

## 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24年 4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657036

研究課題名（和文）：細胞核間シャトル蛋白質群の同定と分類  
-リガンド作用機構のパラダイムシフト-研究課題名（英文）：Identification and classification of shuttle protein  
in and out of nuclei

研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA HAYATO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・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- $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) は、ネクロシスとアポトーシスを阻害する多機能性を有する内因性分子である。我々は、ProT $\alpha$  が虚血性ストレスに応じて非小胞性に神経細胞とアストロサイトから遊離し、ネクロシスを抑制する保護分子であることを明らかとしてきた。最近、遊離した ProT $\alpha$  が再度核内に移行する事象を見出した。本研究では、細胞外遊離から核内再移行過程における ProT $\alpha$  結合タンパク質群を網羅的に同定し、タンパク質間相互作用解析を行った。最終的に、細胞外遊離に関与するタンパク質群と核内における結合タンパク質群、新規の細胞膜受容体を新規に同定することに成功した。加えて、細胞外遊離過程を含めた ProT $\alpha$  の自己保護機構のシミュレーションを行い、実験研究と同様の結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

The nuclear protein prothymosin- $\alpha$  (ProT $\alpha$ ), which possesses multi-function is an intrinsic inhibitor of necrosis and apoptosis. We have already revealed that ProT $\alpha$  is released from neurons and astrocytes on ischemic stress through non-vesicular manner and exerts a unique form of neuroprotection through an anti-necrotic mechanism. Previously, we found out that released ProT $\alpha$  once again makes the transition to the nucleus in some cells. In this study, we comprehensively identified the ProT $\alpha$ -binding proteins in process of extracellular release and re-nuclear localization of ProT $\alpha$ , and performed protein-protein interaction analysis in *in vitro* and cell-based assay. Finally, we succeeded the identification of non-vesicular release involved proteins, ProT $\alpha$ -binding proteins in the nucleus and novel cell membrane receptor. In addition, we simulated variation of machineries involved in self-defensive role of ProT $\alpha$  by use of Cell Illustrator software, and obtained the similar result of experimental work.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：生物学

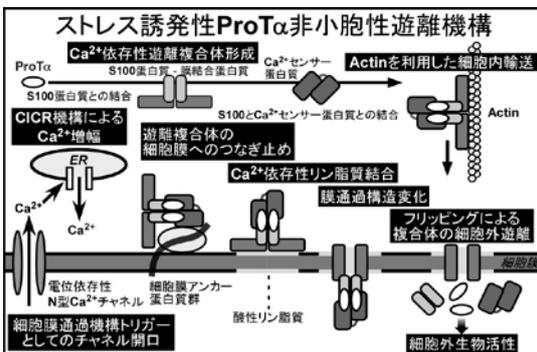
科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

### 1. 研究開始当初の背景

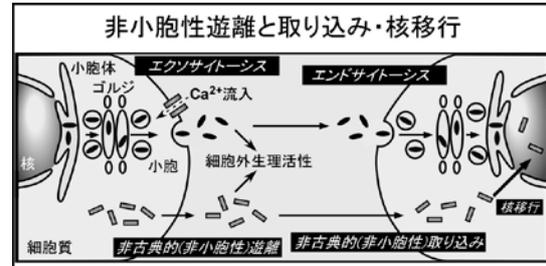
細胞においてタンパク質の存在場は、シグナル配列や分子間相互作用によって制御されており、細胞内情報伝達に応じて機能・局在が変化して細胞応答をみせる。申請者は、ストレス負荷時における細胞コミュニティの秩序維持機構の研究から細胞ストレスや細胞死に応じて細胞外に遊離するタンパク質群：DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns) に着目している。DAMPs は、自然免疫、炎症を含めた様々な病態に関与することが知られており、他の細胞外リガンドと同様にそのセンサー分子である細胞膜受容体を介した情報伝達機構が重要であることは周知の事実である。

申請者らは、脳神経系において、神経細胞のネクローシスからアポトーシスへの細胞死モードスイッチ機構、特にネクローシス抑制機構に関心を持ち、虚血性の培養神経細胞上清からネクローシス抑制タンパク質プロサイモシン $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) を発見した。既に著明な時空間的虚血保護機構を見出しており、ProT $\alpha$ が脳コミュニティを維持する責任分子であるという視点を得るに至った。さらにはProT $\alpha$ のストレス誘発性の非小胞性遊離機構の全容をほぼ明らかとしている(下図参照：投稿準備中)。ProT $\alpha$ はその遊離機構から、神経保護性の新規 DAMPs と言える。ProT $\alpha$ は種々の生物において高度に保存された核タンパク質であり、核、細胞質、細胞外と存在場において多様な活性を有している。重要な点は、細胞外 ProT $\alpha$ が細胞核内に再移行するという知見を得たことにある。申請者は、「特定の核タンパク質群は核間をシャトルし、細胞コミュニティを時空間的に制御する」との着想を得て本研究構想に至った。



本申請研究の着想を得るきっかけとなった脳神経系自己保護責任分子 ProT $\alpha$ の特徴として、分泌小胞を介さない非小胞性遊離機構による細胞外活性が挙げられる。興味深い点は、非小胞性遊離分子の多くが細胞膜受容体への作用機構とは異なるエンドサイトーシスを介さずに細胞内に取り込まれ機能する

という点にある(下図参照)。特に、核シャトルタンパク質の細胞外遊離と核内再取り込み機構を小胞性、非小胞性の両面から解明することは、その機構の獲得進化、生体膜を有する細胞の進化として捉え直すことができ、新たな研究分野の創造も期待される。



### 2. 研究の目的

本研究は、新規リガンド作用機構として「核タンパク質がストレス応答により細胞外に放出され、周囲の細胞核に伝播する」と想定し、「特定の核タンパク質群は核間をシャトルし、細胞コミュニティを時空間的に制御する」との仮説の検証と証明を行うことを目的とした。

(1) 細胞核間シャトルタンパク質の同定と相互作用分子群の同定を機能プロテオミクスにて行い、非小胞性遊離機構と細胞核内シャトル機構の全容を解明する。

(2) 核シャトルタンパク質の機能発現・制御機構の分子基盤を明らかとする。特に、分子間相互作用による機能制御機構をドメインレベルで解明する。

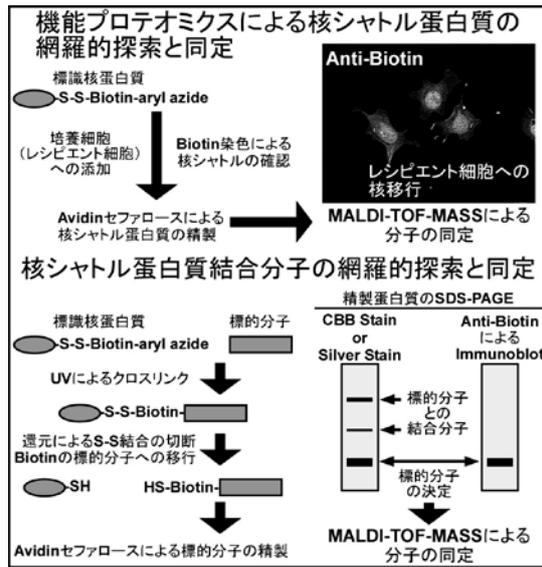
(3) システム生物学の手法により、核シャトルタンパク質の情報伝達機構のモデル化とシミュレーションを行う。特に、ProT $\alpha$ の非小胞性遊離機構についてシミュレーションし、実験研究の結果と比較を行う。

### 3. 研究の方法

本研究「細胞核間シャトル蛋白質群の同定と分類-リガンド作用機構のパラダイムシフト-」は、遊離の主径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) 細胞外 ProT $\alpha$ の再核移行過程における結合タンパク質群の同定  
機能プロテオミクスの手法を用いて、細胞膜、

細胞質、核内における結合タンパク質群を網羅的に同定した（下図方法参照）。

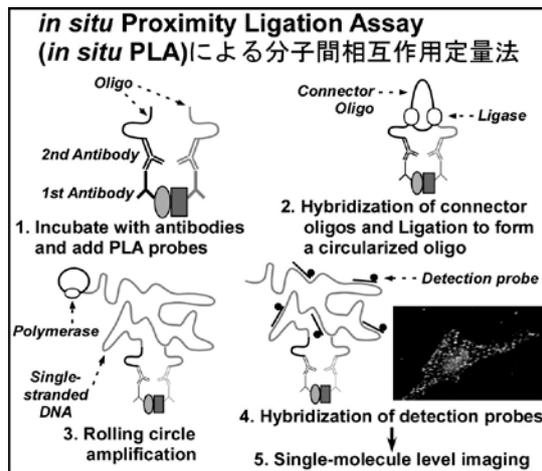


(2) ProTα候補細胞膜受容体と ProTα 相互作用解析

(1) 研究にて ProTα の細胞膜候補受容体-1 の同定に成功した。近年、報告された候補受容体-2 と共に相互作用解析をバイオセンサー：QCM、並びに BIACORE にて動力的に解析し、ProTα の結合ドメインを決定した。

(3) ProTα細胞外遊離担体分子 S100A13 結合タンパク質の新規同定と非小胞性遊離機構関与解明

StreptagII-S100A13 安定発現株化細胞を用いて、Ca<sup>2+</sup>依存的に結合する分子を同定した。in vitroにおけるタンパク質間相互作用解析と細胞レベルにおける相互作用をin situ PLAを用いて解析した（下図参照）。また、ProTαの非小胞性遊離機構の関与を解明した。



(4) ProTαの非小胞性遊離機構の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、実験研究との相関について検討した。

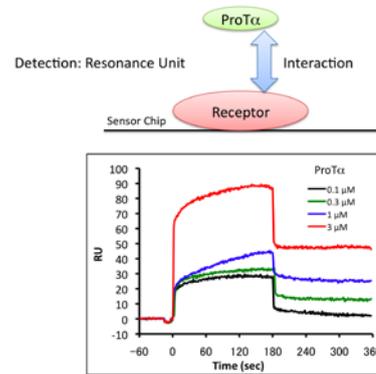
#### 4. 研究成果

(1) ProTαの核シャトル過程における結合タンパク質の網羅的同定  
細胞外 ProTαが核内にシャトルされるまでに形成されるタンパク質複合体群をMALDI-TOF-MSを用いて網羅的に同定した。細胞膜、細胞質、核内において数十個の分子を同定し、核内分子としては12種を同定した。興味深い点は、通常核内でProTαが結合しているヒストンにシャトル後再度結合するという点である。核に伝播した核シャトル蛋白質が、直接的な力の因子として核のプログラミングを行い、「細胞コミュニティをシンクロナイズさせる」という視点は、斬新性を有すると考える。今後、エビジェネティクス解析を含めて解析する予定である。加えて、細胞膜候補受容体-1を同定にも成功した。

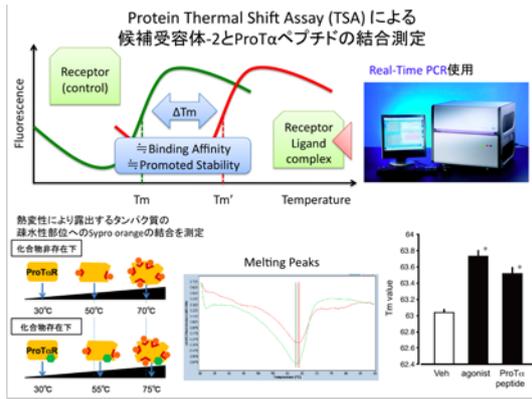
(2) ProTα候補細胞膜受容体と ProTα 相互作用解析

細胞膜候補受容体-1とProTαとの相互作用をBIACOREにて動力学解析を行った（下図参照）。現在、本受容体の下流シグナルの詳細とProTαの神経保護効果の解析を遂行中である。

ProTαと候補受容体-1のPPI(Protein-protein interaction)測定



近年、報告された候補受容体-2とProTαの相互作用をバイオセンサー：Quartz Crystal Microbalance (QCM)を用いて動力的に解析し、ProTαの結合ドメインの決定にも成功した。さらに、本結合ペプチドのみで、候補受容体-2に結合することをThermal Shift Assay (TSA)にて確認した（次項図参照）。本受容体についても、下流シグナルの詳細とProTαの神経保護効果の解析を遂行中である。



(3) ProTα細胞外遊離担体分子 S100A13 結合タンパク質の新規同定と非小胞性遊離機構関与解明

S100A13 と  $Ca^{2+}$  依存的に結合、または結合増加する分子を3つ同定することに成功した。既に、*in vitro*における動力学的解析、細胞レベルにおける相互作用解析は終了している。さらに、同定された分子と相互作用するタンパク質もProTαの非小胞性遊離機構に関与することを見出している(投稿準備中)。本研究にて核タンパク質ProTαのストレス誘発性細胞外遊離機構の全容解明に成功した。

(4) ProTαの非小胞性遊離機構のパスウェイシミュレーション

ProTαの細胞内外において自己保護能を發動する主要なロバストネス機構(下図参照)をシミュレーションすることを目的とした。

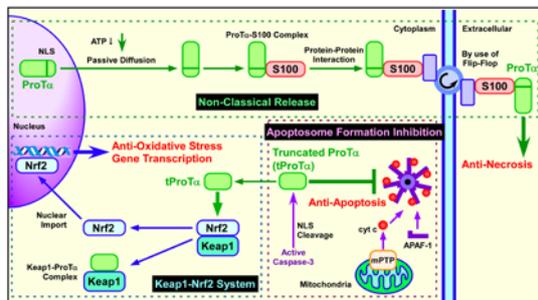


Figure 1. Representative self-defensive roles of ProTα. 1. Non-classical release of ProTα (against necrosis: Green dotted line). 2. Apoptosome formation inhibition (against apoptosis: Purple dotted line). 3. Keap1-Nrf2 system (against oxidative stress: Blue dotted line).

実験研究より、以下の事象が判明しており、既に報告している。① ProTαは、ネクロシス時には細胞外に遊離しネクロシス保護機構を駆動する。② アポトーシス時には、カスパーゼ-3により細胞外遊離に必須のS100A13結合領域が切断される為遊離は起こらない。細胞内に留まった切断型ProTαは、細胞質においてアポトソーム形成阻害の自己保護能を駆動する。③ 酸化ストレス時には、Keap1-Nrf2システムを駆動し、抗酸化ストレス遺伝子群の発現を誘導する。これらの機構について、ストレス種に応じたProTαシ

ステム駆動モデルを Cell Illustrator を用いて構築した(下図参照)。

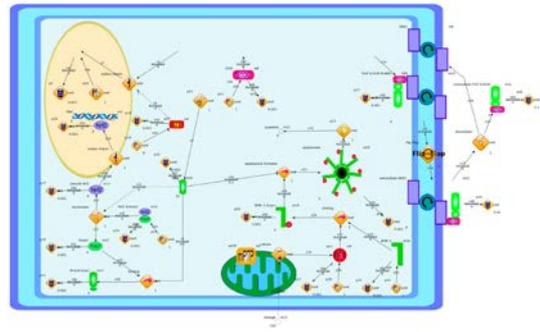


Figure 2. Construction of simulation pathways for representative self-defensive roles of ProTα. Simulation pathway is generated by use of Cell Illustrator software.

細胞内外のそれぞれの分子量変動について検討したところ、実験研究と同一の結果を得ることが出来た。ネクロシスストレスによるProTαの遊離は、S100A13との複合体形成を機に開始された(下図参照)。

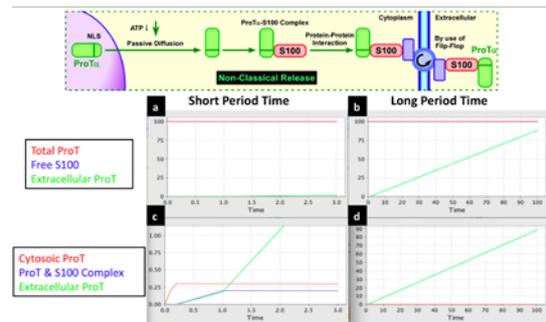


Figure 3. Simulation analysis of necrotic stress-induced non-classical release of ProTα. Localization and amount of ProTα under necrotic stress were simulated by Cell Illustrator software. (a and c) Variation of ProTα amount in a short period time (0-3 tp). (b and d) Variation of ProTα amount in a long period time (0-100 tp).

次に、アポトーシスストレス時におけるProTαの代表的自己保護機構: アポトソーム形成阻害とKeap1-Nrf2システム駆動についてシミュレーションした(下図参照)。上記の保護システムは、カスパーゼ-3により切断された切断型ProTα (tProTα)が使用され量が減少するのに応じて駆動された。

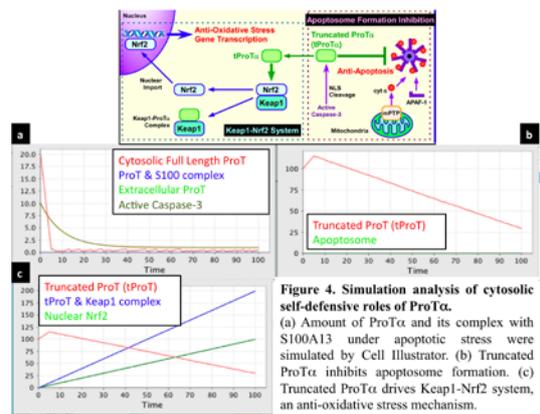
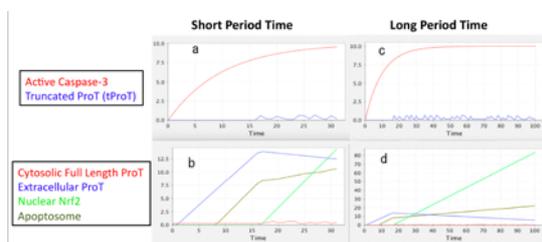


Figure 4. Simulation analysis of cytosolic self-defensive roles of ProTα. (a) Amount of ProTα and its complex with S100A13 under apoptotic stress were simulated by Cell Illustrator. (b) Truncated ProTα inhibits apoptosome formation. (c) Truncated ProTα drives Keap1-Nrf2 system, an anti-oxidative stress mechanism.

最後に、1細胞レベルにおける ProTαの細胞死モードスイッチ機構についてシミュレーションを試みた（下図参照）。



**Figure 5.**  
Simulation analysis of self-defensive roles of ProTα via cell death mode switch.  
Cell death mode switch by extracellular ProTα in single cell was simulated by Cell Illustrator. (a and b) Variation of cytosolic self-defensive machineries amount in a short period time (0-30 tp). (c and d) Variation of cytosolic self-defensive machineries amount in a long period time (0-100 tp).

短時間スケールでは、ネクロシスストレスにより細胞外に ProTαが遊離し始めると同時に ProTαのオートクライン作用によりカスパーゼ-3の活性化が始まり、遅れてアポトソームの形成も始まる。長時間スケールでシミュレーションするとカスパーゼ-3により細胞内に tProTα形成が始まるが、単体の切断型 ProTαは存在すると同時に消費され急激な量的変動は生じなかった。重要な点は、切断型 ProTαの存在と同時にアポトソーム形成に抑制がかかり、アポトソーム量を長時間一定レベルで抑制する傾向が確認できたことである。本結果は、細胞外 ProTαがネクロシスをコントロール可能なアポトーシスに変換するという実験研究で観察された事象をシミュレーションできた可能性を有する。本結果は単一細胞オートクラインモデルによるシミュレーションであるため、今後、細胞間コミュニティを形成した状態でのシミュレーションを行う予定である。

ProTαは細胞運命決定分子として位置づけられる為、今後、遊離-細胞内取り込み-核内移行、細胞膜受容体シグナリングを含めたロバストネス機構の全容解明が期待される。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

①吉崎洋平、松永隼人、進正志、藤原邦雄、植田弘師、神経自己保護能を制御するプロサイモシンのストレス下における局在と多機能活性のシミュレーション、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、(神戸)

②坂本匡啓、松永隼人、進正志、藤原邦雄、植田弘師、細胞ストレスに対するロバストネス分子:プロサイモシンの細胞死モードスイッチを介した細胞生存パスウェイシミュレーション、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、(神戸)

[図書] (計1件)

①松永隼人、植田弘師、項目「線維芽細胞成長因子」、ストレス科学事典(日本ストレス学会 財団法人パブリックヘルスリサーチセンター 監修、実務教育出版) p640

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

所属研究室ホームページ

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/neuro/index-j.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA HAYATO)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・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