

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660234

研究課題名(和文)造血系細胞の分化成熟を規定する細胞内コレステロールの調節機構とその制御法の確立

研究課題名(英文)Molecular basis of intracellular cholesterol regulation in the maturation of canine erythroid cells.

研究代表者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：柴犬等の日本犬の赤血球には未熟な性質である細胞内高カリウム(HK)型形質がみられる。本研究ではHK型形質の原因遺伝子の同定とその機序の解明を目的とした。HK型犬家系に対するゲノムワイド関連解析により、HK形質の原因はTSP02遺伝子変異であることが明らかになった。また、TSP02発現K562細胞における細胞内コレステロール分布を比較したところ、野生型TSP02発現細胞において、C変異TSP02発現細胞と異なるコレステロールの細胞内分布を示した。このことから、変異TSP02ではコレステロール輸送機能異常が存在することが示唆された。赤芽球成熟にTSP02は重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dog red cells show low intracellular K<sup>+</sup> (LK) phenotype; however, some Japanese dogs have high intracellular K<sup>+</sup> (HK) red cells which exhibit characteristics similar to reticulocytes. In the present study, we determined that TSP02 was the candidate gene for the HK phenotype by genome-wide association study. HK dogs possessed two different mutant alleles in TSP02 that resulted in amino acid substitutions: C40Y and the triple mutations V89F/ F98/T120I (VFT). Analysis of genomic DNA demonstrated that the dogs possessing HK red cells were homozygotes for the C40Y allele or compound heterozygotes for the C40Y and the VFT allele. In stable transfectants of K562 cells, the intracellular deposition of free cholesterol was evident in K562 cells expressing wild-type TSP02 but not in cells expressing C40Y or VFT mutants. These findings suggest that impaired cholesterol metabolism during erythroid development and maturation are involved in the molecular cause of the HK red cell phenotype.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：コレステロール 赤芽球 分化成熟 赤血球 犬

## 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞内においてその含量や細胞内小器官における分布が厳密に規定されており、その異常は細胞増殖や分化成熟の異常として観察される。細胞におけるコレステロールレベルについては小胞体におけるコレステロール産生の調節機構がよく研究されているが、小胞体からどのようにその他の小器官にコレステロールが輸送されるのか、すなわち細胞内における分布の調節機構に関しては未だに不明な点が多い。造血系細胞では、細胞内コレステロール代謝の異常が白血病などの造血系腫瘍や再生不良性貧血などの造血異常症の病態に関与することから、正常な造血の進行にコレステロールの調節機構は必須の分子機構と考えられている。

一方、申請者らは 25 年以上前から家系を維持している遺伝性高カリウム赤血球 (HK 型赤血球) を有する日本犬について、その原因遺伝子を探索してきたが、最近、その原因遺伝子が第 12 番染色体の 300 kb の領域に存在することを突き止めた。これは、この領域に存在する遺伝子がコードする蛋白質の機能的異常が犬における赤芽球細胞の分化成熟に重要な役割を果たすことを示唆している。さらに候補として TSPO2 が最も有力であることが示唆されていたが、どのように赤芽球細胞の分化成熟を調節しているのかについては、明確な分子メカニズムは全く解明されていない。すなわち、赤芽球において TSPO2 を中心とした細胞内コレステロール調節機構を解明することは、赤芽球を含む造血系細胞の増殖や分化成熟の分子基盤の解明につながると考えられていた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、次の 3 点について重点的に検討を行う。

1. 変異 TSPO2 による細胞内コレステロール輸送異常の分子機構の解明
2. 細胞内コレステロール輸送異常による造血系細胞の分化成熟異常の分子機構の解明
3. TSPO リガンドによる造血系細胞における細胞内コレステロール輸送の調節法の確立

これらの検討により、造血系細胞の増殖および分化成熟の分子機構が明らかになる一方、人為的に細胞内コレステロールレベルを調節する方法が開発され、血液・造血器疾患の新たな治療法の基盤的技術が確立できる。

## 3. 研究の方法

遺伝性 HK 型赤血球原因遺伝子産物である変異 TSPO2 によるコレステロール輸送など分子レベルでの機能異常を明らかにする。さらに、主に犬骨髓細胞培養および TSPO2 遺伝子導入赤芽球細胞株を用いて赤芽球における TSPO2 の役割を明らかにし、その機能異常により赤芽球系細胞の分化成熟異常が発症する分子機構を解明する。また、生体における当該遺伝子異常の造血系細胞に及ぼす影響を明らかにするために遺伝子導入マウスの確立を行い、*in vivo* での当該遺伝子産物の病態生理学的役割を明らかにする。また、野生型および変異 TSPO2 について、立体構造解析を基盤として新たなリガンド探索を行い、TSPO2 (ならびに TSPO1) の機能を制御する化学物質あるいは手法を確立し、血液・造血器疾患治療の基盤的技術を開発する。

## 4. 研究成果

(1) HK 型赤血球を有する犬の家系における SNP 関連解析

はじめに、HK 型形質原因遺伝子を特定するために、HK 型犬を含む犬家系を用いたゲノムワイド SNP 関連解析を実施した。

HK 型犬家系では 12 番染色体の 9.7Mb - 10Mb の領域に HK 型形質と関連の強い SNP が存在することが明らかになった。

次に、この領域に存在する 12 遺伝子の塩基配列を決定したところ、HK 型犬の TSPO2 遺伝子に 2 種類の変異 (C40Y および VFT 変異) が見出された (図 1)。

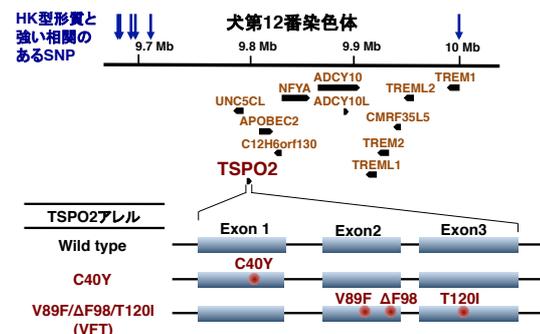


図 1. HK 型犬 TSPO2 遺伝子の変異

これらの変異の保有状況は HK 型形質と完全に一致しており (図 2)、TSPO2 の変異が HK 型形質の原因であることが強く示唆された。

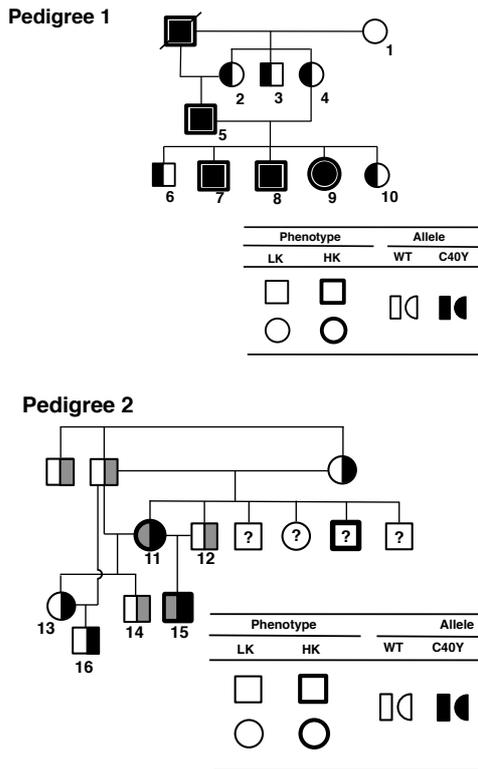


図 2. HK 型犬家系における TSPO2 遺伝子変異の保有状況

(2) TSPO2 遺伝子変異と細胞内コレステロール代謝

TSPO2 はコレステロール輸送蛋白質であることが予想されていることから、次に野生型および変異 TSPO2 を発現する赤芽球系細胞株として K562 細胞にこれらの TSPO2 遺伝子を導入し、安定発現細胞株を得た。TSPO2 は主に小胞体に分布した。そこで細胞内コレステロールの分布を、これらの細胞を赤芽球系への分化誘導剤である酪酸およびヘミン存在下で Filipin 染色により比較した。細胞内コレステロールは野生型 TSPO2 発現細胞で蓄積を示すものの、変異型 TSPO2 発現細胞では蓄積が見られなかったことから、細胞内コレステロール輸送に何らかの影響があるものと考えられた。次にこの細胞内コレステロールが小胞体における蓄積か検討するために、小胞体コレステロール量を反映する LDL レセプター遺伝子プロモータールシフェラーゼリポーター系を確立し比較した (図 3)。

この系ではコレステロール量が多いとルシフェラーゼ活性が低値となるが、小胞体コレステロールは野生型 TSPO2 発現細胞で有意に増加していることが示された。

以上の結果より、HK 型形質の原因遺伝子は TSPO2 遺伝子であり、TSPO2 は赤芽球細胞内におけるコレステロール輸送に影響し、変異型ではその機能が喪失していることが

示唆された。このように TSPO2 は赤芽球細胞の分化成熟に重要な役割を果たす分子であることが明らかとなった。

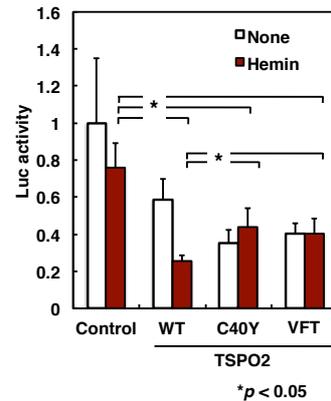


図 3. LDLR ルシフェラーゼリポーター系による小胞体コレステロール量の比較

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 2 件)

1. Otsu, W., Kurooka, T., Otsuka, Y., Sato, K. and Inaba, M. A new class of endoplasmic reticulum export signal  $\Phi X \Phi X \Phi$  for transmembrane proteins and its selective interaction with Sec24C. *J. Biol. Chem.* 288:18521-18532. 2013 査読有
2. Sato, K., Otsu, W., Otsuka, Y., and Inaba, M. Modulatory roles of NHERF1 and NHERF2 in cell surface expression of the glutamate transporter GLAST. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:839-845. 2013 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 佐藤 耕太、川田 玲央、大津 航、宮園 耕介、杉本 喜憲、稲葉 睦. 犬赤血球 HK 型形質原因遺伝子 TSPO2 の同定と機能解析. (第 35 回日本膜学会年会 2013.5.20. 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館、東京都)
2. 大津 航、大塚 弥生、宮園 耕介、佐藤 耕太、稲葉 睦. R664X 変異 Anion Exchanger 1 (AE1) の小胞体関連分解: AE1 と小胞体蛋白質の相互作用. (第 35 回日本膜学会年会 2013.5.20. 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館、東京都)

3. 佐藤 耕太、川田 玲央、大津 航、  
宮園 耕介、杉本 喜憲、稲葉 睦.  
犬赤血球 HK 型形質原因遺伝子  
TSPO2 の同定と機能解析. (第 156 回  
日本獣医学会学術集会 2013.9.21.  
岐阜大学、岐阜市)
4. 宮園 耕介、新敷 信人、大津 航、  
佐藤 耕太、稲葉 睦. 牛グロビンス  
イッチングにおけるγグロビン遺伝  
子の選択的発現制御メカニズム. (第  
156 回日本獣医学会学術集会  
2013.9.21. 岐阜大学、岐阜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：50283974

(2)研究分担者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号：00183179