

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 2 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670108

研究課題名(和文)カルシウム受容体搭載型シグナル小胞の研究

研究課題名(英文)Understanding Ca sensing receptor-loaded vesicle in parathyroid glands

## 研究代表者

伊村 明浩 (Imura, Akihiro)

公益財団法人先端医療振興財団・医薬品研究開発部・研究員

研究者番号：60362513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：報告者は副甲状腺の組織学的検討により、CaRが凝縮されている小胞様構造物を発見し、その主要構成成分であるTspan8に着目し、副甲状腺細胞特異的にノックアウトしたところ、血清Ca濃度が1.5倍以上に上昇することが判明した。このマウスではCaイオンの感受能力が低下したと考えられる。従ってこの結果は、CaRが正確に機能するためには、特殊なTspan小胞が必要であることを示す。今回作成したTsp-KOMは極度の高Ca血症にも関わらず一見健康で、繁殖性が保たれている。この事実は、CaRとTspanの生理的役割が異なることに加え、Caイオン値の異常はただちに健康に悪影響を及ぼさないことも示している。

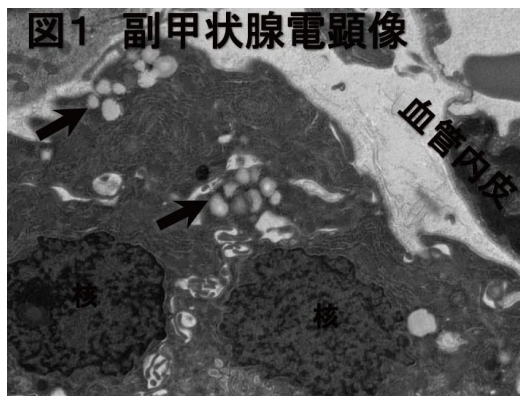
研究成果の概要(英文)：We've discovered unique intracellular vesicle condensing calcium sensing receptor in the parathyroid gland cells. Because tspan8 was found as an important component of the vesicle, we created parathyroid tissue-specific Tspan8-knockout mice to check the physiological function of tspan8 in mineral metabolism. Serum calcium ion level was increased at about 1.5 fold compared with that of WT mice, suggesting Tspan8 in parathyroid gland should be pivotal to maintain mineral level in vivo. Different from CaR-KOM, tspan8-KOM appeared almost healthy. Moreover, we found may extraordinarily huge vesicles like vacuolae in parathyroid cells by TEM technology. These findings revealed that tspan8 plays an important role in mineral homeostasis, especially in calcium sensing apparatus. Accordingly, tetraspanin 8-composed vesicle must function as a mineral sensing circumstance that should make sense of the extracellular fluid enclosed in the space.

研究分野：生理学、分子生物学

キーワード：ミネラル代謝 副甲状腺 カルシウム受容体 テトラスパニン

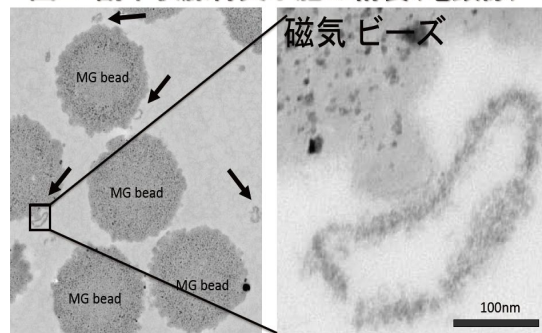
### 1. 研究開始当初の背景

報告者は、膜分子クロトーが Na,K-ATPase(Na ポンプ)の調節的なリクルートを可能にし、ミネラル恒常性に関わることを報告してきた(伊村ら、Science,2007)。しかしどのようなシグナルでクロトーが作動するのかについては不明であった。そこで報告者は、副甲状腺細胞の Ca 感知シグナルに未知の機構が存在するのではないか、という作業仮説に基づき、探索を開始した。その結果、エンドサイトーシスによって生まれ、細胞内にシグナルを増幅・伝播する CaR 搭載小胞の発見に至った(図1)。



一方オックスフォード大グループにより、遺伝性高カルシウム血症の家系ゲノムから、エンドサイトーシスに関わる AP-2S1 遺伝子の変異が発見され、細胞外カルシウム感知がエンドサイトーシスにより事別の方向から明らかにされつつある(RV Thakkerら、Nat. Gene,2013)。細胞外イオン濃度は細胞表面で感知されると考えられて来たが、実際はエンドサイトーシス小胞により感知されていることを意味する。

### 図2 副甲状腺特異小胞の精製(電顕像)



### 2. 研究の目的

従来、体液カルシウム(Ca)は細胞膜表面で感知されると考えられて来た。応募者は Ca 受容体(CaR)のダイナミックレンジに疑問をもち、マウス副甲状腺の構造を精査したところ、Ca イオン感知にかかわる 360nm のエンドソーム小胞を精製できた。(図2) 同型の小胞は副甲状腺、カルシトニン分泌細胞、尿細管介在細胞に存在していた。構成要素として Ca 受容体(CaSR)に加えて、大量の G 蛋白が付随していることから、GPCR シグナルの感知装置と予想している。また、クラスリンや AP2 の存在から、エンドサイトーシスにより生成すると考えられる。今後、単離した小胞の物性解析、細胞再構成における pH イメージング、エンドサイトーシス観察、小胞を形成する主要因子であるテトラスパニン K0 マウスの表現型解析を計画している。本研究により、Ca 感知小胞の実体を定義し、生理的役割を理解したい。

### 3. 研究の方法

GPCR 搭載型シグナル小胞(以下、シグナル小胞)は、生体臓器に固有に存在し、培養細胞には見いだせない。従って人工系を構築するためには、いまのところマウスから精製した小胞をモデルとするしかない。ゆえに、まず生体からシグナル小胞を精製し、直径、構成因子、曲率などの物性物理、電位や pH などの生化学的解析を実施する。ついで、主要構成因子である Tspan-K0 マウスの解析(Loss-of-function)および HEK 細胞における再構成(12種類の cDNA の導入により成功済み、Gain-of-function)で、シグナル小胞の特性を物性、機能両面から解析する。これにより、生体でおきている「リアル GPCR リガンド結合」を理解し、再現する人工系を樹立する。

シグナル小胞の特性を理解するため、以下の手順で研究を行うこととした。

- (1) GPCR 搭載シグナル小胞の物性確定～ブラウン運動を計測し微粒子径を測定する NANOSIGHT による各臓器でのサイズ測定。免疫電顕による副

- 甲状腺細胞内部の局在決定。
- (2) シグナル小胞構成要素の cDNA 発現により、HEK 細胞再構成 (成功済み) の効率を検証
  - (3) 摘出副甲状腺ないし再構成培養細胞における、pH(pHrodo)、膜電位 (DiBAC4), Ca influx (Yellow Cameleon) をライブイメージング測定する。
  - (4) GPCR 搭載小胞の構成要素のうち、報告者はテトラスパニン (Tspan) の役割に注目している。現在 Tspan 臓器特異的 KO マウスを作成中であり、平成 26 年春から解析に入る予定である。そこで、このマウスの副甲状腺の微細形態を解析し、当該小胞が正常に形成されているかどうか確認する。GPCR 搭載小胞を形成できない可能性があるが、存在が確認されれば、小胞内 pH、膜電位、Ca influx、尿管 Ca 再吸収能、PTH 分泌 profile を解析する。
  - (5) 現在までの検討では、Tspan, v-ATPase, CaR, G 蛋白質などの分子が会合して自己組織化すると考えられる。この原因として Tspan サブファミリーの存在比が大きな動機になっていることに着目し、再構成系のなかで Tspan ストイキオメトリーを解析する。
  - (6) 現段階で、副甲状腺ホルモン分泌細胞内のシグナルカスケードを、図 6 のように考えている。すなわち、従来、リガンドを含む細胞外情報は細胞膜表面で感知されると考えられてきたが、情報の一部は endocytosis 小胞内で感知されている可能性がある。これは、おそらく cAMP の上昇となってホルモン分泌の実行を促すものと考えられる。この予測に従って、

- (7) 各種阻害剤およびテトラスパニン KOM において細胞内 cAMP が上昇するのか、否かを解析する。これにより、シグナルの流れを決定する事ができると期待される。
- (8) 報告者の計画によって、GPCR 搭載小胞の存在が証明でき、機能単位として理解されると期待できる。本研究の成果として、個体におけるシグナルの実体をより詳細に把握できる可能性がある。また、GPCR 由来シグナルの個体における研究という側面から、薬理的な重要性を展開できる可能性が高いと思われる。

#### 4. 研究成果

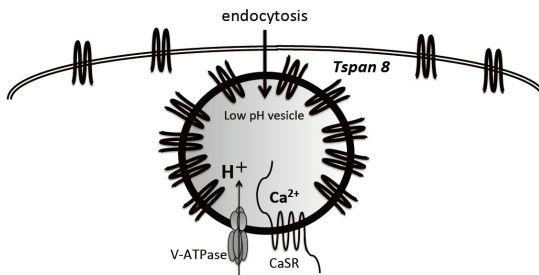
本研究において、まず副甲状腺および腎臓に存在する小胞の構成成分のストイキオメトリーを解析した。

次に、テトラスパニン 8 KO マウスを観察することができたが、体重体長は対照群と殆ど変化なく、ほぼ健康に見え、繁殖可能であった。血液検査の結果、Ca, Mg, Pi の異常値は検出されなかった。一方、骨の異常があり、大腿骨のマイクロ CT ではサイズと形態の違い (主として骨頭) が認められ、DEXA 検査では約 1 割の骨量減少 ( $p < 0.05$ ) が観察された。これは、Champy らにより報告された Tspan8-KO マウスの表現型と同一であるので、再現性をもって観察できたことになる (Int. Obesity, 2011)。

では、なぜ骨に表現型がみられるのだろうか? Tspan8 は副甲状腺のみならず、尿管、肺、腸管上皮をはじめ、骨細胞にも発現しているので、全身臓器の相関を考えると理解しにくくなる。そこでまず、Tspan8 発現の代表的臓器である腎臓に着目して、尿の解析を行った。ノックアウトマウス 2 系統 (EK01, EK02: n=4, 4) とリッター野生型 (n=4) の比較を実施した結果、Ca/Cre 比は

優位差がつかなかったが、KO マウス 2 系統の尿量は多く、結果として一日 Ca 排泄量は 3 倍程度であった。一日排泄量において、タンパク質の漏出および pH 変化は観察されなかった。Tspan8 が発現している尿細管のセグメントを考慮すると、Tspan8 はカルシウムの調節性再吸収に関与しているのではないかと想定される。この検討により、尿細管再吸収の表現型が見いだされたものの、骨の表現型は腎臓だけが原因であるかどうかは不明である。言い換えれば、腸管のイオン吸収機能、肺胞の呼吸機能も関与している可能性がある。この検証は今後の検討課題である。すなわち、

図3 作業仮説



Tspan8 contributes to the precise size, volume, and thus signal of CaR  
細胞レベルでは、エンドサイトーシスにより、細胞外物質の取り込みを経由した感知が行われ、また、同様のシステムを用いて物質輸送が行われているのではないか、という仮説が有力である。(図3)

このマウスの形態学的解析を行ったところ、KO マウスの副甲状腺内に、巨大な空胞が多数生じていた。これは、WT マウスにおいてはエンドサイトーシスによって CaR 搭載小胞が生じるところ、Tspan8 欠損により小胞形成がうまくいかず、空胞化したのではないかと予想している。この結果、カルシウムあるいはリン酸イオンを正確にモニターする事ができず、PTH ホルモン分泌を始めとする内分泌系に異常を来していると考えられる。

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)  
Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates  $\alpha$ -klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes.

Nabeshima Y, Washida M, Tamura M, Maeno A, Ohnishi M, Shiroishi T, Imura A, Razzaque MS, Nabeshima Y.

Sci Rep. 2014 Aug 1;4:5847. doi: 10.1038/srep05847.

[学会発表](計 2 件)  
招待講演 セミナー コペンハーゲン大学  
2015 年 2 月(デンマーク王国)

招待講演: CD13 and tetraspanin 8 in mineral metabolism

腎不全病態研究会口演 2014 年 7 月(東京)

招待講演「クロトールの糖鎖認識構造にもとづく尿細管シグナルの研究

副題「FGF23, FGF 受容体および Na ポンプへの結合様式を解明する」

[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:  
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

伊村明浩 (Imura, Akihiro)  
公益財団法人 先端医療振興財団・医薬  
品研究開発部・上席研究員  
研究者番号：60362513

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：