakawa, Junko Kimura. *Fukushima J Med Sci*. 60(1)22-30, 2014.

5) THE INHIBITORY EFFECT OF PACLITAXEL ON (KV2.1) K<sup>+</sup> CURRENT IN H9c2 CELLS. Naoko Kitamura, Kazuho Sakamoto, Tomoyuki Ono, Junko Kimura. *Fukushima J Med Sci*. 61(1) 47-53, 2015

[学会発表](計15件)

1) Metabolic regulation of CHC22 clathrin membrane association. Frances M. Brodsky, Stéphane Camus, Yvette Schollmeier, Jorge Torres, Kazuho Sakamoto, FASEB SRC: Glucose Transport. 2013年7月14日. Snowmass Village, CO, USA.

2) The CHC22 clathrin contributes to skeletal muscle regeneration. Kazuho Sakamoto, Stéphane Camus, Sachiko Hoshino, Stéphane Vassilopoulos, Cristene A. Griffin, Christopher Esk, Jorge A.

Torres, Frances M. Brodsky. FASEB SRC: Glucose Transport. 2013年7月14日. Snowmass Village, CO, USA.

3) 2型糖尿病関連因子クラスリン重鎖 CHC22 の機能解析. 坂本多穂, Jorge Torres, Stephane Camus, Frances Brodsky. 第64回日本薬理学会北部会. 2013年9月14日. 旭川.

4) クラスリン重鎖 CHC22 被覆調節のメカニズム. 坂本多穂, カムス M ステファン, トーレス A ジョージ, プロズキー M フランシス. 第91回日本生理学会大会 日本生理学会. 2014年3月17日. 鹿児島.

5) クラスリン重鎖 CHC22 制御機構の解明. 坂本多穂, カムス M ステファン, トーレス A ジョージ, プロズキー M フランシス. 第87回日本薬理学会年会 2014年3月20日. 仙台.

6) クラスリン重鎖 CHC22 の解析. 坂本多穂, カムス M ステファン, トーレス A ジョージ, プロズキー M フランシス. 第9回トランスポーター研究会年会 2014年6月14日. 名古屋

7) 低/中コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル開口薬による骨格筋分化の促進. 田中翔子, 坂本多穂, 木村純子. 第65回日本薬理学会北部会. 2014年9月27日. 福島.

8) DCEBIO, a small/intermediate conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channel opener, enhances myogenic differentiation in C2C12 myoblasts. Kazuho Sakamoto, Shoko Tanaka, Junko Kimura. The 45th NIPS Internaional Symposium, co-sponsored by The Journal of Physiology. 2014年11月25日. 岡崎.

9) 低/中コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル開口薬 DCEBIO は C2C12 細胞の筋分化を促進する. 坂本多穂, 田中翔子, 木村純子. 第24回日本循環薬理学会. 2014年12月5日. 山形.

10)  $K^+$  チャネル開口薬 DCEBIO は C2C12 細胞の筋分化を促進する. 坂本多穂, 田中翔子, 木村純子. 筋生理の集い. 2014年12月6日. 東京.

11) 小/中コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化型  $K^+$  チャネル開口薬の骨格筋分化への作用. 坂本多穂, 田中翔子, 木村純子. 第88回日本薬理学会年会. 2015年3月19日. 名古屋.

12) Effect of Small/Intermediate Conductance  $Ca^{2+}$  Activated  $K^+$  Channel Opener on Myogenic Differentiation in

C2C12 myoblasts. Kazuho Sakamoto, Shoko Tanaka, Junko Kimura. Experimental Biology 2015年4月1日 Boston

13) Lipopolysaccharide はマウス筋芽細胞 C2C12 の筋分化を抑制する. 大野雄康, 坂本多穂, 木村純子. 第66回日本薬理学会北部会 2015年9月26日 富山

14) Lipopolysaccharide のマウス骨格筋細胞 C2C12 の筋分化への影響. 大野雄康, 木村純子, 坂本多穂. 筋生理のつどい. 2015年12月19日. 東京.

15) Lipopolysaccharide がマウス骨格筋細胞 C2C12 の筋分化へ与える影響. 大野雄康, 木村純子, 坂本多穂. 第89回日本薬理学会年会 横浜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本多穂 (SAKAMOTO KAZUHO)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80433150