

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791550

研究課題名(和文) 新規ステロイド産生細胞ミトコンドリア特異的蛋白 OSAP の機能に関する研究

研究課題名(英文) Expression of Ovary-Specific Acidic Protein in Steroidogenic Tissues: A Possible Role in Steroidogenesis

研究代表者

松本 直 (MATSUMOTO TADASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00327595

研究成果の概要(和文): Ovary Specific Acid Protein (OSAP) は卵巣特異的新規遺伝子探索の過程で発見された、既知のいかなる蛋白とも類似構造を有しない酸性蛋白である。これまでの検討では、OSAP が卵巣のみならずステロイド産生臓器のミトコンドリアに選択的に発現し、ステロイド産生に間接的に関与していることが示唆されている。今回の我々の研究において、OSAP mRNA はヒトおよびヒト胎児において、ステロイド産生臓器で多く発現しており、OSAP 発現と各臓器のステロイド産生の activity の順は相関していることが判明した。また、ミトコンドリア内の局在に関しては、比較的大きいミトコンドリアに限って OSAP 陽性像が認められ、これはミトコンドリアの成熟と OSAP の関連性を示唆する結果とも考えられた。一方、ミトコンドリアはアポトーシスの初期段階に深く関与している細胞内小器官であることから、OSAP とアポトーシスの関連について検討したところ、OSAP の発現抑制により、ミトコンドリア内膜電位の変化や cyt C 蛋白の細胞質への放出の所見が得られた。これらの結果から、OSAP はステロイド産生と深く関わっていることがより強く示唆され、またミトコンドリア特異的蛋白であることと関連した機能 (= アポトーシス制御) を有している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文): Our results indicate that the mitochondrial protein OSAP is abundantly expressed in steroidogenic tissues with a few exceptions. The results also suggest that OSAP is involved in steroidogenesis. However, our findings point to a permissive role for OSAP in steroidogenesis rather than a regulatory role because OSAP expression was not stimulated by a cAMP analog. Thus, we speculate that this protein could be involved in insuring optimal steroidogenesis through maintaining mitochondrial abundance and/or function. Further studies are warranted to substantiate this postulated role for OSAP in steroidogenic cells.

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	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ステロイド産生 ミトコンドリア OSAP アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

OSAP は、「卵巣特異的新規遺伝子探索」プロジェクトで Suppression Subtractive Hybridization 法を用いて発見された、既存のタンパク質とは一切類似構造を持たない、等電点  $pI=3.9$  の酸性蛋白である (Hennebold JD et al., *Endocrinology* 2000)。申請者らは海外共同研究者(Dr. J.D. Hennebold)とのこれまでの研究において、本蛋白が胎盤以外のステロイド産生組織に選択的に発現し、またステロイド産生細胞における細胞内局在を検討した結果、ミトコンドリアに発現していることを明らかにした。またミトコンドリアがステロイド産生の主要な場であることから、OSAP がステロイド産生に関与していると考え、OSAP 高発現細胞株であるマウス副腎皮質 Y-1 細胞において OSAP の発現抑制を行いステロイド産生における役割を検討した。生体でのステロイド生成過程では、コレステロールからプレゲネロンが合成され、最終的にコルチゾールが合成される。この過程には、コレステロールがミトコンドリア外膜から内膜への移行に必要なステロイド産生急性調節蛋白 (StAR) また産出酵素である P450<sub>scc</sub> や P450<sub>c17,3</sub> HSD などが関与しており(右図)、cAMP 投与により StAR や P450<sub>scc</sub> 等の産生酵素の発現が増強する。しかしながら、Y-1 細胞において OSAP は、ステロイド産生に積極的に関わるこれらの因子と異なり cAMP による制御を受けていないとの知見が得られた。さらに OSAP の RNA 干渉による発現抑制により、cAMP 刺激性プロゲステロン産生の抑制やミトコンドリア量を示す指標の減少とミトコンドリア形態の変化が認められた (Matsumoto T et al., *Endocrinology*, 2009)。これらの成績から、OSAP はステロイド合成過程に対して、直接的な関与はしていないものの、ミトコンドリアの形態または機能の維持、あるいはステロイド産生酵素活性への影響など何らかの形で間接的な役割を果たしていることが示唆される。

ミトコンドリアは、頻繁な移動や分枝、融合、分裂といった形態変化に見られるように、細胞種や細胞環境、細胞分化、病的状態によりその大きさや構造を動的に変化させており、特に、常態では個々のミトコンドリアの融合・連結 (fusion) と分裂 (fission) のバランスを制御することにより、ミトコンドリア自身の網状のネットワーク構造を維持している。近年、ミトコンドリア形成蛋白 (mitochondria shaping protein) と呼ばれるミトコンドリア形態を制御する蛋白の存在が注目されており、蛋白発現強度によりアポトーシスを制御するとされている (Traffic 2001)。細胞死の一形態であるアポトーシスは、ミトコンドリア内膜の一時的な過分極、外膜の物質透過性の亢進を経て、ミトコンドリア内外膜間腔にある cytochrome C (cyt C) や AIF などの蛋白や  $Ca^{2+}$ 、活性酸素種などの

細胞質への放出を経て開始される。またミトコンドリア内膜の膜電位消失は fusion の抑制および fission の促進を介して cyt C の放出に関与し、ミトコンドリアの断片化やクリスタ再構築といった形態的变化を引き起こすとされている (Mol Biol Cell 2002)。申請者の予備実験では、OSAP 発現抑制により、cyt C 蛋白の細胞質への放出を示唆する Western blotting の所見が得られている。したがって、アポトーシスの初期段階に起こるミトコンドリア再構築において、OSAP がミトコンドリアの機能および形態の制御機構に関与している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでの知見を進展させ、ステロイド産生細胞のミトコンドリアにおける OSAP の役割について、特にアポトーシス抑制の可能性に着目して解明すること。

### 3. 研究の方法

#### OSAP の発現部位の同定のステロイド産生臓器における役割の検討

- (1) OSAP の発現部位と局在の同定：マウスおよびヒト各種臓器の cDNA を用いて OSAP mRNA の発現レベルを定量した。また、免疫組織染色法を用いてマウスのステロイド産出臓器における OSAP 蛋白の局在を検討した。
- (2) OSAP のステロイド合成過程における役割の検討：Y-1 細胞株における cAMP の投与による OSAP 蛋白の発現変化を検討した。
- (3) OSAP の発現抑制による機能解明：siRNA 導入による OSAP の発現抑制を行い、ステロイド産生量の変化、OSAP の局在および発現の変化、ミトコンドリアの形態変化の観察、ミトコンドリアの量的変化の観察の各項目について control siRNA 導入群と比較検討した。

#### OSAP のミトコンドリア内局在に関する検討

現在までに各種ミトコンドリア分画単離法と Western Blot との併用によりミトコンドリア内の OSAP 蛋白の局在を検討してきたが、OSAP と特異抗体との抗原・抗体反応が著しく強い場合、どの各ミトコンドリア分画に OSAP が発現しているのか不明瞭である。そこで免疫電顕の手法を用いて OSAP のミトコンドリア内局在に関して検討した。

#### OSAP 遺伝子発現抑制によるミトコンドリア機能および形態的变化

siRNA による OSAP 発現抑制 (+アポトーシス誘発物質) により惹起されるアポトーシスにおいて、ミトコンドリアの機能・形態変化について、非特異的 siRNA 添加群、未処理群と比較検討した。

(1) ミトコンドリア膜電位 (  $mt$  ) の変化  
ミトコンドリア透過性遷移に伴う  $mt$  の増減を評価するため、Rhodamine 123 ( 負電荷に反応しミトコンドリアに集積する蛍光標識プローブ ) をローディングさせ、フローサイトメトリーにより解析した。

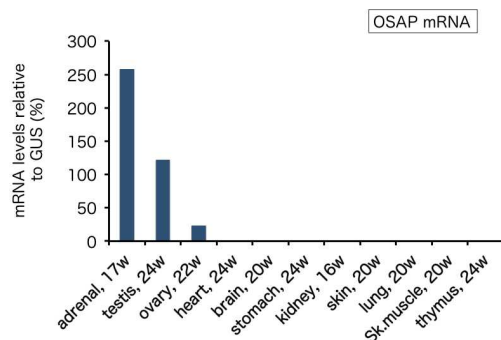
(2) ミトコンドリアの形態変化および cyt C 放出、AIF の局在変化

抗 cyt C 抗体および抗 AIF 抗体を用いた免疫電顕により、caspase 活性化因子である cyt C のミトコンドリア外膜から細胞質への放出像や AIF の局在変化を検討する。また、ミトコンドリアマトリックスの膨張についても評価した。

#### 4 . 研究成果

##### OSAP の発現部位の同定のステロイド産生臓器における役割の検討

- (1) OSAP はヒトにおいては副腎に突出して高発現しており、ヒト成人副腎と妊娠中期胎児副腎 (HFA) の比較では OSAP mRNA は HFA により多く発現し、ヒト胎児臓器中においても HFA で最も高い発現レベルを示すことが明らかとなった。また、ヒト胎児における OSAP は、成人と同様にステロイド産生臓器で多く発現しており、内因性コントロールである  $\beta$ -glucuronidase の発現量との比較で、副腎 > 精巣 > 卵巣の順であった。これらの臓器は胎生期においてもステロイド産生を行っており、OSAP 発現の順と各臓器のステロイド産生の activity の順は相関していた。また調べた範囲内の非ステロイド産生臓器では、OSAP の発現は非常に低いかほとんどみられなかった。



また細胞局在は、卵巣では排卵前のグラフ卵胞の莢膜細胞と顆粒膜細胞に、副腎では皮質全層に発現を認めた。

- (2) cAMP 刺激によって OSAP の発現に変化は見られなかった。
- (3) siRNA の導入により OSAP は mRNA および蛋白レベルでの発現抑制が認められた。また、OSAP の発現抑制により以下の結果が得られた。cAMP 刺激による培養液中のプロテストロン濃度は control と比較し減少したが、cAMP の非存在下では変化が認められなかった。 Y1 細胞株における局在に変化はなかったが発現量の減少が認められた。 ミトコンドリアの形態の変化は、繊維状のネットワークを形成す

るミトコンドリアに、断片化像を示す細胞が認められた。 ミトコンドリアの量的変化の検討では、ミトコンドリア DNA copy 数 / 核 DNA copy 数の相対比を算出した結果、OSAP の発現抑制により相対比は有意に減少した。

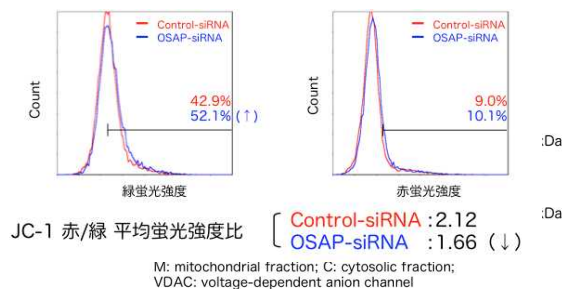
##### OSAP のミトコンドリア内局在に関する検討

マウス Y-1 細胞を用いて OSAP の局在について免疫電顕を用いて検討したところ、Pre-embedding 法では、ミトコンドリア外膜に density の高い陽性像が観察され、これまでの免疫蛍光染色による結果と矛盾しないものと考えられた。しかしながら、Post-embedding 法による所見では、ミトコンドリアの大きさにより染色性に違いがあり、比較的大きいミトコンドリアに限って OSAP 陽性像が認められた。これはミトコンドリアの成熟と OSAP の関連性を示唆する結果とも考えられた。

##### OSAP 遺伝子発現抑制によるミトコンドリア機能および形態的变化

蛍光色素 JC-1 を用いてミトコンドリア内膜電位 (  $mt$  ) の変化をフローサイトメトリーで解析した結果、OSAP の発現抑制により  $mt$  の低下が認められた。

また、western blotting において、細胞質分画に cyt C 蛋白が認められ、cyt C 蛋白の細胞質への放出を示唆する所見と考えられた。



以上の結果から、OSAP はステロイド産生と深く関わっていることがより強く示唆され、またミトコンドリア特異的蛋白であることと関連した機能 (= アポトーシス制御) を有している可能性が考えられた。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

松本直, 石本人士, 峰岸一宏, 近藤朱音, 佐藤茂, 石井博樹, 田中守, 和泉俊一郎,

三上幹男．ヒト胎児副腎の機能的層形成：  
層特異的発現蛋白からのアプローチ．第 63  
回日本産科婦人科学会学術講演会（2011 年  
8 月 29 日，大阪国際会議場（大阪府））

〔図書〕(計 0 件)

〔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  
なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

松本 直 (MATSUMOTO TADASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00327595