

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770105
 研究課題名（和文） 分泌小胞に依存しないカルシウム結合性タンパク質複合体の細胞外遊離機構の解明
 研究課題名（英文） Stress-induced non-vesicular extracellular release of complex of Ca²⁺-binding proteins
 研究代表者
 松永 隼人（MATSUNAGA HAYATO）
 崇城大学・生物生命学部・助教
 研究者番号：20437833

研究成果の概要（和文）：核タンパク質プロサイモシン α (ProT α)は、シグナルペプチド配列を有しておらず、虚血性ストレスにより神経・アストロサイトより細胞外遊離される。ProT α は、ネクロシス保護機構を介した神経保護機能を有する。虚血性ストレスによる ProT α の細胞外遊離は、ATP 減少による核移行後の非小胞性の細胞外遊離機構であることを明らかとした。また、細胞外共遊離分子として、Ca²⁺結合性タンパク質 S100A13 を同定した。両者の相互作用は Ca²⁺依存性であり、いずれの分子も C 末端領域が結合必須領域であった。ProT α の C 末端は核移行シグナルを有し、アポトーシスによって活性化されるカスパーゼ-3によって切断される。この時、細胞外遊離は起こらない。これらのことは、ネクロシスによって誘発される ProT α の細胞外遊離機構は非小胞性機構であり、一方、アポトーシスストレス時には、細胞外遊離担体分子である S100A13 との相互作用能を失う為、細胞外遊離能を失うことを意味している。

研究成果の概要（英文）：The nuclear protein prothymosin- α (ProT α), which lacks a signal peptide sequence, is release from neurons and astrocytes on ischemic stress and exerts a unique form of neuroprotection through an anti-necrotic mechanism. Ischemic stress-induced ProT α release is initiated by a nuclear release due to ATP loss, followed by extracellular release in a non-vesicular manner. S100A13, a Ca²⁺-binding protein, was identified to be a major protein co-released with ProT α . The Ca²⁺-dependent interaction between ProT α and S100A13 was found to require the C-terminal peptide sequences of both proteins. Under apoptotic condition, ProT α was cleaved by casase-3 to generate a C-terminal peptide-deficient fragment, which lacks the nuclear localization signal. However, there was no extracellular release of ProT α . These results suggest that necrosis-inducing stress induces an extracellular release of ProT α in a non-vesicular maner, whereas apoptosis-inducing stress does not, owing to the loss of its interaction with S100A13, a cargo molecule for extracellular release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

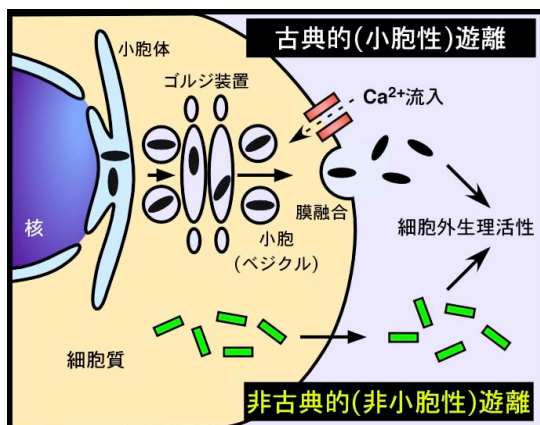
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の遊離の多くは、分泌小胞がカルシウムイオン (Ca^{2+}) 依存的に細胞膜融合するエクソサイトーシスによって細胞外へと輸送される。この機構には翻訳されたタンパク質がシグナルペプチドを有することを必要とする。シグナルペプチドを有するタンパク質は‘小胞体-ゴルジ装置’を介して小胞内へと移行し、細胞外へと輸送される。このメンブレントラフィックを介した遊離機構は古典的遊離機構と呼ばれる。しかしながら、いくつかの細胞外に存在するタンパク質はシグナルペプチドを有していない。このことは分泌小胞非依存的に遊離されていることを意味し、非古典的遊離機構または非小胞性遊離機構と呼ばれている（下図参照）。



古典的遊離機構と非古典的遊離機構によるタンパク質遊離

脳・神経系において多様な細胞外活性が知られている酸性線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) に着目してきた。FGF-1 は生理活性の情報に対して、その遊離機構はほとんど理解されていない。しかも、FGF-1 はシグナルペプチドを有さないことから、この遊離は非小胞性遊離機構によると考えられてきた。興味深いことは、FGF-1 が細胞ストレスに反応して遊離することである。FGF-1 がその細胞外作用として神経保護・血管新生・神経新生を有することから、脳虚血などの脳障害ストレスから「脳を守る」為に非小胞性遊離機構が活性化されるという仮説が浮かぶ。これまで「FGF-1 のストレス誘発性非小胞性遊離分子機構解明」を目的として行い、細胞外輸送担体 S100A13 を同定し、 Ca^{2+} 依存的な S100A13-FGF-1 間相互作用が遊離必須イベントであることを明らかとした。

申請者らは、新規神経細胞保護分子として酸性核タンパク質: プロサイモシン α (ProTa) が細胞外に遊離し、細胞外活性として神経細胞

のネクロシスを制御可能なアポトーシスに変換する（細胞死モードスイッチ機構）ことを報告した。興味深いことに ProTa もシグナルペプチドを有しておらず、新規の非小胞性遊離分子であることが推測され、ProTa の遊離機構解明を中心とした本研究構想に至った。

2. 研究の目的

脳を守るストレス誘発性非小胞性遊離分子 FGF-1 と ProTa の細胞外遊離に共通な分子機構を明らかにすることを目的とした。

(1) 細胞外輸送担体分子 S100A13 を基にした機能プロテオミクスを行い遊離の分子機構の全貌を明らかにする。

(2) 細胞レベルで時空間的な遊離制御分子のイメージングを行い、細胞ストレスに対する非小胞性遊離機構制御分子の機能応答を検証する。

(3) ストレス誘発性非小胞性機構を検証・解明していくと共に、より高次な遊離制御機構のモデル構築とその検証を行う。

2. 研究の方法

本研究「ストレス誘発性非小胞性遊離機構の解明」は、遊離の主経路であるタンパク質間相互作用を機能プロテオミクスとバイオイメージングを駆使したストラテジーで解明を行った。

(1) ProTa 遊離機構担体分子の新規同定
細胞外 ProTa と共遊離する分子を抗 ProTa 抗体による免疫沈降法を用い探索し、質量分析装置にて同定した。

(2) S100A13 依存的遊離機構調節分子探索
FGF-1 の細胞外遊離担体分子 S100A13 と相互作用する分子を文献情報、並びにバイオインフォマティクスの手法を用いて探索した。

(3) 遊離機構ダイナミズムの解析
S100A13 と S100A13 結合分子群の相互作用をバイオセンサー: QCM、並びに BIACORE にて動力学的に解析した。特に、相互作用における Ca^{2+} 依存性と相互作用必須領域の特定を行った。

(4) 自己組織化マップ解析
多次元データを自己組織化させ、視覚情報として抽出する自己組織化マップ (SOM: Self-Organization Map)解析を行い、ProTαの細胞外遊離と機能の脳神経系における位置づけを行った。

(5) 遊離機構パスウェイシミュレーション
細胞内外で自己保護能を有する ProTαの多機能性発動をシミュレーションソフト: Cell Illustrator を用いてモデル構築を行い、実験研究との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) ProTα遊離担体分子の同定

細胞外 ProTαと共遊離する分子として、Ca²⁺結合性タンパク質 S100A13 を同定した。S100A13 は、FGF-1 の非小胞性遊離において細胞外遊離単体分子として機能する。よって、ProTαの細胞外遊離機構においても同様の機能を担うと推測し、以下の(2)と(3)の解析を行った。

(2) 遊離機構調節分子探索と相互作用解析
S100A13 と ProTαの相互作用をバイオセンサー-QCM にて動力学的に解析したところ、両者の結合がCa²⁺濃度依存的事であることを見出した。さらに、ProTα、並びにS100A13の部分欠変異体を用いて、両者の相互作用必須領域がC末端であることを決定した。

細胞外遊離単体分子 S100A13 と相互作用する候補分子である Ca²⁺センサー分子 p40 Synaptotagmin-1 (Syt-1)と膜ダイナミクス制御分子 Annexin A2 (ANX2)を非小胞性遊離制御分子として推定した。バイオセンサー BIACORE を用いて、S100A13 との相互作用について解析した。S100A13 と p40 Syt-1 の相互作用は Ca²⁺濃度依存的事であった。一方、S100A13 と ANX2 の相互作用は、Ca²⁺非存在下においても確認できたが、Ca²⁺存在下において相互作用が増強される傾向が観察されている。本結果は、Ca²⁺制御機構が本遊離機構で重要な位置を占めることを意味しており、FGF-1 遊離機構解析で既に明らかとした細胞ストレス誘発性の電位依存性 Ca²⁺チャネル開口とそれに伴う小胞体からの CICIR (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release)機構が、遊離制御複合体形成に関与することが予想される。また、ANX2 の S100A13 に対する結合が確認されたことから、非小胞性遊離において重要な課題である細胞膜通過機構解明の手懸かりとなることが期待される。

(3) ProTαの細胞外遊離機構解明

ProTαのストレス誘発性非古典的遊離
初代培養大脳皮質神経細胞、並びにアストロサイトにおいて核タンパク質 ProTαが血清除去ストレスにより細胞外遊離することを明らかとした。また、本遊離は小胞輸送特異的阻害薬であるプレフェルジン A 非感受性であったことから、非小胞性遊離であることが示された。本結果は、脳アストロサイト由来 C6 グリオーマ細胞でも同様であった。

ProTαの核輸送機構

ProTαは、核移行シグナルを C 末端領域に有しており、核輸送分子 Importin-αによって認識され核移行されることを確認した。血清除去ストレス時における核から細胞質への移行は、ATP 減少による核移行能の減少による細胞質への受動拡散であることを明らかとした。

S100A13 依存的細胞外遊離

ProTαは、S100A13 と細胞外に共遊離する。細胞ストレスによる両者の遊離は、S100A13 結合性遊離阻害薬 Amlexanox によって阻害された。また、S100A13 の ProTα結合必須領域 (88-98 番目アミノ酸領域)を欠損した変異体 S100A13 Δ88-98 を C6 グリオーマ細胞に発現させると ProTαの細胞外遊離は阻害され、Δ88-98 変異体は Dominant Negative 体として機能することを明らかとした。ProTα と S100A13 の相互作用を ProTα-EGFP と DsRed2-S100A13 を発現させた生細胞内において、FRET 法にて確認した。両者の相互作用は、血清除去ストレス 90 分後から顕著に起こることを確認し、EGTA や BAPTA-AM といった Ca²⁺キレート剤により阻害されることを見出した。

アポトーシスによる ProTαの細胞外遊離能の消失

アポトーシスを誘発する薬剤処理では、ProTαの細胞外遊離は観察されなかった。しかしながら、正常時 ProTαは核内に局在するが、アポトーシスストレスにより細胞質にも存在するように分布変化が起こった。これは、ProTαがアポトーシスにより活性化されるカスパーゼ-3によりC末端部の核移行シグナルが切断される為である。本研究においては、rat ProTαのカスパーゼ-3切断配列の特定に成功した。さらに、切断型 ProTαが細胞外遊離単体分子 S100A13 との相互作用能を失う為、アポトーシス時に細胞外遊離が起こらないことを証明した。

以上より、S100A13 依存的非小胞性遊離機構は、事項の図の様に推定される。今後、遊離複合体の動態や細胞膜通過機構の詳細について解析を行う必要を有する。

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3件)

- ① Matsunaga, H., Ueda, H. Synergistic Ca^{2+} and Cu^{2+} requirements of the FGF1-S100A13 interaction measured by quartz crystal microbalance: An initial step in amlexanox-reversible non-classical release of FGF-1. *Neurochemistry International*. 査読有, 52, 2008, pp. 1076-1085.
- ② Ueda, H., Matsunaga, H., Uchida, H., Ueda, M. Prothymosin alpha as robustness molecules against ischemic stress to brain and retina. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 査読有, 2010, in press.
- ③ Matsunaga, H., Ueda, H. Stress-induced non-vesicular release of prothymosin- α initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. *Cell Death and Differentiation*. 査読有, 2010, in press.

[学会発表] (計1件)

- ① 松永隼人、植田弘師、ストレス性精神疾患とナノメディシン、「統合脳」冬のシンポジウム 第5領域「病態脳」班会議、2009年12月19日、学術総合センター(東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sojo-u.ac.jp/sitemanage/contents/attach/40/2008267.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA HAYATO)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：20437833

(2) 研究分担者

該当研究者無し

(3) 連携研究者

植田 弘師 (UEDA HIROSHI)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00145674