

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 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790808

研究課題名（和文）チモーゲン顆粒膜タンパク質が作動する細胞内物流システムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the transport systems under the control of the zymogen granule membrane proteins

研究代表者

川島 麗（KAWASHIMA REI）

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：70392389

研究成果の概要（和文）：

チモーゲン顆粒膜タンパク質 GP2 の物質輸送の連携のしくみとして、細胞内酵素量およびタンパク質代謝回転の恒常性維持のため、GP2 発現が顆粒分泌を調整することで、余剰なチモーゲン顆粒の細胞内蓄積を制御するメカニズムが働いている可能性が示唆された。GP2 との相互作用タンパク質は、ゴルジ体マーカールおよびオートファジー関連分子である可能性が示唆された。GP2 は、糖鎖修飾機構およびオートファジー物質処理機構に至るまでの連携に関与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

GP2 knockout (-/-) mice were utilized to clarify the mechanisms of the granule formation and exocrine secretion. Our results suggest that zymogen granule accumulation is associated with both the lysosomal dysfunction in the GP2 deficient pancreas under fasted conditions. It has been suggested that GP2 is participated the transport systems for control of the zymogen granule membrane proteins.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：チモーゲン顆粒、メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

GP2 はチモーゲン顆粒膜タンパク質の 40%以上を占める主要タンパク質として存在し、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型の構造をとるため、様々なタンパク質を繋ぎ止める機能を持つ。電子顕微鏡観察により、チモーゲン顆粒膜の裏打ち構造を保って存在することから、GP2 がチモーゲン顆粒の形成や細胞内移動に関与することが予想される。一方で、膵臓腺房細胞株を用いた研究では、GP2 はエンドサイトーシス機構には関与しないという報告もある (Hoops et

al. 1993 *The Journal of Biological Chemistry* 268, 25694-25705、Yu et al. 2004 *Biochemical and Biophysical Research Communication* 322, 320-325)。しかしながら、最近になって GP2 の新たな機能が分かってきた。当研究室が作成した GP2 ノックアウトマウスを用いた共同研究により、消化管のパイエル板 M 細胞に発現する GP2 が細菌受容体として働き、迅速に腸管免疫応答を誘導するというものである (Hase et al. 2009 *Nature* 462, 226-230)。GP2 が細菌と結合し、M 細胞の細胞質小胞内へ運ばれ、直下の免疫系細胞への輸送を行う。

要するに、M 細胞の頂端側で捕獲した細菌を、何らかの輸送システムを経て、側底膜側の免疫系細胞へ渡されるが、その運搬役として GP2 が一役かっていることは想像に難くない。さらに、GP2 はチモーゲン顆粒膜タンパク質のうち最も多い含有量であることから、外分泌機構において意味をなさないタンパク質である可能性は極めて低い。申請者がこれまでにやってきた GP2 ノックアウトマウスを用いた研究により、GP2 の存在の有無が消化酵素であるアミラーゼ量およびその活性に影響を及ぼしていることから（投稿準備中）、GP2 が腺房細胞内のチモーゲン顆粒の生成や移動に関与すると示唆される。

2. 研究の目的

GP2 が膵外分泌機構におけるメンブレントラフィックの機能分子としての役割を持つことを提案し、細胞内 GP2 動態を追跡することによる物質輸送メカニズムの解明を目標に定める。

3. 研究の方法

1) モデル動物の作成

c57BL/6 マウス (WT マウス) および GP2 遺伝子欠損マウスに 1 8 時間絶食を行い、膵臓外分泌誘導モデルを作成した。また EtOH を投与し、アルコール誘導性モデルを作成した。

2) アミラーゼ測定

マウス膵臓組織を採取し、酵素活性法により、アミラーゼ量を測定した。原理として、基質の N3-G5- β -CNP は、アミラーゼによって分解され、G3- β -CNP と G2- β -CNP を生じさせ、共役酵素として添加したグリコアミラーゼによって分解を受け、CNP として小さい発色を 400nm で定量する事でアミラーゼ活性を測定した。

3) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

マウス膵臓組織を採取し、液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。サンプルから RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を得た。エンドサイトーシス関連分子等の遺伝子についてリアルタイム遺伝子発現解析を行った。

4) 一般染色および免疫組織学的染色

採取した膵臓組織を 4% PFA/PBS により固定し、パラフィン切片を作成した。また、一部、凍結切片を作成した。一般染色として HE 染色およびギムザ染色を行った。免疫組織学的染色では、アミラーゼ、ゴルジ体マ

カー関連タンパク質抗体および酵素抗体を一次抗体として用い検出を行った。

5) 免疫沈降法

採取した膵臓組織を Lysis バッファーでホモジナイズし、抗 GP2 抗体にて上清内の GP2 タンパク質および GP2 タンパク質との結合画分を得た。

6) ウェスタンブロッティング法

採取した膵臓組織を Lysis バッファーでホモジナイズし、その上清を使って SDS-PAGE を行った。また、免疫沈降法にて得られた GP2 結合体画分を用いて SDS-PAGE を行った。ゴルジ体マーカーおよびオートファジー関連分子の一次抗体を用いて発現比較検討および結合タンパク質の検出を行った。

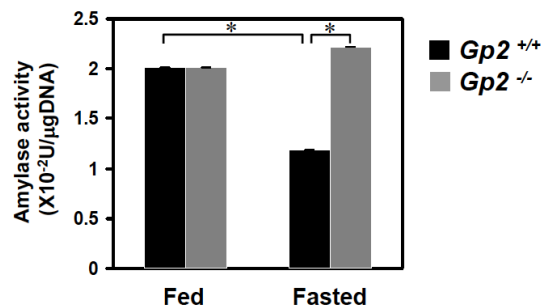
7) 阻害実験

マウスにブレフェルジン A およびイオノフォア系阻害剤を投与し、採取した膵臓組織を用いて mRNA 発現解析、アミラーゼ測定および免疫組織学的染色法により検討を行った。

4. 研究成果

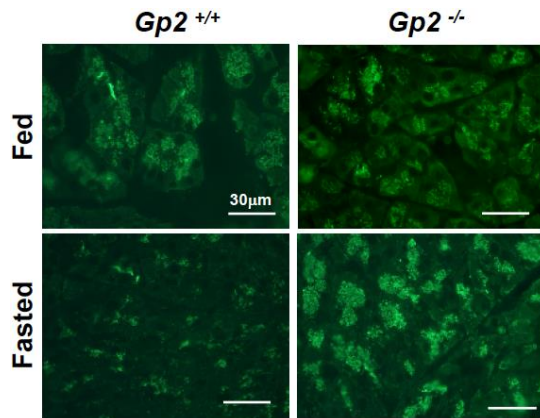
1) アミラーゼ活性測定

野生型マウスと GP2 ノックアウトマウスにおいて、野生型マウスにおいて絶食によるアミラーゼ酵素活性が低下したのに対し、GP2 ノックアウトマウスでは酵素活性低下に対して低反応性を示した。これより、GP2 は、膵臓腺房細胞内酵素分泌量の調節を行っている可能性が示唆された。



2) アミラーゼの免疫組織学的染色

野生型マウスと GP2 ノックアウトマウスにおいて、抗アミラーゼ抗体を用いてアミラーゼの検出を行ったところ、膵臓チモーゲン顆粒においてアミラーゼが検出された。さらに、絶食時、野生型マウスと比較し GP2 ノックアウトマウスにおいて、膵臓チモーゲン顆粒へのアミラーゼの蓄積が見られた。



3) 遺伝子発現解析

膵臓組織において、リアルタイム PCR による消化酵素遺伝子およびエンドサイトーシス関連分子の定量的解析を行ったところ、絶食時、野生型マウスと比較し GP2 ノックアウトマウスにおいて、トリプシノーゲンの遺伝子発現が減少傾向を示した。さらに、ER、trans-Golgi network (TGN)-related proteins および lysosomal proteases の遺伝子発現においても、GP2 欠損下では、絶食時の発現上昇が抑制された。

4) 免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法による GP2 結合タンパク質の検出

GP2 と相互作用するタンパク質を同定するため、絶食および EtOH 投与マウス膵臓組織を用いて、抗 GP2 抗体による免疫沈降法を行った。その後、沈降物に対してゴルジ体マーカーおよびオートファジー関連分子の一次抗体を用いて結合タンパク質の検出を行ったところ、TGN38 および LC3 と特に強い結合を示した。また、阻害剤を用いた実験では、アミラーゼの分泌制御に変動をきたすことから、ゴルジ体における修飾機能および膜結合としての機能に GP2 が調節している可能性が示唆された。

これより、GP2 は、ゴルジ体における糖鎖修飾等のタンパク質分泌機構および細胞内オートファジー物質処理機構に至るまでの連携に関与していると考えられる。

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 3 件)

(1) Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, **Dohi T**. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice—a pathway

associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2011 Dec;141(6):2119-2129.

(2) Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Mizutani N, Okada T, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T. Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy. *J Immunoassay Immunochem*. 2012;33(3):291-301.

(3) Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, Sato N, Kurihara M, Dohi T, Kawamura YI, Ichikawa T, Ishihara K. The monoclonal antibody HCM31 specifically recognises the Sd(a) tetrasaccharide in goblet cell mucin. *FEBS Open Bio*. 2012 Jul 20;2:223-33.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 田中秀樹, 角田修一, 飯田泰広, 川島麗, 五艘行信, 石原和彦, 市川尊文, 栗原誠: ヒト唾液ムチンに対するモノクローナル抗体の作製 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 2012.12.15.

(2) 川上文貴, 山田雄基, 川島麗, 石原和彦, 市川尊文: 神経軸索伸長制御における LRRK2 によるタウのリン酸化の生理的役割 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 2012.12.15.

(3) 山田雄基, 川上文貴, 川島麗, 市川尊文: Leucin-rich repeat kinase 2 (LRRK2) による p53 のリン酸化の生理的役割に関する解析 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 2012.12.15.

(4) REI KAWASHIMA, YUKI I. KAWAMURA, TOMOYUKI OSHIO, TERUKI HAGIWARA, TOSHIHIKO OKADA, KYOKO INAGAKI-OHARA, PING WU, SUZANNE SZAK, YUTAKA J. KAWAMURA, FUMIO KONISHI, OKI MIYAKE, HIDEAKI YANO, TAKAFUMI ICHIKAWA, YUKIO SAITO, LINDA C. BURKLY and TAEKO DOHI: TWEAK/Fn14 pathway mediates IL-13-induced intestinal epithelial cell death 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸 2012.12.5.

(5) 山田雄基, 川上文貴, 嶋山ひとみ, 川島麗, 市川尊文: Leucin-rich repeat kinase 2 (LRRK2) による p53 経路の調節機構に関する解析 第 25 回北里大学バイオサイエンスフォーラム, 東京 2012.8.2.

(6) 川島麗, 土肥多恵子, 河村由紀, 川上

文貴, 市川尊文: IL-13 による消化管粘膜傷害における TWEAK/Fn14 経路の関連性
The 40th Meeting of the Japanese Society of Ulcer Research ミニワークショップ「IBD・炎症/サイトカイン」, 東京 2012.7.14.

(7) 川島麗, 川上文貴, 石原和彦, 市川尊文: 急性膵炎におけるオートファジー機構と Glycoprotein 2 の関連性 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京 2012.4.20.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 麗 (KAWASHIMA REI)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号: 7 0 3 9 2 3 8 9