

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590215

研究課題名（和文） 細胞容積調節蛋白質 ABCF2 の細胞死誘導における役割の解明

研究課題名（英文） Investigation of the role of ABCF2, a regulator of cell volume, in induction of apoptosis.

研究代表者

赤塚 結子（鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授）

研究者番号：90321611

研究成果の概要（和文）：

本研究によって、低浸透圧刺激後の ABCF2 の細胞膜集積に必要な領域は 591 番目から 616 番目のアミノ酸であることがわかった。

一方、過酸化酸素やスタウロsporinを用いたアポトーシス刺激下では、ACTN4 は細胞膜に集積するのに対して ABCF2 は集積しないことがわかった。また、591 番目から 616 番目のアミノ酸を欠失した ABCF2 は、アポトーシス刺激下でも細胞膜に集積せず、細胞容積の減少も野生型 ABCF2 と同様に抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

I found that the COOH-terminal region (amino acid 591- 616) of ABCF2 is necessary for its accumulation in the 100,000×g pellet after hypotonic stimulation.

On the other hand, I found that the content of ACTN4 accumulated in the 100,000×g pellet significantly increased, while the content of ABCF2 did not change, after the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or staurosporine. My results showed that this region was not necessary to regulate the behavior of ABCF2 after the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or staurosporine. The single-cell size measurements also revealed that AVD was not seen in cells expressing ABCF2 deletion mutant lacking this region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
平成 23 年度	700,000	210,000	910,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学

## 1. 研究開始当初の背景

硬い細胞壁を持たない動物細胞は、細胞内外の環境における浸透圧変化に常に曝され自らの容積を容易に変化させるが、それを元に戻す能力を備えている。低浸透圧暴露を受けて膨らんだ細胞容積が等浸透圧下の正常容積に戻る過程は、調節性容積減少

(Regulatory volume decrease: **RVD**)と呼ばれ、数種類のチャンネルと細胞内情報伝達系が活性化された後、 $K^+$ と $Cl^-$ チャンネルが開口し、 $KCl$ の流出によって生じた浸透圧変化によって細胞内の余分な水が細胞外に排出され達成される。特に $Cl^-$ の流出口は、低浸透圧刺激を受けて細胞の容積が増大した時に開口するチャンネルであることより**容積感受性外向整流性アニオンチャンネル**

(volume-sensitive outwardly rectifying:**VSOR**)と呼ばれているが、その分子は未だ同定されていない。これまで**VSOR**は細胞が低浸透圧刺激をうけてその容積が増加した時のみ活性化されるチャンネルであると考えられてきたが、近年、活性酸素(ROS)刺激を加えると等浸透圧下にある細胞において**VSOR**が活性化され細胞が縮むアポトーシス性細胞容積減少 (apoptotic cell decrease:**AVD**) が起きること、しかもこれはカスパーゼ群が活性化されるよりも早く起こる現象であること、さらに**VSOR**の阻害薬を用いて**AVD**を抑制すると細胞死を抑制できることがわかってきた (Okada et al., 2006. *J. Membr. Biol.* 209:21-29.)。

申請者はこの**VSOR**の分子同定を試みる過程で、**VSOR**の調節蛋白質としてATP-binding cassette(ABC)蛋白質スーパーファミリーに属する**ABCF2**を同定した。最近になって**ABCF2**は細胞死を抑制する作用があると報告されているが、申請者のこれまでの研究によって

**ABCF2**は**VSOR**を抑制的に調節する蛋白質であることがわかっているため、**ABCF2**の anti-apoptotic 作用はアポトーシス刺激で活性化された**VSOR**を抑制することによって起こる可能性が考えられた。そこで本研究では、**AVD**が起こる過程で**ABCF2**がどのような挙動を示し、**VSOR**の活性調節にどう関わるのかを明らかにすることによって、アポトーシス刺激後カスパーゼ活性化以前に起こるアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

動物細胞の容積は細胞外及び細胞内の浸透圧変化によって容易に変化するが、増大または減少したその体積を元に戻し常に一定に保とうとする、生命を維持する上で必要不可欠な能力が備わっている。細胞が低浸透圧刺激を受けて一旦膨張した状態から元の体積に戻る調節性容積減少(Regulatory volume decrease: **RVD**)の過程においては、細胞の容積上昇を感知して開口する $Cl^-$ チャンネルである容積感受性外向整流性アニオンチャンネル (volume-sensitive outwardly rectifying:**VSOR**) を介した $Cl^-$ の輸送が、細胞内の余分な水を排出させるために必須であることが電気生理学的に証明されている。このチャンネルはこれまで低浸透圧刺激を受けて細胞の容積が増加した時のみに開口すると考えられてきたが、近年、アポトーシス刺激を受けると等浸透圧下にある細胞においても**VSOR**が活性化され、細胞内からの水の流出がおこり、細胞が縮むアポトーシス性細胞容積減少 (apoptotic cell decrease: **AVD**) が起こることが明らかとなった。申請者は**VSOR**の抑制性の調節因子として**ABCF2**を同定しているが、最近では**ABCF2**にアポト

ーシスを抑制する能力があることが報告されている。

本研究は、AVD が起こる過程で ABCF2 がどのような挙動を示し VSOR の活性調節にどう関わるのかを明らかにすることによって、アポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ABCF2 は、細胞に低浸透圧刺激を与えると細胞質から細胞膜へ集積してくる一方で、 $H_2O_2$  刺激、及びスタウロスポリン刺激では細胞膜への集積が見られない。そこで、低浸透圧刺激後細胞膜へ移動するために必要な ABCF2 の領域を、ABCF2 の欠失変異体を用いてまず明らかにする。また、 $H_2O_2$  刺激、及びスタウロスポリン刺激後、細胞膜へ集まってくるようにさせる ABCF2 の変異が存在するかどうかを、ABCF2 の様々な変異体を用いて検討する。これらの責任領域が明らかになった上で、その領域を変異させた ABCF2 を発現させた HEK293T 細胞において、低浸透圧刺激後の RVD の過程とアポトーシス刺激後の AVD の過程がどのような影響を受けるかを、コールターカウンターを用いて検討する。また、ABCF2-アクチニン-4 相互作用が  $H_2O_2$  刺激、及びスタウロスポリン刺激によって変化するかどうか、低浸透圧刺激を加えた場合のように両者の結合が増えるのかどうかを、定量的な免疫沈降法で検討する。

### 4. 研究成果

細胞壁を持たない動物細胞の細胞容積は細胞内外の浸透圧変化に応じて容易に変化するが、動物細胞は、細胞内情報伝達系や各種のイオンチャネル・輸送体を駆使して、自らの容積を正常に戻す細胞容積調節能を備えている。低浸透圧刺激後の細胞容積調節に必須である容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) の抑制性調節蛋白質として同定された ABCF2 (細胞質型 ABC 蛋白質) は、

$\alpha$ -アクチニン-4 (ACTN4) と結合することによって VSOR の活性を調節することが分かっている。低浸透圧刺激から 30 分経過すると細胞の表面にブレブ膜が形成されるが、そのためには細胞骨格の再構築が必要であり、そのタイミングに一致して ACTN4 が細胞膜に集積してくる。一方、ABCF2 は低浸透圧刺激直後から細胞膜に集積してくるが、両者の結合能力は低浸透圧刺激直後に有意に高まることが分かっている。つまり、低浸透圧刺激直後はすでに細胞膜下に存在する ACTN4 との結合力が亢進することにより、またブレブ膜が形成される頃には新たに細胞膜へ集積する ACTN4 と結合することにより、ABCF2 は VSOR との相互作用を抑制され、その VSOR に対する抑制機能を発揮できずに低浸透圧後の細胞容積調節が進行すると考えられる。

本研究によって、低浸透圧刺激後の ABCF2 の細胞膜集積に必要な領域は 591 番目から 616 番目のアミノ酸であることがわかった。

一方、アポトーシス刺激後には細胞容積の膨張を伴わずに VSOR が活性化し、アポトーシス性細胞容積減少が起こることが報告されているが、本研究によって、過酸化酸素やスタウロスポリンを用いたアポトーシス刺激下では、ACTN4 は細胞膜に集積するのに対して ABCF2 は集積しないことがわかった。つまりアポトーシス刺激下では VSOR 活性がより出やすい状況であることが考えられた。また、591 番目から 616 番目のアミノ酸を欠失した ABCF2 は、アポトーシス刺激下でも細胞膜に集積せず、細胞容積の減少も野生型 ABCF2 と同様に抑制することがわかった。

### 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 1 件)  
Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Numata T, and Okada Y. (2012)

Involvements of the ABC protein ABCF2 and  $\alpha$ -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells.

J. Cell. Physiol. 227: 3498-3510

DOI:10.1002/jcp.24050 査読有

〔学会発表〕(計1件)

赤塚 結子、岡田 泰伸

Changes in the intracellular localization of ACTN4 and ABCF2 after apoptotic stimulation.

日本生理学会大会 2012年3月30日 松本

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤塚 結子 (Yuhko Ando-Akatsuka)

研究者番号: 90321611

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: