

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590267
 研究課題名（和文） 新規小胞体分子 calumin による細胞内小器官発シグナルの制御機構の
 解明
 研究課題名（英文） Analysis of the regulation of organelle-generated signals by the
 Novel endoplasmic protein calumin
 研究代表者
 山崎 哲男 (YAMAZAKI TETSUO)
 京都大学・薬学研究科・准教授
 研究者番号：90330208

研究成果の概要：研究者代表者は Ca^{2+} 結合能を有する小胞体タンパク質 calumin をモデル分子として、小胞体発シグナルの分子論的理解を目指した。樹立した calumin 欠損マウスの75%は胎児期に死亡した。背景に体液循環異常が示唆され、実際、同胎児の心血管系形成は未熟な段階で停止していた。また、 Ca^{2+} 依存性転写因子 NFAT の活性化が阻害されており、NFATc3/c4 二重欠損マウスとの類似性（胎生致死、心血管異常）を鑑みると、calumin と NFAT の機能共役が小胞体発シグナルの分子基盤の一端を成すと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：カルシウム

1. 研究開始当初の背景

小胞体は蛋白質合成・修飾や脂質合成の場であるとともに、主要な Ca^{2+} 貯蔵庫としても機能している。 Ca^{2+} ホメオスタシスが攪乱されると、unfolded protein response (UPR) と称されるストレス応答が小胞体から起動する。小胞体への負荷の程度に応じて、UPR は細胞生存および細胞死のいずれにも働き得る。しかしながら、優先する細胞運命を決定する分子機構は大部分不明である。それに加えて、小胞体の機能異常は神経疾患や発癌と

の関連が知られ、小胞体シグナルの分子的理解とその人為的制御は急務であった。

2. 研究の目的

研究代表者は小胞体による情報統合・シグナル発信に関する分子実体を明らかにする目的で小胞体局在分子を探索し、calumin を単離した。本研究では calumin をモデル分子として、細胞の運命決定にはたらく小胞体発シグナルの分子レベルでの理解を目指した。

3. 研究の方法

(1)胎生 8.5~10.5 日を中心として、各時点でのマウス胎児の遺伝子型を解析することによって、calumin 欠損マウスの死亡時期を検討した。

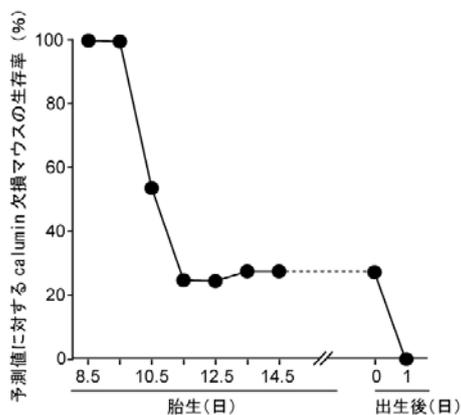
(2)併せて、胎児全身ならびに卵黄囊の血管形成の度合いを血管内皮細胞並びに血管平滑筋細胞それぞれのマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫組織染色によって評価した。

(3)マウス胎児線維芽細胞を用いた解析から caluminはストア作動性カルシウム流入

(SOCE) に関与している事実を研究代表者は明らかにした。。そこでSOCEによって制御される一連のシグナル分子の中でも、転写因子 NFATファミリーに着目した。NFATはカルシウム依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンによって活性化され、核内に移行する。NFATファミリーの構成員であるNFATc3ならびにNFATc4の二重欠損マウスは成熟血管網の構築および心クッションの形成双方が障害されており、胎生中期に子宮内で死亡することが報告されている。この二重欠損マウスと calumin欠損マウスに見られる表現型の類似性から、研究代表者は calumin とNFATファミリーが同一のカルシウムバイオシグナル経路上で機能する可能性を予測した。この仮説を検証するために、胎生9.5日の心臓のNFATc1の局在を免疫蛍光染色にて解析した。これと併行して、胎生9.5日における胎児全体の抽出物を対象とした免疫ブロットを施行し、NFATc4の移動度から活性化の有無を評価した。

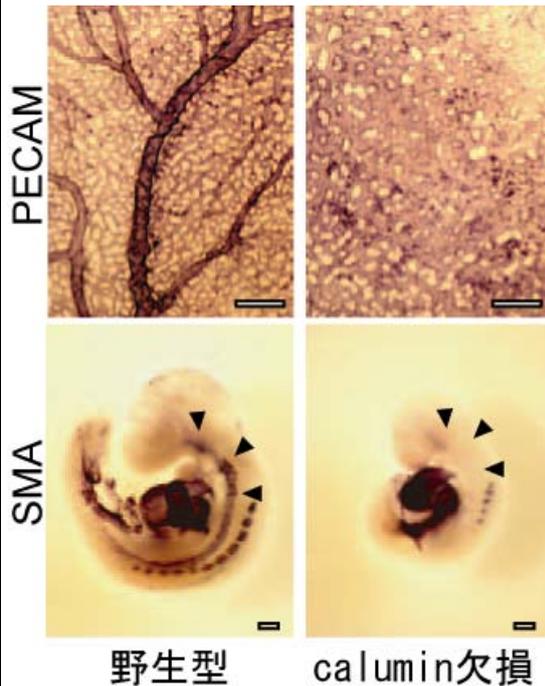
4. 研究成果

1) 胎生中期ならびに出生後の胎児の遺伝子型を PCR にて判別し、メンデルの法則に基づ



く予測値に対する calumin ノックアウトマウスの実際の生存率をグラフ化した。その結果、calumin 欠損マウスの大部分が胎生 10.5 日前後に死に至ることが示された。

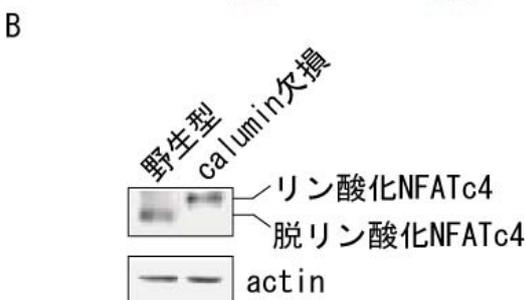
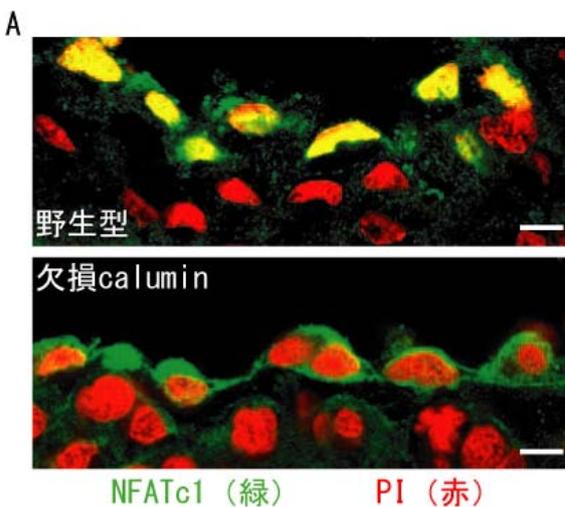
2) 胎生 9.5 日の胎仔を主たる対象として、胎生期の代謝・循環の中枢である卵黄囊と共に心血管系を重点的に解析した。血管内皮細胞のマーカーであるPECAM(血小板内皮細胞接着分子)の染色パターンから、胎生 9.5 日目の野生型卵黄囊には様々な口径を持つ血



管から成る複雑なネットワークが形成されているのが確認できた (図上段)。しかしながら、calumin欠損卵黄囊に観察されたのは専ら拡張した脈管を中心とする原始的血管叢であった。したがって、脈管形成に calumin は要求されないが、原始血管叢が血管新生を経て、成熟した血管網に移行する過程には同分子の存在が不可欠であることが明らかとなった。研究代表者は血管のもう一つの構成細胞である血管壁細胞に関しても、そのマーカーSMA (平滑筋アクチン) を染色することによって検討を加えた。calumin欠損卵黄囊ならびに胎仔の両方でSMA陽性細胞が確認され (図下段)、血管壁細胞の発生は calumin に非依存的であることが判明した。しかしながら、calumin欠損胎仔内のSMA陽性細胞の数は野生型内のそれと比較して少なく、また、背側大動脈領域はSMAシグナルそのものを欠いていた (図下段、矢頭)。同領域における血

管壁細胞のアポトーシスの程度をTUNEL法で検討したところ、野生型とcalumin欠損胎仔間に顕著な差は認められなかった（データ未掲載）。calumin欠損胎仔の体節が抗SMA抗体で染まっている事実から血管壁細胞への分化は進行していると考えられ、calumin欠損胎仔の背側大動脈領域がSMA陰性になっているのは、血管壁細胞の細胞死の亢進よりもむしろ同細胞の移動もしくは増殖の阻害を反映して可能性が高い。この場合、血管新生の進行に要求される血管内皮細胞と血管壁細胞の相互作用が制約され、それがcalumin欠損胎仔における成熟血管網の欠如、ひいては体液循環の障害として表出していることが想定された。

3) 胎生9.5日の心臓のNFATc1の局在を免疫蛍光染色にて解析した（下図A）。野生型胎仔の心内膜ではNFATc1の核内移行（黄色）が確認されたが、calumin欠損胎仔の対応部位ではNFATc1は細胞質に留まっており（緑色）、活性化されていないことが判明した。これと併行して、研究代表者は胎生9.5日における胎仔全体の抽出物を対象として、NFATc4の活性度を免疫ブロット法で評価した（下図B）。抗NFATc4抗体でブロットした



ところ、野生型胎仔中の当該分は calumin 欠損胎児中のそれよりも高い移動度を示した。これは NFATc4 のリン酸化状態の差異を反映していると考えられ、カルシニューリンによる NFATc4 の脱リン酸化および活性化が calumin 欠損胎仔では阻害されていることを示している。したがって、calumin はカルシウムシグナル伝達系路のより下流に位置する NFAT ファミリーを活性化することによって、心血管系の構築に寄与する可能性が強く示唆された。

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 7 件）

1. Yamazaki D., Yamazaki T. and Takeshima H. New molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release: roles of junctophilin and TRIC channel in embryonic cardiomyocytes. *Pharmacol. Therapeut.* 121: 265-272, 2009 査読有
2. Masumiya H., Asaumi Y., Nishi M., Minamisawa S., Adachi-Akahane S., Yoshida M., Kangawa K., Ito K., Kagaya Y., Yanagisawa T., Yamazaki T., Ma J. and Takeshima H. Mitsugumin 53-mediated maintenance of K⁺ currents in cardiac myocytes. *Channels* 3: 6-11, 2009 査読有
3. MacFarlane IV AW., Yamazaki T., Fang M., Sigal LJ., Kurosaki T. and Campbell KS. Enhanced NK-cell development and function in BCAP-deficient mice. *Blood* 112: 131-140, 2008 査読有
4. Aiba Y., Kameyama M., Yamazaki T., Tedder TF. and Kurosaki T. Regulation of B cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 111: 1497-1503, 2008 査読有
5. Ikeda A., Miyazaki T., Kakizawa S., Okuno Y., Tsuchiya S., Myomoto A., Saito S., Yamamoto T., Yamazaki T., Iino M.,

Tsujimoto G., Watanabe M. and Takeshima H. Abnormal features in mutant cerebellar Purkinje cells lacking junctophilins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 363: 835-839, 2007 査読有

6. Yamazaki T., Sasaki N., Nishi M., Yamazaki D., Ikeda A., Okuno Y., Komazaki S. and Takeshima H. Augmentation of drug-induced cell death by ER protein BRI3BP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362: 971-975, 2007 査読有

7. Zhang M., Yamazaki T., Yazawa M., Treves S., Nishi M., Murai M., Shibata E., Zorzato F. and Takeshima H. Calumin, a novel Ca²⁺-binding protein on the endoplasmic reticulum. Cell Calcium 42: 83-90, 2007 査読有

〔図書〕(計 1 件)

竹島 浩、山崎哲男、池田篤史、興水崇鏡
「医歯薬系学生のための illustrated 基礎生命科学」京都廣川書店 2008 年 pp145-236

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 哲男(YAMAZAKI TETSUO)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：9 0 3 3 0 2 0 8

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし