

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658257

研究課題名（和文） 遺伝的形質に基づく生体内エクソソーム形成制御法の開発と免疫介在性疾患への臨床応用

研究課題名（英文） Development and clinical applications of procedures for regulating the exosome formation based on the genetic traits of canine erythroid cells.

研究代表者

佐藤 耕太 (SATO KOTA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

研究成果の概要（和文）：犬 HK 型赤血球は脂質ラフト異常を伴う遺伝的形質である。このラフト形成異常にはエクソソーム放出が関与すると考えられるが、その分子機構は明らかでない。本研究では HK 型赤血球形成におけるエクソソーム形成異常の分子基盤を明らかにするために、網状赤血球およびエクソソームの蛋白質組成を比較した。この比較により HK 形質原因遺伝子の候補となった stomatin 遺伝子に HK 形質に関連する変異は見られなかった。しかし、SNP マーカーを応用した解析により犬第12番染色体上にある遺伝子産物の変異が HK 形質の原因であり、この異常がエクソソームの形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The HK phenotype in dog erythrocytes is suggested to be caused by disorders in lipid raft and exosome formations. However, the molecular basis of the disorders remains unknown. To clarify the mechanisms for regulating the exosome formation, we compared the protein contents of red cells, reticulocytes and exosomes from HK and normal dogs. Resultant candidate protein “Stomatin” was not a cause of HK phenotype. The genome-wide association study revealed that the causative gene located in canine chromosome 12 would be associated with the exosome and raft disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：エクソソーム、赤血球、ラフト、遺伝的形質

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは網状赤血球の成熟過程で最初に見出された40-100 nmの膜小胞で、不要な膜蛋白質を除去する役割を担うと考えられてきた。その後、赤血球以外にも多くの細胞がエクソソームを放出することが明らかになり、その構成成分に依存した多彩な役割が見出された。たとえば、樹状細胞から放出されるエクソソームは抗原提示に関与することが知られている。さらに、エクソソームは内腔にmiRNAを含み細胞間情報伝達の役割を担うことが示されており (Valadi, H.

et al. Nat. Cell Biol. 9: 654. 2007)、一部の腫瘍ではエクソソームが進行を制御することが報告されている。最近、血中腫瘍細胞由来エクソソームが腫瘍免疫を抑制することが示され、腫瘍を含む免疫介在性疾患の診断や治療法の開発へのエクソソームの応用が期待されている。しかし、エクソソームの構成成分を決定するための分子機構については未だに不明な点が多く、その解明が臨床応用のための大きな課題となっている。

一方、われわれは25年以上前より遺伝性高Na, K-ATPase赤血球 (HK型赤血球) を持つ

犬の家系を維持しているが、最近、これらの犬の網状赤血球成熟過程でラフト蛋白質の異常を伴うエキソソーム形成異常が生じ、そのため HK 型赤血球が産生されることを見出した。すなわち、この犬家系で想定される遺伝子異常が、エキソソーム形成制御機構の一端を担うものであるとの知見を得た。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、次の3点の解明を目的とする。

(1) 遺伝性 HK 型赤血球における脂質ドメインとエキソソーム形成異常の分子機構の解明

(2) 各種体細胞におけるエキソソームの形成制御の分子メカニズムの解明

(3) 各種細胞由来エキソソームの構成成分の人為的制御法の開発

これらの検討により、エキソソームの生成や組成に変化をもたらす分子機構の解明が期待される。また、生体や腫瘍細胞で応用可能なエキソソーム形成制御因子を見出し、その調節による人為的なエキソソーム形成制御法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性 HK 型赤血球由来エキソソームの組成の解析

LK および HK 型の各形質赤血球を有する個体より網状赤血球を採取し、培養液中に放出されるエキソソームの蛋白質組成を比較し、各形質に特異的な因子を明らかにした。

(2) 各種体細胞におけるエキソソーム形成制御の分子メカニズムの解明

上記で得られた因子について cDNA を単離し、塩基配列を比較する一方、原因遺伝子の決定のために、SNP マーカーを用いたゲノムワイド関連解析を実施した。

4. 研究成果

(1) LK および HK 型の各形質赤血球における膜蛋白質組成の比較

はじめに、赤血球遺伝的形質の差異を明らかにするために、各形質の犬より赤血球膜を単離し、その膜蛋白質組成をウェスタンブロッティング法により比較した (図1)。用いた家系犬は HK 型形質を含む柴系雑種犬の家系であり、LK 対照犬としてビーグルを4頭用いた。HK 型犬では、これまでの報告の通り、HK 型で Na, K-ATPase の発現が見られるものの、LK ホモおよびヘテロ接合個体ではこれらの発現は見られなかった。また、ラフト関連蛋白質でありエキソソームの形成への関与が示唆されている stomatin について比較したところ、LK 型では完全に消失しているものの、HK 型では高度な発現が認められた。また、HK ヘテロ接合個体でも中間レベルの発現が認

められ、HK 型形質が完全劣性の形質では無く、膜蛋白質組成のレベルでは不完全優勢の形質であることが明らかとなった。以上の結果より、HK 型赤血球で見られるエキソソームでは、ラフト形成異常による stomatin および Glut1 のエキソソームへの移行が変化すると考えられ、ラフト形成のコントロール機構の解明が重要であることが明らかとなった。

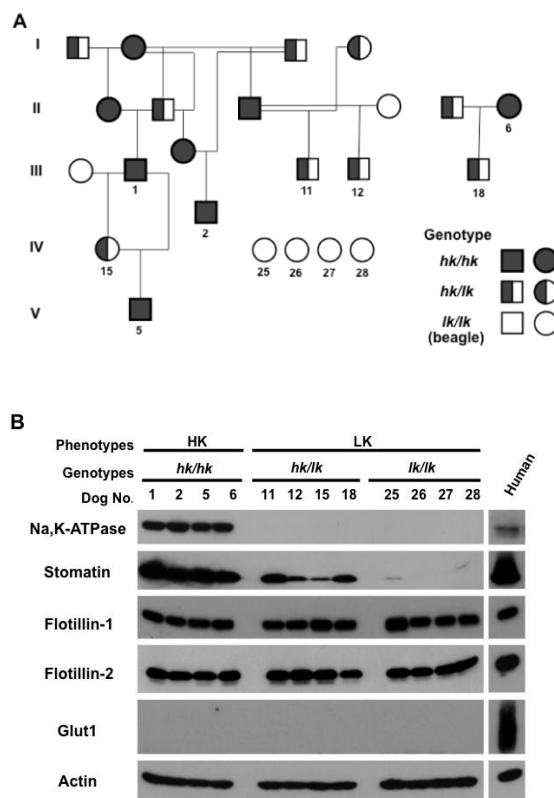


図1. LK および HK 型赤血球を有する犬の家系 (A) と各形質の個体の赤血球膜蛋白質組成 (B)

(2) LK および HK 型の各形質網状赤血球膜蛋白質組成の比較

次に、各形質の網状赤血球を瀉血による急性貧血犬より採取し、網状赤血球を比重遠心により分離し、培養した。網状および成熟赤血球膜について、その蛋白質組成をウェスタンブロッティングにより比較した (図2)。成熟赤血球での差異が見られた Na, K-ATPase および stomatin に加え、Glut1 もまたその発現レベルに差異が見られることが明らかとなった。

これらの蛋白質が実際にエキソソームとして放出されているのかを明らかにするために、エキソソームの蛋白質組成を同様にウェスタンブロッティング法により検討したところ、網状赤血球成熟に伴い消失する Na, K-ATPase, stomatin, flotillin-2 および Transferrin receptor (TfR) はエキソソーム

画分 (P2) として上清中に放出されるのに対し、膜骨格蛋白質である Spectrin や Band 3 ではエキソソーム画分に検出されず、エキソソーム系での放出が関与することが明らかとなった。

図 2. LK および HK 型網状赤血球の膜蛋白質組成 (A) とその量的変化 (B)

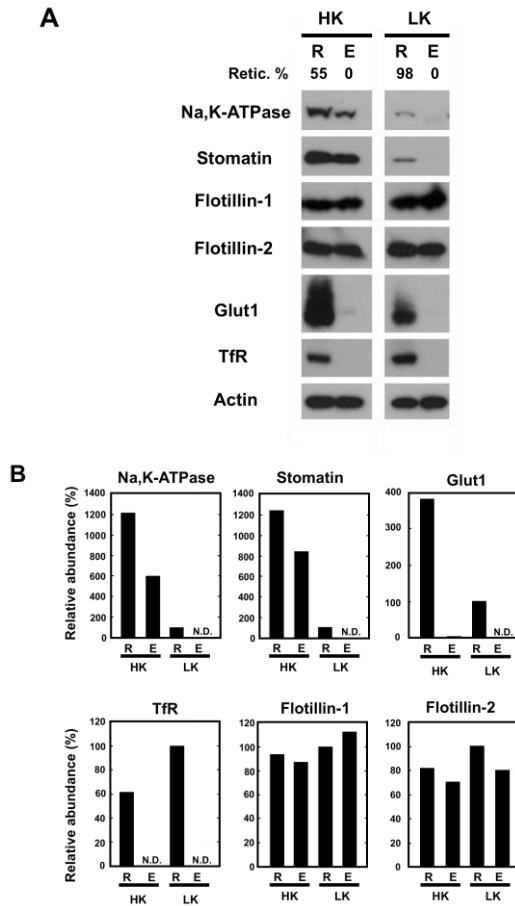
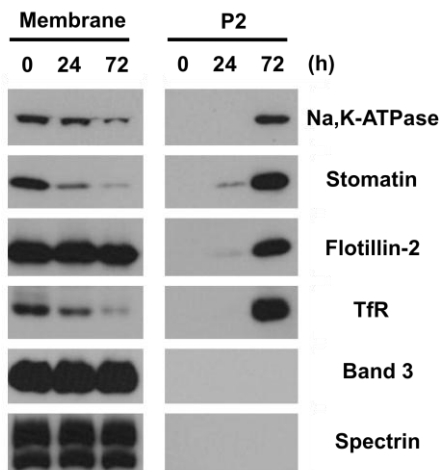


図 3. 網状赤血球膜蛋白質のエキソソーム画分への放出



(3) 犬網状赤血球由来エキソソームの特徴次に、網状赤血球より放出されるエキソソームの特徴を明らかにするために、これらをシヨ糖密度勾配遠心により分画し、その蛋白質組成を比較した (図 4)。Na,K-ATPase と stomatin を含有するエキソソームの画分のピークそれぞれ異なり、これらのエキソソーム形成機構に差異が見られることが示唆された。特に stomatin および Flotillin-2 のようなラフト関連蛋白質のピークが一致するのに対し、Na,K-ATPase ではより比重の低い組成となっており、脂質組成を含む差異が見られるものと考えられた。

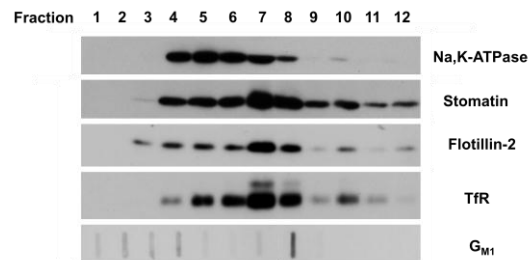


図 4. エキソソーム画分のシヨ糖密度勾配遠心分画の蛋白質組成

(4) HK 形質原因遺伝子の探索

以上の結果より、HK 型赤血球においてエキソソーム放出に関与する原因遺伝子候補として stomatin 遺伝子を単離し、塩基配列を比較した。しかしながら、差異は認められず、stomatin 自体の変異が原因ではないことが明らかとなった。一方で、マイクロサテライトマーカーを用いた関連解析の結果から、犬第 12 番染色体に HK 形質と関連の強い遺伝子が存在することが明らかとなった。さらに、SNP マーカーを用いたゲノムワイド関連解析の結果から、10-12 個の遺伝子が候補となっており、現在それらの塩基配列の解析を進行している。このアプローチにより、エキソソーム組成をコントロールする犬赤血球 HK 形質原因遺伝子産物が決定できるものと考えられる。

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 4 件)

- Otsu, W., Kurooka, T., Otsuka, Y., Sato, K. and Inaba, M. (2013) A new class of endoplasmic reticulum export signal $\cdot X \cdot X \cdot$ for transmembrane proteins and its selective interaction with Sec24C. J. Biol. Chem., in press

10.1074/jbc.M112.443325. 査読有

2. Sato, K., Otsu, W., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2013) Modulatory roles of NHERF1 and NHERF2 in cell surface expression of the glutamate transporter GLAST. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:839-845. 査読有
3. Wang, C.C., Sato, K., Otsuka, Y., Otsu, W., Inaba, M. (2012) Clathrin-mediated endocytosis of mammalian erythroid AE1 anion exchanger facilitated by a YXXΦ or a noncanonical YXXXΦ motif in the N-terminal stretch. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 17-25. 査読有
4. Wang, C.C., Sato, K., Otsuka, Y., and Inaba, M. (2011) Cell surface expression and internalization of the murine erythroid AE1 anion exchanger tagged with an extracellular FLAG epitope. *Jpn. J. Vet. Res.* 59: 157-164. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 大津 航、大塚 弥生、宮園 耕介、佐藤 耕太、稲葉 睦. R664X 変異 Anion Exchanger 1 (AE1) 小胞体関連分解: AE1 と小胞体蛋白質との相互作用 (第 85 回日本生化学会大会 2012. 12. 16. マリンメッセ福岡、福岡県)
2. 宮園 耕介、新敷 信人、大津 航、佐藤 耕太、稲葉 睦. BCL11A の 5' 上流 DNaseI 高感受性領域への結合を介する牛γグロビン遺伝子転写の抑制 (第 85 回日本生化学会大会 2012. 12. 16. マリンメッセ福岡、福岡県)
3. 佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. PDZ ドメイン蛋白質 NHERF-1 と NHERF-2 によるグルタミン酸トランスポーターGLAST の細胞表面発現調節 (第 34 回日本膜学会年会 2012. 5. 8. 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館、東京都)
4. 大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲

葉 睦. 新規 COPII 輸送モチーフ・X・X・は Sec23/Sec24 複合体との結合を介して膜内在性タンパク質の小胞体からの放出を促進する (第 34 回日本膜学会年会 2012. 5. 8. 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館、東京都)

5. 木崎 皓太、富張 瑞樹、大塚 弥生、塚本 卓、新敷 信人、菊川 峰志、出村 誠、大津 航、佐藤 耕太、高桑 雄一、稲葉 睦. 牛α-スペクトリン・アレール SpαBK91 に起因するリピート1の構造異常と赤血球膜物性の変化 (第 34 回日本膜学会年会 2012. 5. 9. 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館、東京都)
6. 王 振吉、佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. アニオン交換輸送体 AE1 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを規定するN末端領域の YXXΦ あるいは YXXXΦ シグナル配列モチーフ. (第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 23. 国立京都国際会館、京都市)
7. 佐藤 耕太、大津 航、大塚 弥生、稲葉 睦. PDZ ドメイン蛋白質 NHERF-1 および NHERF-2 によるグルタミン酸トランスポーターGLAST の細胞表面発現調節. (第 152 回日本獣医学会学術集会 2011. 9. 19. 大阪府立大学、堺市)
8. 王 振吉、大津 航、大塚 弥生、佐藤 耕太、稲葉 睦. アニオン交換輸送体 AE1 の細胞内への輸送を規定する N 末端領域配列の同定 (第 33 回日本膜学会年会 2011. 5. 13. 東京・産業技術総合研究所臨海副都心センター別館 11 階、東京都)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 耕太 (SATO KOTA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：50283974

(2) 研究分担者

稲葉 睦 (INABA MUTSUMI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：00183179