

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650034

研究課題名(和文) 胃壁細胞と筋細胞に共通な小胞動態の分子基盤

研究課題名(英文) Vesicular dynamics in parietal and muscle cells

研究代表者

竹島 浩 (Takeshima, Hiroshi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70212024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミツグミン53 (MG53)は筋細胞の表膜直下に分布する修復小胞に局在し、細胞膜障害時には小胞を損傷部位に集積させて、パッチ膜修復に寄与する。一方、TRIM50は胃壁細胞の細管小胞に局在しており、刺激時には小胞の规律的な融合・再脱却を制御することで、胃酸分泌に寄与する。一次構造上極めて近縁なMG53とTRIM50は共に細胞内小胞を制御しており、修復小胞と細管小胞の動態には類似分子群による共通の分子機構が想定された。本研究では修復小胞と細管小胞を調製し、その主要な構成タンパク質を分子同定して、構造類似のモータータンパク質や細胞骨格アダプタータンパク質などの検索が行われた。

研究成果の概要(英文)：Mitsugumin 53 (MG53) is localized to repair vesicles underneath the cell membrane in muscle cells, and controls vesicular nucleation toward damaged sites during cell injury. TRIM50 is localized to tubulovesicles in in gastric parietal cells, and regulates vesicular dynamics during gastric acid secretion. MG53 and TRIM50 share a highly homologues structure, and we thus hypothesize that the repair vesicles and tubulovesicles may be regulated by similar molecular mechanisms. In this research project, we tried to identify structurally-similar components, for example, motor proteins and adaptor proteins to cytoskeleton, shared by muscular repair vesicles and parietal tubulovesicles.

研究分野：生化学

キーワード：MG53 TRIM50

1. 研究開始当初の背景

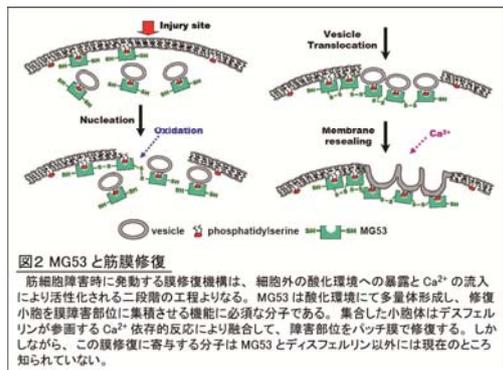
RBCC/TRIM ファミリータンパク質群はアミノ末端側に Ring finger, B-box および Coiled-coil モチーフを共有しており (RBCC/TRIM ドメイン)、哺乳動物組織には 80 以上の RBCC ファミリー分子群が分布する (図1)。また、Ring finger モチーフはユビキチン E3 リガーゼに共通する構造として知られ、近年では 20 程度の RBCC タンパク質においてそれぞれの特異的基質タンパク質が同定されており、実際に E3 リガーゼとして機能することが報告されている。筋細胞膜タンパク質の新規同定を試みた研究代表者の分子検索にて、筋細胞特異的なミツグミン 53 (MG53)/TRIM72 が 10 年程前に単離された。MG53 は筋細胞の表膜直下に分布する小胞上に局在し、細胞膜の障害時に活性化するパッチ膜修復に寄与することも解明した (Nature Cell Biol 2009)。その後の解析にて (J Biol Chem 2011; FASEB J. 2012)、膜損傷部位を目掛けて小胞が集合する反応に MG53 が必須となることも判明している。



一方、RBCC/TRIM ファミリー内で、MG53 に最も近縁な分子は TRIM50 であり、胃酸分泌を担当する壁細胞に特異的に発現している。胃酸分泌能の低下を示す MG53 欠損マウスの解析にて (J Biol Chem 2012)、その壁細胞ではヒスタミン刺激により細管小胞が規則正しく集合・融合して分泌細管を形成する工程が障害されていることを研究代表者らは解明した。従って、MG53 と TRIM50 は、規律的な小胞の集合運動に寄与する機能を共有していることが強く示唆される。従って、筋膜修復と胃酸分泌の小胞動態の分子機構は不明であるものの、共通な分子基盤により修復小胞と細管小胞が目的部位に集積する可能性が想定される。この仮説検証を目的に、研究代表者のグループ内では以下に示す本研究計画が立案された。

2. 研究の目的

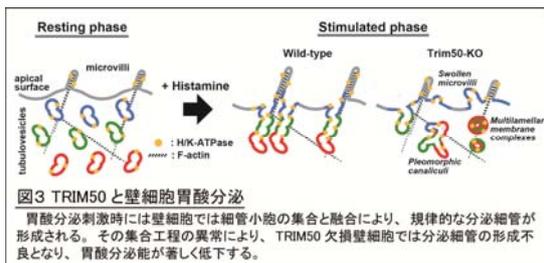
MG53 と TRIM50 に着眼する本研究の最終目的は、“筋細胞の修復小胞と壁細胞の細管小胞は共通な機構で動態制御されているか否か” という命題に対する解答を得ることである。この目的達成に向けて、MG53-TRIM50 のペア以外に、筋細胞の修復小胞と胃壁細胞の細管小胞に共通な膜タンパク質ペアの同定が可能ではないかとの想定に到り、以下に説



明する実験が企画され、両小胞の主要なタンパク質構成のカタログ化が本研究における具体的な到達目標となった。

MG53 は筋細胞特異的に発現しており、カルボキシ末端側の PRY-SPRY ドメインが有するリン脂質 (PS) 結合活性を介して細胞膜直下の小胞に付着して細胞内に分布する。膜障害時には細胞外の酸化環境への暴露が引き金となり、MG53 が分子間 S-S 結合を介して多量体を形成し、MG53 が付着した修復小胞が障害部位に集合する (図2)。その後、Ca²⁺ 依存性の小胞膜融合が活性化して、パッチ膜形成により損傷部位が修復される。この膜修復の分子レベルでの機構はまったく不明であり、その解明に向けて MG53 の多量体形成により活性化される小胞集積に寄与するモータータンパク質、細胞骨格タンパク質や反応制御タンパク質などの同定が必須であると考えられている。

一方、TRIM50 は胃壁細胞特異的に発現しており、PRY-SPRY ドメインが有するリン脂質 (PIP) 結合活性を介して大量の H⁺ポンプを擁する細管小胞に付着して分布する。ヒスタミンやアセチルコリンに反応して壁細胞では細管小胞が集積・融合して、規則的に配列した分泌細管を形成して胃酸分泌が活性化する。TRIM50 欠損マウスでは胃酸分泌が低下しており、壁細胞においては細管小胞の集積障害に起因する規律的な分泌細管の形成不良が観察された (図3)。細管小胞による分泌細管の形成の分子機構にはアクチン骨格系や Rab ファミリータンパク質の寄与が示唆されているものの、その詳細は不明である。従って、その解明に向けては上記の MG53 の事例と同様に、小胞集積に寄与する集積目標タンパク質、モータータンパク質や反応制御タンパク質などの同定が必須であると考えられている。



3. 研究の方法

筋小胞体 Ca^{2+} ストア機能の分子構築の解析を手掛ける研究代表者のグループでは、独自に開発した分子検索法にて MG53 を含む新規な膜タンパク質の同定に成功している。このオリジナルな検索法は、1)ウサギ骨格筋より筋小胞体を調製し、2)マウスに免疫することにより、3)多様な単クローン抗体を作成し、4)骨格筋組織染色による抗原タンパク質の細胞内局在とウエスタンブロットによる分子量を指標に抗体を選別し、5)新規な抗原タンパク質は抗体アフィニティークロマト法で精製し、6)部分アミノ酸配列決定と DNA クローニングにより抗原の同定を行い、7)変異作成などにより抗原タンパク質の機能解析へ発展させるという一連の工程よりなる。本研究で着眼する筋細胞の修復小胞は細胞膜直下に、壁細胞の細管小胞はアピカル膜直下に局在するため、両小胞に分布するタンパク質は蛍光抗体組織染色の観察にて容易に識別可能である。従って、既に試行錯誤を重ねて確立した単クローン抗体を活用した検索法を流用したスクリーニングが、本研究においても主要な実験として計画された。

上記の分子検索実験では、マウスを免疫する抗原試料の質が重要な要素となる。骨格筋の生化学的な細胞分画法は 1980 年代には確立し、シヨ糖密度勾配遠心法にて各種膜画分の調製が可能である。本研究で注目する修復小胞は小型であり、5-10%シヨ糖の低比重分画に細胞膜とともに回収されることが予備的実験から判明していた。低比重部をさらに細分化する調製実験を試行し、MG53 を指標とした修復小胞の高純度精製法の最適化を計画した。一方、ラット胃粘膜層からの既存法に従い胃壁細胞膜画分を調製した後、密度勾配遠心法などの条件検討と TRIM50 を指標とした純度検定により、免疫抗原としての最適化を試みる計画を立案した。

研究代表者が所属する部局では、医薬品シーズ探索のために独自の天然物および化学合成物を収集した化合物ライブラリーを構築している。 H^+/K^+ -ATPase 抑制化合物が既に消化性潰瘍治療薬として開発されているものの、同様の作用を有する新規骨格化合物を見出すことも薬学的視点からは意義深い。上記の胃粘膜試料には H^+/K^+ -ATPase が濃縮されており、一部をスクリーニング用酵素試料として流用して、化合物ライブラリーにおける検索実験も行った。

4. 研究成果

H26 年度の主要成果：

膜修復に寄与すると推察される MG53 が分布する小胞を、ウサギ骨格筋より高純度で調整する方法を検討した。一連の検討にて、粗マイクロソーム試料よりシヨ糖密度勾配遠心による低比重分画を得て、低濃度 Triton X-100 処理後に密度遠心勾配による浮上する膜分画に MG53 が濃縮されることが判明した。

この試料中のタンパク質を SDS ゲル電気泳動により分析し、主要構成分子についてはトリプシン分解一質量分析法により分子同定を行った。充実したウサギのタンパク質データベースは無いために分子同定に難航する場合も多いが、数出の既知膜タンパク質の検出に成功した。

MG53 欠損マウスと TRIM50 欠損マウスを複製した研究代表者のグループは、本研究と並行して、変異マウスの機能解析研究も国内外グループと共同にて推進している。本研究の取り組みも含めて、研究代表者らの MG53 に関する研究進展について論文発表にて解説した。

H^+/K^+ -ATPase 阻害化合物の検索のため、酵素アッセイ系の最適化トリアルも実施された。微量自動分注器と自動プレートリーダーを利用して、ATP 分解の比色定量に基づき酵素活性を評価するハイスループットアッセイ系が構築された。

H27 年度の主要成果

抗体染色強度を指標にして、ラット胃粘膜組織より TRIM50 含有膜分画の精製・濃縮法を様々な条件で検討を行った。しかしながら、上述の MG53 の事例とは異なり、海面活性剤による純化法が見出せずに、以前より調製法が確立している細管小胞試料と比較して、TRIM50 含有膜試料を高純度に濃縮することは出来なかった。そこで、細管小胞試料を SDS ゲル電気泳動により分析し、主要構成分子についてはトリプシン分解一質量分析法により分子同定を遂行中である。得られる分析データに基づいて、小胞輸送に寄与すると考えられる MG53 小胞と TRIM50 小胞に共通に分布する膜タンパク質を検索する予定である。一方、上述の単クローン抗体を用いた分子検索実験にも着手しており、組織切片による蛍光抗体染色によるスクリーニングも行われている。

上記の実験と並行して計画された MG53 欠損マウスの肺組織に注目した実験が順調に進展した。MG53 は肺胞上皮細胞にも低発現しており、その欠損により物理的刺激による肺胞組織損傷が増悪することが観察された。従って、筋組織のみならず、肺胞においても MG53 は膜修復に寄与しており、この並行して得られた観察結果の学会発表と論文報告も行った。

H^+/K^+ -ATPase 阻害化合物の検索では、数種のヒット化合物が見出された。以前の研究報告例を調査したところ、得られた化合物の中では、ポリフェノールに分類される天然物化合物の阻害作用は新規性の観点から極めて興味深い。 H^+/K^+ -ATPase は P-type ATPase ファミリーに属しており、ヒット化合物のファミリーメンバーにおける阻害スペクトルや *in vivo* 条件下での胃酸分泌抑制作用についてが、今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Zhou, X., Lin, P., Yamazaki, D., Park, K-H., Komazaki, S., Chen, R. S. W., Takeshima, H. & Ma, J. Trimeric intracellular cation channels and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Circ. Res.* 114, 706-716, 2014. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301816
2. Nagre, N., Wang, S., Kellett, T., Kanagasabai, R., Deng, J., Nishi, M., Shilo, K., Oeckler, R., Yalowich, J., Takeshima, H., Christman, J., Hubmayr, R. & Zhao, Z. TRIM72 modulates Caveolar endocytosis in repair of lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 310, L452-464. doi: 10.1152/ajplung.00089.2015.
3. Wool, J-S., Srikanth, S., Nishi, M., Ping, P., Takeshima, H. & Gwack, Y. Junctophilin-4, a component of the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions regulates Ca²⁺ dynamics in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 2762-2777, 2016. doi: 10.1073/pnas.1524229113.
4. Takeshima, H., Hoshijima, M. & Song, L-S. Ca²⁺ microdomains organized by junctophilins. *Cell Calcium* 58, 349-356, 2015. doi: 10.1016/j.ceca.2015.01.007.

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. Zhu, H., Takeshima, H., Nishi, M., Jin, F., Zheng, Y., Tan, T., Park, K-H. & Ma, J. A potential molecular mechanism for regulation of transverse tubule network in muscles. Cell Biology Meeting, Poster presentation (San Diego, Dec 14, 2015).

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹島浩 (TAKESHIMA, Hiroshi)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70122024