

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590287

研究課題名(和文) DjA2 KOマウスの示す酸性オルガネラ内腔 pH 調節異常の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of abnormal pH-homeostasis in the lumen of acidic organelle from DjA2 knock out mice

研究代表者

寺田 和豊 (TERADA KAZUTOYO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：00253724

研究成果の概要(和文)：分子シャペロン DjA2 のノックアウトマウスは、出生直後に致死的な呼吸不全に陥る。これは不十分な肺胞拡張が原因であり、DjA2KO マウスの 2 型肺胞細胞でリソソーム系酸性オルガネラ内腔の酸性度異常を見出した。この酸性化 pH 恒常性維持の分子的機構を明らかにするため、レシオメトリー法による生理学的解析、DjA2 による分子間相互作用機構の解析、肺組織におけるプロテオミクス解析等を行った。

研究成果の概要(英文)：The DjA2 knockout mice showed lethal respiratory failure after birth. This was caused by insufficient alveolar expansion and the type 2 pneumocytes from the knockout mice had abnormal acidity in the lumen of lysosomal acidic organelle. To elucidate the molecular mechanism of maintaining homeostasis in the acidic organelle, I analyzed the pneumocytes by a physiological approach using ratiometry, the DjA2 by a molecular interaction study using Biacore, and the lung tissue by a proteomics approach.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：分子シャペロン、HSP40、ノックアウトマウス、酸性、pH

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表者は、サイトゾルの分子シャペロン HSP70 を制御する HSP40 メンバーのノックアウトマウスを複数作成し (EMBO J 2005; JB 2006)、個々の HSP40 メンバーは異なった働きを個体レベルでもつことを明らかにしてきた。3

番目に作成した DjA2 ノックアウトマウス (C57B1/6 と DBA の混在した遺伝的背景) は、出生直後の肺胞拡張が不十分で呼吸不全に陥り半数が死亡した。生き残ったマウスも軽微な肺タンパク症を示し、巨大化し、泡沫化した肺胞マクロファージを多数認めた。

(2) 肺組織および気管肺胞洗浄液中におけるサーファクタントタンパク質の発現を調べた結果、成熟体分子量のS P-Cタンパク質が顕著に低下していることを見出した。また、パルス-チェイス実験から、プロセッシング異常を認めた。

(3) S P-Cタンパク質のプロセッシングは、2型肺胞細胞のリソソーム系の分泌小胞で酸性度が高いラメラボディーで完成することが知られている。また泡沫化した肺胞マクロファージでもリソソームの異常が考えられ、ノックアウトマウスではリソソーム系酸性オルガネラにおける内腔酸性度の異常が疑われた。そこでレシオメトリー法によって肺胞細胞を調べた結果、ノックアウトマウスで内腔酸性度がコントロールマウスに対して十分でないことを見出した。

(4) 酸性オルガネラ内腔の pH 恒常性を保つ因子を探るため、各種阻害剤による内腔 pH の変動を調べた。まずH⁺流入機構を構成する液胞型ATPaseの阻害剤、バフィロマイシンを作用させた。しかしながら30分間～1時間程度で、内腔pHに大きな変化は観察されなかった。これに対して、H⁺流出機構を構成すると考えられるNa⁺/H⁺交換体のアミロリド系阻害剤は30分間以内の作用で、pH=4.0程度まで酸性度が強くなった。アミロリド系阻害剤の添加はノックアウトマウス2型肺胞細胞の内腔pHも4.0まで進行させた。したがってH⁺流出機構の破綻がDjA2のノックアウトによってもたらされている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 分子シャペロンDjA2のノックアウトマウスは肺で異常を示した。このときリソソーム系酸性オルガネラ内腔pHの上昇と、その酸性度がH⁺流出機構によって保たれている可能性を2型肺胞細胞や肺胞マクロファージで見出した。この知見からリソソーム系酸性オルガネラにおけるpH恒常性維持機構の解明を目指す。

(2) いくつかの既知のNa⁺/H⁺交換体メンバーとDjA2との相互作用を、酵母two-hybrid法により検出する。ポジティブな結果が得られたNa⁺/H⁺交換体については抗体の作成を行い、免疫共沈法等によってDjA2との相互作用を確認する。

(3) DjA2が認識するNa⁺/H⁺交換体の領域を酵母two-hybrid法やペプチドアレイ等を用いて特定する。Na⁺/H⁺交換体に存在するリソソーム系酸性オルガ

ネラへの局在シグナルについて知見を得るため、変異体等を作成し検討を進める。前項で得られた抗体を用いてリソソーム膜に存在するNa⁺/H⁺交換体の動態を明らかにする。

(4) 免疫共沈法を用いてDjA2以外にも必要な分子シャペロンやサイトゾル中に存在する因子の検索・同定を進める。以上の実験を通じてH⁺流出機構の破綻とDjA2との関連を分子レベルで解明する。

(5) サイトゾルに存在する分子シャペロン系とリソソーム膜上に存在するNa⁺/H⁺交換体との相互作用が内腔pHへ及ぼす影響を評価する上で、単離リソソーム実験系の開発はぜひとも必要である。開発に成功すれば、単離リソソームにサイトゾル画分を加えたり、精製した各種分子シャペロンを添加した再構成系を用いて、DjA2の必要十分性を確認する。

3. 研究の方法

(1) 酸性オルガネラ内腔pHの測定は、pH感受性蛍光色素を各種細胞に取込ませ、レシオメトリー法によって測定した。サイトゾルpHの変動は、BCECFを用いたレシオメトリー法で測定した。

(2) 分子間相互作用の解析は、モデル変性基質を固定化したセンサーチップを直前に変性剤を用いてunfoldさせた後、各種の精製シャペロンタンパク質を作用させ、Biacore装置によって検出した。結合様式の解析は付属のBiaevaluationソフトウェアで行った。

(3) DNAマイクロアレイ解析は、全遺伝子型DNAチップ(mouse oligochip 24k)と肺組織より抽出した全RNA(ノックアウトとコントロール)を2色法で解析した。

(4) 免疫共沈実験で得られた複合体は、SDS-PAGEによる分離後、westernもしくはDeep Purple染色を行い、該当するバンドを切出し、トリプシン分解を行った。ペプチド断片はLC-MSによって配列決定し、Mascot Search法によりタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 酸性オルガネラ内腔pHを調節するNa⁺/H⁺交換体とDjA2の作用が普遍的であるのか検証するため、チオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージで内腔pHの測定を行った。その結果、KOとコントロ

ールマウスより調製した腹腔マクロファージの内腔 pH はほとんど変わらず、 Na^+/H^+ -交換体と DjA2 による pH 恒常性機構は、呼吸器系細胞に限定されることが明らかとなった。

(2) 各種樹立培養細胞株の内腔 pH は、細胞株によって pH = 4.2 ~ 5.4 程度と異なっていた。しかしながらアミロリド系阻害剤の添加で、どの細胞の内腔 pH も pH = 4.0 まで低下させることができた。したがってノックアウトマウスの肺胞細胞で既知の液胞型 $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ による正の酸性化機構は正常に保たれているが、 H^+ -流出機構による制御が破綻しているものと強く示唆された。

(3) アミロリド系阻害剤による内腔 pH の低下を灌流実験によって検討した。その結果、添加から 10-20 秒程度で低下する速い反応であった。このとき酸性オルガネラの大きさも見かけ上変わらなかった。また阻害剤がプラズマ膜上の Na^+/H^+ -交換体等に作用してサイトソルの pH を低下させ、間接的に酸性オルガネラの内腔 pH を低下させる可能性もあった。しかしながら、BCECF を用いたレシオメトリー法でサイトソル pH の変動は観察されなかった。

(4) いくつかの既知の Na^+/H^+ -交換体メンバーと DjA2 との相互作用を、酵母 two-hybrid 法によって検討した。一般に Na^+/H^+ -交換体メンバーの C 末端領域はサイトソル側に露出しており、交換体の活性制御に関与するものと考えられている。実際に 1 つの交換体メンバーの C 末端領域と DjA2 との相互作用が検出された。この相互作用は特異的なようで、DjA1 や DjA4 では代替できなかった。この Na^+/H^+ -交換体の C 末端領域を抗原としてペプチド抗体を作成したが、力価不十分であった。さらにこの領域の組換え体の発現を試みたが不溶性であり、抗体作製に至らなかった。

(5) DjA2 をはじめとする 1 型 Hsp40/DnaJ メンバーと unfolded させたモデル基質との分子間相互作用解析を行った。その結果、Hsp40/DnaJ メンバーは 2 量体として unfolded したタンパク質に結合し、解離定数 (K_{D1}) は 10^{-7} M 程度と、それほど強い親和性を示さないことを見出した (JBC)。この成果から DjA2 が直接認識する因子 (酸性オルガネラ膜上の H^+ -流出装置と予想される) との免疫共沈実験を行う上での指針を得た。

(6) 新生仔の肺組織で免疫共沈実験を行った。

可溶化の際には 2 価性架橋剤を加え、DjA2 と標的因子との複合体を安定化させた。複合体をゲルから抽出し、プロテオーム解析を行ったところ、nucleolin や Zn-finger タンパク質、アダプチン等が同定された。

(7) 新生仔および 3 ヶ月齢の肺組織より全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。顕著な量的変化を示す遺伝子が存在したものの、リソソーム系酸性オルガネラ内腔の pH 恒常性に関与すると考えられる遺伝子群に大きな変化はみられなかった。

(8) DjA2 のノックアウトマウスは、C57B1/6 と DBA の混在した遺伝的背景をもつ (マウス作成に使用した ES 細胞の遺伝的背景)。このため出生時にみられた致死性の浸透度は 100% でないと考えられた。そこで C57B1/6 に 13 代戻し交配し、コンジュニック系統を樹立した。その結果、コンジュニックな DjA2 KO マウスは出生時に全て致死となり、C57B1/6 マウスにおいて DjA2 は必須遺伝子であることが明らかとなった

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 Terada K., Oike, Y. Multiple molecules of Hsc70 and a dimer of DjA1 independently bind to an unfolded protein. *J. Biol. Chem.* 査読有、285 巻、2010、16789-16797
- ② 寺田和豊, Hsp70., キーワード: 蛋白質の一生、蛋白質核酸酵素、査読無、53 巻、2008、1060-1061
- ③ 寺田和豊, DnaJ 蛋白質., キーワード: 蛋白質の一生、蛋白質核酸酵素、査読無、53 巻、2008、1040-1041
- ④ 寺田和豊, Bag1., キーワード: 蛋白質の一生、蛋白質核酸酵素、査読無、53 巻、2008、1029-1029

[学会発表] (計 5 件)

- ① 寺田和豊 「Hsc70 と DjA1 による基質タンパク質の認識機構」第 33 回日本分子生物学会年会 / 第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 9 日、神戸市、神戸ポートアイランド
- ② Terada K. An initial step of substrate recognition by Hsc70 and DjA1. The 3rd International Symposium on Protein Community 2010 年 9 月 14 日、奈良市、ホテル日航奈良

③Terada K. An initial step of denatured protein recognition by Hsc70 and DjA1. CSHS "Molecular chaperones and Stress Responses" 2010年5月7日、Cold Spring Harbor, 米国、Cold Spring Harbor Laboratory

④寺田和豊「Hsc70 シャペロン系と変性タンパク質の分子間相互作用解析」第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸市、神戸ポートアイランド

⑤Terada K. The DnaJ-targeted mice and the refolding reaction by Hsc70-DnaJ homolog-NEF systems. 4th International Congress on "Stress Responses in Biology and Medicine" 2009年10月7日、札幌市、ホテルシャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 和豊 (TERADA KAZUTOYO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：00253724

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：