

## 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 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790270

研究課題名（和文） 肺サーファクタント脂質輸送およびラメラ体合成機構の解明

研究課題名（英文） Identification of the mechanisms of pulmonary surfactant phospholipid transport and lamellar body production.

研究代表者

菱川 大介 (HISHIKAWA DAISUKE)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：10569966

研究成果の概要（和文）：肺サーファクタント脂質輸送タンパク質の候補遺伝子である遺伝子 A を同定した。A はマウスにおいて肺において特に高い発現を示し、肺の中でも特に肺サーファクタント産生細胞である肺胞 2 型上皮(ATII)細胞において高発現していた。A は肺の発達とともにその発現が誘導され、マウス ATII 細胞ではラメラ体に局在していた。タンパク質 A は GTP 依存的に肺サーファクタント脂質の主成分である disaturated phosphatidylcholine に結合することが分かった。

研究成果の概要（英文）：In this study, I identified the candidate gene “A” for pulmonary surfactant phospholipid transporter. Gene “A” was highly expressed in mouse lung, especially in alveolar type II (ATII) cells, which produce the pulmonary surfactant. Furthermore, the expression of gene “A” was promoted during perinatal periods in mouse lung. The candidate “A” was localized at lamellar bodies in mouse primary ATII cells. The recombinant protein “A” was GTP-dependently bound to the disaturated phosphatidylcholine, which is the major component of pulmonary surfactant phospholipid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：生体分子医学

## 1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタントは肺胞内の表面張力を下げ、肺の虚脱を防ぐ呼吸に必須の物質であり、その構成成分の約75%がリン脂質である。また、リン脂質の中でもグリセロール骨格の sn-1 位と sn-2 位に両方飽和脂肪酸が結

合した disaturated phosphatidylcholine がその大部分を占めることが知られている。このリン脂質の二重結合を持たない脂肪酸組成は、肺胞腔において酸化ストレス受けにくくすることにおいても重要であると考えられており、肺サーファクタント脂質の脂質組成は生体において非常に重要である。この

リン脂質は2型肺胞上皮細胞(ATII 細胞)の小胞体膜で作られ、ラメラ体と呼ばれるオルガネラへと運ばれ、刺激に応じて肺胞腔内に放出されることが知られている。このサーファクタント脂質を産生する酵素は長年不明であったが、近年、我々はこの肺サーファクタントのリン脂質を産生する酵素であるLPCAT1を同定、報告した。LPCAT1はATII細胞に高発現し、disaturated phosphatidylcholineを主な反農産物とする酵素であった。これまでにサーファクタント脂質の輸送に関しては、ABCA3というトランスporterがラメラ体膜上に存在し、ラメラ体内にサーファクタント脂質を輸送することが明らかにされてきた。しかしながら、サーファクタンと脂質合成酵素であるLPCAT1は主に小胞体膜上に局在することが示唆されており、小胞体膜で作られたリン脂質がどのようにしてABCA3の存在するラメラ体膜上へと運ばれるのか、その詳細な機構は長年の謎とされている。

## 2. 研究の目的

肺サーファクタントは呼吸に必須の物質であり、関連因子の異常は生命の危険を伴う疾患の原因になりうる。これまでに、ABCA3遺伝子の欠損マウスにおいて、新生児の肺虚脱による呼吸困難による致死が表現型として報告されている。またヒトにおいても、ABCA3の変異が致死的なサーファクタント欠乏症を呈することが知られている。このように、正常な肺サーファクタントの合成、分泌は必須であるにも関わらず、小胞体膜状でLPCAT1によって合成された肺サーファクタントリン脂質が、ABCA3の存在するラメラ体膜上へどのようにして運ばれるのか、その分子機構は未だに知られていない。本実験は、肺サーファクタント脂質を小胞体膜からラメラ体表面に運ぶサーファクタント脂質輸送タンパク質の同定とその機能解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)肺サーファクタント合成に関与する遺伝子は出生前の肺でその発現が著しく誘導されるため、NCBIのDigital Differential Displayデータベースを用いて、出生前の肺において発現が誘導される遺伝子を同定する。さらに、その中から脂質トランスポートドメインをアミノ酸配列に有するものを肺サーファクタント脂質輸送タンパク質の候補として同定する。

(2)(1)で得られた候補タンパク質のATII細胞内での細胞内局在を解析する。マウス肺ライマリーATII細胞と候補タンパク質に対

する抗体を用いた免疫細胞化学染色を行い、ATII細胞における細胞内局在を明らかにする。また、ラメラ体における発現はマウス肺よりシヨ糖密度勾配遠心法により単離したラメラ体を用いてウエスタンブロット法により解析する。

(3)その候補のリコンビナントタンパク質を大腸菌タンパク質発現システムを用いて精製する。pGEXベクターに候補タンパク質の遺伝子を導入し、GSTとの融合タンパク質を大腸菌内で合成させる。その大腸菌のライセートをGSTrapカラムに結合させ、その後プレシジョンプロテアーゼによってGSTとの融合部分を切断し、純粋な精製タンパク質を得る。得られた候補タンパク質が肺サーファクタント脂質に対して結合能を持つかどうかを解析する。得られた精製タンパク質のリン脂質への結合は、BIAcore3000を用いて解析する。

(4)候補タンパク質と相互作用するタンパク質の同定は、マウス肺の組織抽出物と候補タンパク質に対する抗体を用いて、Dynabeads Co-immunoprecipitation kitを用いた免疫沈降法により精製する。得られた候補タンパク質の同定はMALDI TOF-MS (AXIMA performance, 島津製作所)を用いて行う。

(5)肺サーファクタント関連遺伝子は、様々な肺における疾患においてその発現が変動することが知られている。本実験では卵白アルブミン(OVA)誘導性の気道過敏性モデルマウス肺での候補遺伝子の発現を解析する。

## 4. 研究成果

(1)NCBIのDigital Differential Display(DDD)は、様々な組織および細胞から同定された全Expression Sequence Tag(EST)の中で、同一の遺伝子由来のESTの出現頻度から、多臓器、多細胞間での遺伝子発現量の違いを予測することが出来るデータベースである。本実験においては、出生前と出生後のマウス肺のESTライブラリを比較し、マウスの肺において、出生前に誘導される遺伝子を同定した。その中で脂質トランスポートモチーフを持つ遺伝子Aを本実験において肺サーファクタント脂質輸送タンパク質の候補遺伝子とした。

(2)本実験により作成したタンパク質A特異的抗体を用いたウエスタンブロット法およびPCR法により、候補Aの遺伝子およびタンパク質がマウスの肺に特に高い発現量を示し、さらにデータベースで予測された通り、出生前のマウス肺において誘導されること

が明らかになった(図1)。

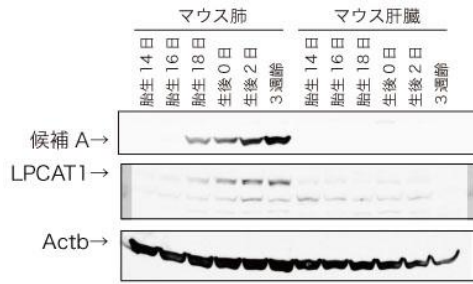


図1. 候補Aのマウス肺、肝臓でのタンパク質発現

(3) 候補タンパク質AのATII細胞での細胞内局在をマウスプライマリーATII細胞とAに対する抗体を用いて解析した。解析の結果、タンパク質AはマウスプライマリーATII細胞内において、ラメラ体上に存在するようであった(図2)。またマウス肺から単離したラメラ体を用いたウエスタンブロットにおいても候補タンパク質Aの存在を確認した。また、候補タンパク質の発現は気管支肺胞洗浄液中にも認められたことから、候補タンパク質

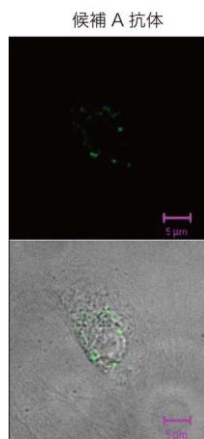


図2. マウスプライマリーATII細胞における候補Aの細胞内局在

(4) 候補タンパク質Aを大腸菌に発現させ、精製することに成功した。候補Aはアミノ酸配列内にNTPaseモチーフを有している。そのため、精製したタンパク質AのATPase活性、GTPase活性を測定した。結果、候補AはATPase/GTPase活性を共に有していることが明らかとなった。GTPase活性を有するタンパク質はGTP結合型と加水分解した後のGDP結合型との構造変化を分子スイッチとして用いることが報告されている。精製した候補Aと肺サーファクタント脂質の特徴的成分であるdisaturated phosphatidylcholineとの結合はBIAcoreを用いて測定した。結果、disaturated phosphatidylcholineと候補タンパク質Aは結合し、さらにその結合はGTP

の非加水分解アナログであるGTP $\gamma$ Sとプレインキュベーションを行うことによって増強された。この結果、GTP結合型の候補Aが肺サーファクタントリン脂質と結合している可能性が示唆された。

(5) 候補Aはアミノ酸配列のC端側に、タンパク質-タンパク質相互作用をするドメインを有しているため、相互作用タンパク質がATII細胞内に存在すると想定し、共免疫沈降実験を行い、相互作用タンパク質の同定を行った。共免疫沈降で得られた候補のタンパク質はMALDI TOF-MSにより同定した。結果、いくつかの相互作用候補タンパク質を得た。中には肺サーファクタント分泌との関与が示唆されている細胞骨格タンパク質であるスペクトリンなどが含まれていた。

(5) 肺サーファクタント関連分子は、様々な肺疾患において、その発現が変動することが知られている。サーファクタントタンパク質D(SP-D)は慢性閉塞性肺疾患においてその発現が上昇することなどから、肺の炎症マーカーとして用いられている。本実験においてはOVA誘導性の気道過敏性モデルのマウス肺における候補遺伝子Aの発現を解析した。図3に示したように候補Aの発現はSalineコントロール群と比較して、OVA誘導性の気道過敏性モデルマウス肺においてその発現が減少していた。肺炎症のマーカーであるSP-Dの発現は上昇し、内部標準として用いた $\beta$ アクチンの発現は変動していなかった。

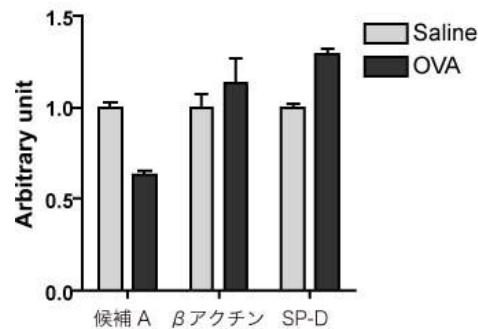


図3. 卵白アルブミン誘導性気道過敏性モデルマウス肺における候補AのmRNA発現。

本実験の結果から、Aはサーファクタンと脂質輸送に関する脂質結合、解離のスイッチとしてGTPもしくはATPを用いて、肺サーファクタント脂質をATII細胞内において輸送しているモデルが考えられる。またOVA誘導性の気道過敏性モデルにおいてAの発現が減少していたことは、Aが肺胞洗浄液中に分泌されることと合わせて考えると、気道過敏性を始めた肺疾患の治療標的となりうる可能性を示唆している。

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)

[学会発表] (計1件)

① Hideo Shindou, Daisuke Hishikawa, Takeshi Harayama, Miki Eto, Ryo Morimoto, Koichi Yuki, Takao Shimizu, Discovery of lysophospholipid acyltransferases in the Lands' cycle. 4<sup>th</sup> International Singapore Lipid Symposium. 13-16 March 2012, National University of Singapore, Singapore

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱川 大介 (HISHIKAWA DAISUKE)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：10569966

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし