

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590726

研究課題名(和文)ノシスタチン結合タンパク質標的分子TRPV6の品質管理に基づく疼痛制御の解明

研究課題名(英文)Pain regulation based on quality control of TRPV6, a target molecule of nocistatin-interacting protein

研究代表者

芦高 恵美子 (ASHITAKA, Emiko)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：50291802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、疼痛制御ペプチドノシスタチンの結合タンパク質(Nocistatin binding protein, NSP1)を同定した。NSP1は分子シャペロンHSP60と選択的Ca²⁺チャネルTRPV6と会合した。NSP1とHSP60の相互作用は、中枢神経系ではなく腎臓において見られた。一方、TRPV6は腎臓以外に脳や脊髄にも発現していること、中枢神経系特異的に発現するTRPV6スプライスバリエントが存在することを示した。NSP1はTRPV6の細胞膜への移行を抑制することによりチャネル活性を抑制した。NSP1とTRPV6バリエントは炎症性疼痛に伴う発現変動が認められた。

研究成果の概要(英文)：We identified a pain-regulated peptide nocistatin-interacting protein (Nocistatin binding protein, NSP1). NSP1 bound a molecular chaperone HSP60 and a highly selective Ca²⁺ channel TRPV6. The interaction of NSP1 and HSP60 was observed in the kidney but not the central nervous system. On the other hand, TRPV6 was expressed in the brain and spinal cord in addition to kidney, and TRPV6 splice variants were specifically expressed in the central nervous system. NSP1 inhibited the TRPV6 activity through the translocation of TRPV6 to the cell membrane. The changes of NSP1 and TRPV6 splice variants expression were observed in inflammatory pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：ノシスタチン ノシスタチン結合タンパク質 TRPV6 HSP60 疼痛反応

1. 研究開始当初の背景

我々は、痛覚制御ペプチドとしてノシスタチンを発見し(Okuda-Ashitaka E et al. *Nature* 392:286-289, 1998)、ノシスタチン結合タンパク質(Nocistatin binding protein 1, NSP1)として 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (NIPSNAP1)を同定した(Okuda-Ashitaka E et al. *J Biol Chem* 287:10403-10413, 2012)。NSP1 遺伝子欠損マウスでは、ノシスタチンによるアロディニア抑制作用が阻害され、NSP1 が疼痛制御に関与する分子であることが明らかになった。

他方、NSP1 は、腎臓や小腸の Ca^{2+} 吸収に関与している Transient receptor potential V6 (TRPV6) と会合し、細胞内への Ca^{2+} 透過性を抑制することが報告されている(Schoeber JH et al, *Eur J Physiol* 457:91-101, 2008)。我々は、C 末端に HA を付加した NSP1-HA を腎臓由来 Cos7 細胞に導入し、HA-アガロースで精製したところ、67 kDa のタンパク質を単離した。このタンパク質は、TOF-MS 解析の結果、分子シャペロン HSP60 であった。

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの多くの神経変性疾患の要因の一つとして、タンパク質の品質管理機構の破綻が考えられている。疼痛分野では、神経因性疼痛を伴うような神経損傷にともなって、後根神経節や脊髄でタンパク質の品質管理を担う分子シャペロン HSP27 や BiP が増加すること(Kim DS et al. *Neuroreport* 12: 3401-3405, 2001; Tachibana T et al. *Neurosci Lett* 372:133-137, 2002)、モルヒネの代謝産物モルヒネ-3-グルクロニドによる触覚刺激までもが痛みとなるアロディニアが HSP90 阻害剤により抑制されること(Lewis SS et al. *Neuroscience* 165:569-583, 2010)が報告されている。しかしながら、疼痛制御に関する分子シャペロンの発現制御や標的分子などタンパク質の品質管理に関して詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、疼痛制御分子 NSP1 が、分子シャペロン HSP60 と Ca^{2+} チャネル TRPV6 と相互作用を示すことから、TRPV6-NSP1-HSP60 の機能的相互作用、タンパク質の品質管理、疼痛制御への関与に焦点をあて、膜タンパク質の品質管理に基づく疼痛制御機構を解明することを目的とする。

(1) TRPV6-NSP1-HSP60 の機能的相互作用

TRPV6、NSP1、HSP60 の相互作用の関係や、相互作用する細胞小器官、タンパク質のプロセッシングを解明する。また、NSP1 と HSP60 による TRPV6 の膜移行を調べ、 Ca^{2+} 透過性との関連を解析する。さらに、NSP1 と他の TRPV や分子シャペロンとの相互作用を検討し特異性や多様性を明らかにする。

(2) 疼痛制御

NSP1 による疼痛制御、NSP1 相互作用分子の痛覚伝達経路における発現や疼痛に伴う発現変化を解析し、疼痛に伴う TRPV6、NSP1、HSP60 の複合体形成と疼痛との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タンパク質相互作用の解析

NSP1 や TRPV6 の HA や EYFP のタグ融合分子を腎臓由来 Cos7 細胞、神経系株細胞 NG108-15、N115、PC12 細胞に導入し、タグ抗体による免疫沈降実験を行った。脳や脊髄などの組織から得たホモジネートを用い、抗体や GST 融合タンパク質による免疫沈降実験を行った。NSP1、HSP60、TRPV6 の細胞内局在は、タグ抗体や各細胞小器官マーカー抗体を用いた多重染色により検討した。また、TRPV ファミリーや HSP ファミリーとの相互作用を、細胞発現系を用いた免疫沈降実験で検討した。部位欠損変異体 TRPV を構築し、NSP1 と TRPV の結合ドメインを解析した。

(2) TRPV6 の機能解析

NSP1 と TRPV6 を共発現細胞において、電気生理学的解析により、細胞外 Ca^{2+} の濃度変化(0 mM から 10 mM)に伴う細胞内への Ca^{2+} 流入を解析した。また、黄色蛍光蛋白質(YFP)付加 TRPV6 を作製し、HSP60 や NSP1 との共発現による膜への移行を蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 疼痛解析

カラゲニンやホルマリン後脚皮下投与による炎症性疼痛モデルを作製し、Real-time PCR、Immunoblotting により TRPV6 の mRNA およびタンパク質レベルの発現変化を解析した。組織における免疫沈降実験を行い、TRPV6-NSP1-HSP60 複合体の量的変化について解析した。

4. 研究成果

(1) NSP1 と HSP60 の相互作用

結合特異性

NSP1 は 32kDa のタンパク質であるが、N 末端が切断された 29kDa が成熟型タンパク質として存在する。C 末端に HA タグを付加した NSP1-HA 発現細胞では、HA 抗体によりプロセッシングされた成熟型 NSP1 が、N 末端 HA 付加 HA-NSP1 では前駆体型 NSP1 が検出された。Cos7 細胞を用いた発現細胞系の HA アガロースによる免疫沈降実験により、NSP1 と HSP60 の相互作用は NSP1-HA 発現細胞では認められたが、HA-NSP1 では認められなかった。NSP1 の N 末端にグルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)を融合したタンパク質のプルダウンアッセイでも HSP60 との相互作用は見られなかった。

細胞・組織特異性

29kDa の成熟型タンパク質は、脳、脊髄、

腎臓、肝臓に発現している。一方、HSP60 は多くの組織に広範囲に分布している。NSP1-HA を細胞に導入しHA アガロースで免疫沈降したところ、NSP1 と内因性の HSP60 の相互作用は、腎臓由来の Cos7 細胞で見られたが、神経系株細胞 NG108-15、N115、PC12 細胞では NSP1 との結合は認められなかった。いずれの細胞も内因性に HSP60 を発現しているが、細胞による結合特性が示された。また、マウスの脳および腎臓の可溶性画分を NSP1 の C 末端を認識する抗体で免疫沈降したところ、腎臓において NSP1 と HSP60 との相互作用が認められ、脳では認められなかった。

細胞内局在

NSP1 はミトコンドリアと細胞膜の両方に存在する。NSP1 と HSP60 発現 Cos7 細胞において二重染色を行ったところ、NSP1 と HSP60 の共局在はミトコンドリアで認められた。

HSP ファミリー分子との相互作用

マウスの腎臓の可溶性画分を NSP1 の C 末端を認識する抗体で免疫沈降したところ、NSP1 と HSP60 と結合したが、HSP70 や HSP90 との相互作用は認められなかった。

以上の結果より、NSP1 は中枢神経系ではなく末梢組織の腎臓の組織や腎臓由来の細胞のミトコンドリアにおいて HSP60 と相互作用を示した。

(2)NSP1 と TRPV6 の相互作用

結合特異性

NSP1 と TRPV6 の相互作用は、NSP1-HA と HA-NSP1 のいずれを Cos7 細胞に発現しても認められた。部位変異体の NSP1 や TRPV を作製し、結合ドメインを解析したところ、TRPV6 の N 末端細胞内領域と NSP1 の N 末端領域が相互作用を示した。また、NSP1 と TRPV6 発現 Cos7 細胞の二重染色を行ったところ、NSP1 と TRPV6 の共局在は核周辺の小胞体で認められた。

TRPV ファミリー分子との結合

NSP1 と TRPV ファミリー分子との相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、NSP1 は TRPV6 の他に TRPV2 と相互作用することを見いだした。TRPV2 の N 末端細胞内領域と NSP1 の N 末端領域が相互作用を示した。C 末端と膜領域の欠損した NSP1 では糖鎖付加を受けた TRPV2 以外に糖鎖修飾を受けていない TRPV2 との会合が見られた。後根神経節細胞では、TRPV2 と NSP1 は共局在しており、TRPV2 陽性細胞 45% が NSP1 と、NSP1 陽性細胞の 32% は共局在していた。さらに、TRPV2 は機械刺激応答分子であることから、後根神経節細胞培養において伸展刺激による機械刺激応答についても検討した。その結果、TRP チャネル、電位依存性 T 型 Ca^{2+} チャネル、ATP 受容体 P2X が関与する Ca^{2+} 流入機構が存在すること、酸性 pH や NO ドナーによって Ca^{2+} 流入が増強されることを明らかにした。NSP1 との関連については今後の課題である。

(3)NSP1 による TRPV6 の機能制御

Ca^{2+} 流入

電気生理学的解析では、TRPV6 発現細胞に 10 mM Ca^{2+} 溶液を添加することにより Ca^{2+} 流入による内向きの電流が生じる。TRPV6 と NSP1 の共発現細胞では、その電流密度が約 36% 抑制された。NSP1 の結合分子であるノシスタチンは TRPV6 の Ca^{2+} 流入や NSP1 による障害に対し有意な影響を及ぼさなかった。

発現

Cos7 細胞において TRPV6 と NSP1 の共発現細胞系では、NSP1 は TRPV6 の発現量には影響をおよぼさなかった。また、NSP1 遺伝子欠損マウスの脳、脊髄、腎臓の TRPV6 の mRNA とタンパク質の発現には有意な差は認められなかった。

膜移行

YFP 融合 TRPV6 を Cos7 細胞に発現させたところ、発現した TRPV6 全体の約 13% が細胞膜に局在していた。NSP1 との共発現細胞系では、全体の TRPV6 約 8% が細胞膜に局在し、細胞膜への移行が約 38% 抑制された。NSP1 による TRPV6 の Ca^{2+} 透過性抑制の抑制率と膜移行の阻害率は相関していた。HSP60 の発現では TRPV6 の膜移行に有意な変化はなかった。

TRPV6 スプライスバリエント

RT-PCR により TRPV6 は腎臓以外に脳や脊髄においても発現していた。さらに、脳や脊髄に特異的に発現する TRPV6 スプライスバリエントを見だし、中枢型 TRPV6 と名付けた。中枢型 TRPV6 の全長 cDNA の解析により、少なくとも 4 種類のスプライスバリエントが存在した。TRPV6 は 6 回膜貫通領域を有するのに対し、これらのスプライスバリエントは C 末端が欠損し、1 番目から 4 番目の膜貫通領域しかもたず、チャネル構造を保持していなかった。TRPV6 は 4 量体で機能的なチャネルを形成することから、チャネル活性をもつ TRPV6 とのヘテロ複合体を形成することによりチャネル活性を制御している可能性が考えられるが、中枢型 TRPV6 とのチャネル形成や Ca^{2+} 透過性に関しては今後の課題である。

以上の結果より、NSP1 は TRPV6 の細胞膜への移行を抑制することにより Ca^{2+} 流入を抑制した。NSP1 は TRPV2 とも相互作用が見られた。TRPV6 は腎臓以外に脳や脊髄においても発現しており、中枢神経特異的に発現するスプライスバリエントも存在していた。

(4)NSP1 による疼痛制御

NSP1 欠損マウスの疼痛反応

NSP1 遺伝子欠損マウスでは、アロディニアのみならずホルマリン投与による急性炎症やカラゲニン投与による慢性炎症性疼痛おの増強作用が見られた。

疼痛に伴う発現変化

後根神経節細胞では炎症性疼痛に伴って TRPV6 や TRPV2 の発現には変動しなかった。しかしながら、炎症性疼痛モデルマウスの脊髄においては中枢型 TRPV6 発現が上昇した。

一方、NSP1 は炎症の初期では発現上昇が、慢性炎症では発現が減少した。NSP1 発現変動が TRPV との相互作用を介して疼痛制御を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. Nocistatin: milestone of one decade of research Molecular understanding of pain and future treatment of chronic pain. Current Pharmaceutical Design, in press 2014 査読有

Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tsubouchi, S., Kiyonari, H., Iwamatsu, A., Noda, T., Handa, H., and Ito, S. Identification of NIPSNAP1 as a nocistatin-interacting protein involving pain transmission. J Biol Chem, 287:10403-40413, 2012 査読有
芦高恵美子, 伊藤誠二 神経ペプチド Update 痛み ノシセプチンとノシスタチン Clinical Neuroscience 30: 148-151, 2012 査読無

芦高恵美子 脊髄の疼痛発症におけるシナプス制御 生化学 84:1019-1023, 2012 査読無

芦高恵美子 アロディニア 生化学 84: 1031, 2012 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

Okuda-Ashitaka, E., Okamoto, K., Minami, T., and Ito, S. Involvement of NIPSNAP1, a neuropeptide nocistatin interacting protein, in inflammatory pain. The 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.11.12, SanDiego

岡本和哉, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子 炎症性疼痛における痛覚抑制ペプチドノシスタチン結合タンパク質の役割 日本生物高分子学会 2013 年度大会, 2013.10.20 大阪、

松山純一, 芦高恵美子 機械刺激感受性 Ca²⁺流入の修飾機構の解明 日本生物高分子学会 2013 年度大会, 2013.10.20、大阪

岡本和哉, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子 炎症性疼痛における痛覚抑制ペプチドノシスタチン結合タンパク質の発現解析 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11、横浜

松山純一, 芦高恵美子 機械刺激感受性 Ca²⁺流入の修飾機構の解明 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.13、横浜

岡本和哉, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子 痛覚抑制ペプチドノシスタチン結合タンパク質の炎症性疼痛における役割 第 60 回日本生化学会近畿支部例会, 2013.5.18、

吹田

松山純一, 芦高恵美子 機械刺激感受性 Ca²⁺流入の修飾機構の解明 第 60 回日本生化学会近畿支部例会, 2013.5.18、吹田
岡本和哉, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子 神経ペプチドノシスタチン結合タンパク質の炎症性疼痛への関与 第 85 回日本生化学会大会, 2012.12.15、福岡

松山純一, 芦高恵美子 後根神経節細胞における機械刺激感受性 Ca²⁺流入機構の解明 第 85 回日本生化学会大会, 2012.12.15、福岡

松山純一, 芦高恵美子 後根神経節細胞における機械刺激感受性 Ca²⁺流入機構の解明 第 59 回日本生化学会近畿支部例会, 2012.5.19、京都

Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tsubouchi, S., Kiyonari, H., Iwamatsu, A., Noda, T., Handa, H., and Ito, S. Identification of a nocistatin-interacting molecule using high-performance affinity latex beads. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011.11.16, Washington, DC

芦高恵美子, 南敏明, 壺内信吾, 清成寛, 岩松明彦, 野田哲生, 半田宏, 伊藤誠二 アフィニティビーズを用いたノシスタチン結合分子の同定 第 58 回日本生化学会大会, 2011.9.23、京都

芦高恵美子, 南敏明, 壺内信吾, 清成寛, 岩松明彦, 野田哲生, 半田宏, 伊藤誠二 アフィニティビーズを用いたノシスタチン結合分子の同定 第 58 回日本生化学会近畿支部例会, 2011.5.21、大阪

〔図書〕(計 2 件)

芦高恵美子, 伊藤誠二 Annual Review 神経 2014 III. 各種疾患 11. 機能性疾患 1) ノシセプチンとノシスタチン 285(272-279)、中外医学社、2014

Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. Nociceptin Opioid: Pain regulation induced by nocistatin-targeting molecules: G protein-coupled-receptor and nocistatin-interacting protein. Vitamins and Hormones, in press, Elsevier, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦高 恵美子 (OKUDA-ASHITAKA Emiko)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：50291802

(2) 研究分担者

伊藤 誠二 (ITO Seiji)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80201325

(3)連携研究者

富永 真琴 (TOMINAGA Makoto)
自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエ
ンスセンター・教授
研究者番号： 90260041

(4)研究協力者

奥田 沙織 (OKUDA Saori)
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生
岡本 和也 (OKAMOTO Kazuya)
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生
松山 純一 (MATSUYAMA Junichi)
大阪工業大学大学院工学研究科・大学院生