

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19030

研究課題名(和文)炎症性細胞間ネットワークにおけるTaxilinの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of the role of taxilin in release of inflammatory mediators

研究代表者

牧山 智彦(MAKIYAMA, TOMOHIKO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：60733102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単球からマクロファージへの分化過程において、細胞内小胞輸送制御因子Syntaxinの結合分子であるTaxilinの発現量が転写レベルでの調節により減少することを明らかにした。しかし、Taxilinを発現抑制しても単球からマクロファージへの分化に大きな変化は見られなかった。一方、Taxilin発現抑制によりLipopolysaccharide刺激によるマクロファージでの炎症性メディエーター産生量の増加が抑制されることも判明した。以上のことから、Taxilinが炎症性細胞の分化機構及び、炎症性メディエーター産生の制御の一端を担う可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Taxilin family members were identified as binding partners of the syntaxin family, known to play a central role in intracellular vesicle trafficking. Alpha- and gamma-taxilins favorably bind to syntaxin-4, known to be involved in inflammatory mediator release. Recent reports demonstrate that taxilin may be involved in function of inflammatory cells. Then, we examined whether taxilin is involved in release of inflammatory mediators. The amounts of both alpha- and gamma-taxilin proteins were decreased during differentiation of monocyte into macrophage and the decrease in protein levels of these proteins was regulated at transcriptional level. Neither of alpha- or gamma-taxilin depletion caused any change in the processes of differentiation of monocyte into macrophage. However, gamma-taxilin depletion attenuated lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators in macrophage. These results suggest that taxilin might be involved in production of inflammatory mediators.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症性反応 分化 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

喘息や潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患の病因の一つとして、マクロファージやマスト細胞などの炎症性細胞の細胞間ネットワークの破綻が挙げられる。この細胞間ネットワークは炎症性メディエーターを介して形成されており、この放出機構を解明することが炎症性疾患の病態の解明に繋がる。現在、炎症性メディエーターの放出には細胞内小胞輸送が関与していると考えられている。しかし、詳細な制御機構は、未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

細胞内小胞輸送を制御している SNARE 系の中心分子である Syntaxin ファミリーに属する Syntaxin4 は、単球/マクロファージからの Tumor necrotic factor alpha の放出に関与していることが報告されている。一方、所属研究室では、Syntaxin4 の結合タンパク質として alpha-Taxilin を世界に先駆けて発見しており、alpha-Taxilin の塩基配列の一部が、炎症性細胞において種々の刺激により発現が亢進することが報告されている。また、alpha-Taxilin のアイソフォームである gamma-Taxilin の塩基配列の一部が Lipopolysaccharide (LPS) 刺激により発現上昇する分子として LPS-responding gene protein の名で報告されている。

以上のことから Taxilin が炎症性反応、特に炎症性メディエーターの放出に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、本研究では、炎症性反応との関わりが報告されつつある小胞輸送関連分子である Taxilin に焦点を絞り、炎症性メディエーター放出における Taxilin の役割を明らかにし、炎症性疾患の病態と細胞内小胞輸送の関連性を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) Yeast two hybrid 法を用いた Taxilin 結合分子の探索

pGBKT7-full length gamma-Taxilin を Y2H 酵母に形質転換し、cDNA ライブラリーを形質転換済みの Y187 酵母と培養・接合した。接合した酵母を選択培地及び -galactosidase 活性の有無によるスクリーニングを行い、gamma-Taxilin と相互作用するタンパクの塩基配列をシーケンスにて解析した。

(2) 炎症性細胞への分化過程における Taxilin の動態解析

THP-1 細胞 (ヒト単球様細胞株) をホルボールエステル (PMA) 入りの RPMI1640 培地にて所定の時間培養した。細胞を wash 後に mRNA を抽出し、real time PCR 法を用いて細胞内 mRNA 量を測定した。

(3) 炎症性メディエーター産生量の測定

100 nM PMA で 3 日処置した THP-1 及び、RAW264 細胞 (マウスマクロファージ細胞株) を 1 µg/ml の LPS で刺激し、培養上清を回収し、ELISA にて培地中のサイトカインレベルを測定した。さらに、細胞から mRNA を抽出し、real time PCR 法を用いて細胞内 mRNA 量を測定した。

(4) 炎症性細胞への分化過程における Taxilin の機能解析

siRNA により alpha-Taxilin ならびに gamma-Taxilin の発現を抑制した THP-1 細胞を PMA 入りの RPMI1640 培地にて所定の時間培養し、CD11b と CD14 を指標にして分化過程を検討した。

(5) 炎症性メディエーター産生における Taxilin の機能解析

siRNA により alpha-Taxilin ならびに gamma-Taxilin の発現を抑制した THP-1 細胞由来マクロファージを 1 µg/ml の LPS で刺激し、培養上清を回収し、ELISA にて培地中のサイトカインレベルを測定した。さらに、細胞から mRNA を抽出し、real time PCR 法を用いて細胞内 mRNA 量を測定した。

### 4. 研究成果

(1) Taxilin ファミリーの発現確認

本研究を遂行するにあたり、どの Taxilin ファミリーが発現しているのかを Western blotting にて観察した。分化前の THP-1 細胞及び RAW264 細胞で Taxilin ファミリーのうち、alpha-Taxilin と gamma-Taxilin が発現していることが確認出来た。

(2) マクロファージ分化過程における Taxilin の動態解析

THP-1 細胞は PMA を処置することでマクロファージ細胞へと分化することが報告されている。そこで、未分化、分化 1 日目、2 日目、3 日目の THP-1 細胞から mRNA を抽出し real time PCR を実施し、分化過程における Taxilin ファミリーの挙動を解析した。マクロファージ細胞の分化マーカーである CD11b と CD14 の mRNA 量は、経時的に上昇することが観察された。一方、alpha-Taxilin と gamma-Taxilin の mRNA は経時的に減少する様子が観察された。

続いて、Western blotting にてタンパク量を観察したところ、mRNA 量と相関して alpha-Taxilin と gamma-Taxilin の発現量は経時的に減少することが判明した。

これらの結果から Taxilin は単球からマクロファージへの分化過程で転写レベルの調節により発現量が減少することが示唆された。

(3) THP-1 分化過程における Taxilin の機

## 能解析

Taxilin の発現量が分化に応じて減少することから、Taxilin の発現量を増減させることで分化過程に影響が出る可能性を考え、Reverse Transfection 法により Taxilin の発現を抑制した THP-1 細胞を 100 nM PMA で所定の時間処置し、mRNA を抽出後 real time PCR にて mRNA 量を測定した。alpha-Taxilin ならびに gamma-Taxilin を発現抑制しても、分化マーカーである CD11b や CD14 の mRNA 発現量に影響を与えることはなく、control 細胞と同程度の分化が生じていることが確認された。これらの実験結果から、Taxilin を発現抑制しても単球からマクロファージへの分化過程は影響を受けないことが判明した。一方、Taxilin を過剰発現させた THP-1 細胞での分化過程の検討を試みたが、THP-1 細胞に高効率に遺伝子の導入が出来ず、Taxilin の過剰発現時に分化に影響が出るかは、今後の研究課題となっている。

### (4) マクロファージ細胞を LPS 刺激した際の Taxilin の動態解析

マクロファージ細胞は toll like receptor 4 アゴニストである LPS により炎症性メディエーターを産生することが報告されている。そこで、マクロファージ分化後の THP-1 細胞を LPS で刺激し、Taxilin の動態解析を実施した。LPS 刺激により炎症性メディエーターである Tumor necrosis factor-alpha、Interleukin 1 beta や Interleukin 6 の mRNA 量が上昇することが確認された。また、Taxilin ファミリーの中でも gamma-Taxilin の mRNA 量が LPS 刺激により上昇することも確認された。更に、RAW264 細胞においても LPS 刺激を行うことで gamma-Taxilin の mRNA 量とタンパク量の上昇が確認された。これらの実験結果から、gamma-Taxilin はマクロファージ細胞において炎症性反応に関与している可能性が高まった。

### (5) Taxilin 発現抑制細胞における LPS 誘発炎症性メディエーター産生量の検討

LPS 刺激により gamma-Taxilin 量が上昇することから、gamma-Taxilin 発現抑制細胞における炎症性メディエーター産生量を測定した。gamma-Taxilin を発現抑制した THP-1 細胞由来マクロファージでは LPS 刺激による炎症性メディエーターの mRNA 量が減弱し、同時に培地中に分泌される量も減弱している様子が確認出来た。

### (6) Yeast Two Hybrid 法による Taxilin 結合分子の同定

Taxilin は蛋白-蛋白結合に関わる coiled-coil 領域を持つ分子群として知られており、これまでに幾つかの alpha-Taxilin 結合分子群を見出している。しかし、炎症性細胞間ネットワークに関する結合分子は見出

されていないため、新規 Taxilin 結合分子同定を試み、複数の新規 gamma-Taxilin 結合分子を見出した。今回同定した Taxilin ファミリー結合蛋白質には炎症性メディエーターの産生・分泌に直接関わるとされる分子は含まれていなかったが、細胞増殖・細胞分化に関与する分子が含まれていたことから、Taxilin ファミリーの機能解明に向けた新たな展望が開けた。

## 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 4 件)

(1) Sakane H, Makiyama T, Nogami S, Horii Y, Akasaki K, Shirataki H.  $\beta$ -Taxilin participates in the differentiation of C2C12 myoblast into myotubes. *Exp Cell Res.* 2016 Jul 15;345(2):230-238.

(2) Xu B S\*, Makiyama T\*, Sakane H, Horii Y, Hiraishi H, Shirataki H. TSG101, a tumor susceptibility gene, bidirectionally modulates cell invasion through regulating MMP-9 mRNA expression. *BMC Cancer.* 2015 Nov 25;15:933. \* Contributed equally

(3) Makiyama T, Nakamura H, Nagasaka N, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A, Murayama T. Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long-term stability and no cytotoxicity into the Golgi. *Traffic.* 2015 May; 16(5):476-492.

(4) Nakamura H, Wakita S, Yasufuku K, Makiyama T, Waraya M, Hashimoto N, Murayama T. Sphingomyelin regulates the activity of secretory phospholipase A2 in the plasma membrane. *J Cell Biochem.* 2015 Sep;116(9):1898-1907.

[学会発表](計 3 件)

(1) 坂根洋、牧山智彦、野上識、堀井幸美、赤崎健司、白瀧博通、C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化における  $\beta$ -Taxilin の機能解析、第 137 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 26 日、東北大学 (宮城県、仙台市)

(2) 牧山智彦、賽序斌、坂根洋、堀井幸美、平石秀幸、白瀧博通、TSG101 による MMP-9 mRNA の発現調節を介したがん細胞浸潤制御、

第 89 回日本生化学学会、2016 年 9 月 25 日、  
東北大学 (宮城県, 仙台市)

(3) 坂根洋、牧山智彦、野上識、堀井幸美、  
赤崎健司、白瀧博通、C2C12 筋芽細胞の筋管  
細胞への分化における beta-Taxilin の機能  
解析、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88  
回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12  
月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県, 神  
戸市)

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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/mol-ce  
ll-bio/](http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/mol-ce<br/>ll-bio/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧山 智彦 (TOMOHIKO MAKIYAMA)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：60733102

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：