

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790209

研究課題名(和文)カチオンポンプによる核貪食性細胞死の誘導メカニズムと病態生理機能の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism and pathophysiology of nucleophagy induced by cation pump

研究代表者

藤井 拓人(FUJII, Takuto)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50567980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトATP13A4が誘導するヌクレオファジーの分子メカニズムおよび病態生理機能を明らかにすることを目的として研究を遂行した。ヒトATP13A4は、イオン輸送機能を持たず、N末領域が関与する機能によりヌクレオファジーを誘導することを見出した。他方、マウスATP13A4は、カチオン輸送機能を有しており、ヌクレオファジーを誘導しなかった。また、DNAマイクロアレイおよびプロテオミクスを用いた網羅的解析において、ヒトATP13A4により誘導されるヌクレオファジーの関連候補分子を同定した。特に、ヒトATP13A4発現細胞において、タンパク質分解やストレス応答に関与するタンパク質の発現が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：In this research, the molecular mechanism and pathophysiology of nucleophagy induced by human ATP13A4 were examined. We found that human ATP13A4 had no ion-transporting function and its N-terminal region was essential for induction of nucleophagy. On the other hand, mouse ATP13A4 had cation-transporting function and did not induce nucleophagy. Related proteins for the ATP13A4-induced nucleophagy were identified by DNA microarray and proteomics. Especially, increased expression levels of proteins involved in proteolytic system and cellular stress response were observed in human ATP13A4-expressing cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学 細胞 細胞死 P型ATPase オートファジー ヌクレオファジー

## 1. 研究開始当初の背景

P 型カチオン ATPase は、ATP の加水分解エネルギーにより細胞膜を介した能動輸送を行なう膜貫通型タンパク質である。ATP13A4 は、10 回膜貫通型タンパク質で、P 型カチオン ATPase に特徴的なリン酸化サイトや ATP 結合ドメインを持つことから、P 型カチオン ATPase ファミリーに分類されている。しかし、これまで ATP13A4 の生理機能について研究は進んでおらず、輸送基質もわかっていない。

申請者らは、ヒト ATP13A4 を様々な哺乳類由来細胞株に過剰発現させると、ヒト ATP13A4 は、核近傍において凝集体を形成すること、ヒト ATP13A4 発現細胞において、核の変形および消失が引き起こされることを見出した。ヒト ATP13A4 の形成する凝集体において、オートファジー関連タンパク質も凝集していたことから、ヒト ATP13A4 の過剰発現により、オートファジーの関与する核貪食性細胞死、すなわちヌクレオファジーが誘導される可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト ATP13A4 がヌクレオファジーを駆動する分子メカニズムおよび ATP13A4 の病態生理機能を明らかにすることで、新しい細胞死の仕組みを分子レベルで解明することを目的とした。また、ヒトとマウスの ATP13A4 の局在、イオン輸送能およびヌクレオファジー誘導能を比較し、動物種の違いによる ATP13A4 機能差異についても検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトおよびマウス ATP13A4 は、胃粘膜組織より調製した RNA から遺伝子クローニングを行い、pcDNA4 (N 末 Xpress タグ付加) および pcDNA6 ベクター (C 末 V5 タグ付加) に組み込んだ。作製した野生型、各種変異体およびヒト-マウスキメラ体を、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞もしくはサル腎臓由来 Cos-7 細胞にトランスフェクションし、一過性に発現させた。

(2) 過剰発現させたヒトおよびマウス ATP13A4 の発現および局在は、抗 Xpress 抗体および抗 V 5 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫細胞染色により検討した。

(3) ヒトおよびマウス ATP13A4 のイオン輸送機能は、種々のカチオン存在下において、各過剰発現細胞より調製した膜フラクションの ATP 加水分解活性を、空ベクタートランスフェクション細胞 (mock 細胞) より調製した膜フラクションの活性と比較することで評価した。

(4) ヒト ATP13A4 過剰発現 HEK293 細胞および mock 細胞より RNA を調製し、ヒト ATP13A4 を発現させることで変動する遺伝子群をマ

イクロアレイ (Human Genome U133, アフイメトリクス社) により網羅的に解析した。

(5) ヒト ATP13A4 過剰発現 HEK293 細胞および mock 細胞において、細胞破碎後に段階的な遠心分離を行うことで核および核近傍のタンパク質分画 (核サンプル) を調製した。調製した核サンプルを用いて、プロテオミクス解析を行った。

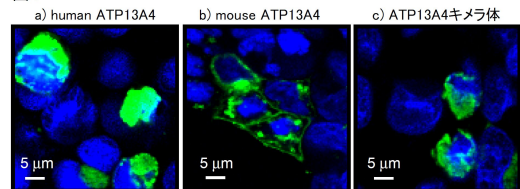
## 4. 研究成果

(1) ヒトおよびマウス ATP13A4 の細胞内分布およびヌクレオファジー誘導能の検討

マウス ATP13A4 をクローニングし、HEK293 細胞および Cos-7 細胞に過剰発現させた。核近傍に凝集体を形成しヌクレオファジーを引き起こすヒト ATP13A4 (図 1a) とは異なり、マウス ATP13A4 は、主に原形質膜および小胞体に分布していた (図 1b)。次に、ビオチンラベルした細胞表面のタンパク質を、アビジンビーズを用いて単離し、ウェスタンブロット解析を行った。マウス ATP13A4 発現細胞のビオチン化サンプルにおいて ATP13A4 由来のバンドが検出されたが、ヒト ATP13A4 発現細胞のビオチン化サンプルにおいてバンドは検出されなかった。

次に、ヒトとマウスの ATP13A4 のアミノ酸配列を比較し、相同性の低い部位において変異体を作製した。各種変異体を HEK293 細胞に過剰発現させ局在解析を行なったところ、ヒト ATP13A4 の N 末領域においてヌクレオファジー誘導に重要な部位が存在することを見出した。また、マウス ATP13A4 の N 末領域 (493 アミノ酸配列) をヒト ATP13A4 の配列に変えたキメラ体を作製し、HEK293 細胞に過剰発現させた。キメラ体は、ヒト ATP13A4 と同様に核近傍に凝集し、ヌクレオファジーを誘導した (図 1c)。以上より、マウスとヒトの ATP13A4 は高い相同性を有するが、細胞内分布およびヌクレオファジー誘導能が異なっていることが明らかとなった。

図1



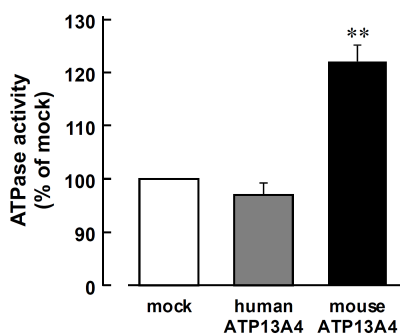
緑色はATP13A4、青色はDAPI(核)の染色を示す

(2)ヌクレオファジー誘導における ATP13A4 のイオン輸送機能の関与についての検討

マウスおよびヒト ATP13A4 において、120 mM Na<sup>+</sup>, 15 mM K<sup>+</sup>, 20 μM Ca<sup>2+</sup>存在下における ATP 加水分解活性を測定した。マウス ATP13A4 過剰発現細胞では mock 細胞に比べて有意な活性上昇が見られたのに対し、ヒト ATP13A4 過剰発現細胞の活性は、mock 細胞と有意な差は見られず、ATP13A4 のイオン輸送機能は種

間で異なっていた(図2)。また、イオン輸送過程の高エネルギーリン酸化中間体形成に重要なアスパラギン酸残基をグルタミン酸に変異させたヒト ATP13A4 (D486E) 変異体を過剰発現させた細胞においても、ヌクレオファジーの誘導が観察された。従って、ヒト ATP13A4 はイオン輸送活性を持たず、N 末領域の関与する機能がヌクレオファジー誘導に関与しているものと考えられた。他方、マウス ATP13A4 は、他の P 型 ATPase と同様にイオン輸送機能を有していることが明らかとなった。

図2



### (3) ヌクレオファジー関連分子の探索

ヒト ATP13A4 を過剰発現させることで変動する遺伝子群を、DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、2 倍以上発現上昇する遺伝子として約 70 種類、減少する遺伝子として約 120 種類を見出した。上昇する遺伝子としては、ストレス応答に関与している熱ショックタンパク質 HSP70 等が顕著であり、オートファジー関連分子 ATG4 などの上昇も見られた。他方、減少する遺伝子としては、クロモソームやポリメラーゼ等の核酸機能に重要な遺伝子群が顕著であり、これはヌクレオファジーによる核の消失を反映しているものと考えられた。また、水チャネルや亜鉛輸送体 (SLC30) も減少していた。

次に、核近傍の凝集体においてヒト ATP13A4 と共役しヌクレオファジー誘導に関与する分子を同定するために、ヒト ATP13A4 もしくは空ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞から調製した核サンプルを用いて網羅的プロテオミクス解析を行った。ヒト ATP13A4 過剰発現細胞において、ユビキチンプロテアソーム系タンパク質および種々のタンパク質分解酵素の発現が顕著に増加していた。また、マイクロアレイの結果と同様に、熱ショックタンパク質の発現も上昇していた。

以上の網羅的解析により、ヒト ATP13A4 によるヌクレオファジー誘導メカニズムに、タンパク質分解系の異常な亢進が関与している可能性が示唆された。また、熱ショックタンパク質の発現上昇は、ヒト ATP13A4 の異常な凝集体形成に対するストレス応答によるものと考えられた。

### (4) 総括

本研究により、これまで未解明であった ATP13A4 の細胞内分布および機能が明らかとなった。ATP13A4 の機能が動物種によって異なることは非常に興味深い知見であると思われる。特にヒト ATP13A4 は、核近傍に異常に凝集し、ヌクレオファジーを誘導することから、異常凝集タンパク質の蓄積が発症原因であるとされる神経変性疾患などの病態と関連している可能性が考えられる。網羅的解析においてヌクレオファジー誘導に重要な関連分子の絞込みに成功したことから、本研究の遂行により、ヌクレオファジーを起動する分子メカニズムの全容解明に向けた研究基盤を構築できたものと考えられる。

### 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 5 件)

(1) Takahashi Y., Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Higuchi T., Tabuchi Y., Sakamoto H., Naito I., Manabe K., Uchida S., Sasaki S., Ikari A., Tsukada K., Sakai H. Functional coupling of chloride-proton exchanger ClC-5 to gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biol. Open*. 査読有, Vol. 3, 2014,12-21. doi: 10.1242/bio.20136205.

(2) Shimizu T., Fujii T., Takahashi Y., Takahashi Y., Suzuki T., Ukai M., Tauchi K., Horikawa N., Tsukada K., Sakai H. Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A<sub>2</sub>-induced colonic cancer cell proliferation. *Pflugers Arch*. 査読有, Vol. 466, 2014, 541-548. doi: 10.1007/s00424-013-1341-x.

(3) Fujii T., Awaka SY., Takahashi Y., Fujita K., Tsuji H., Shimizu T., Gomi T., Tsukada K., Sakai H. Modulation of H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett*. 査読有, Vol. 587, 2013, 3898-3905. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.030.

(4) Shimizu T., Iehara T., Sato K., Fujii T., Sakai H., Okada Y. TMEM16F is a component of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 査読有, Vol. 304, 2013, C748-C759. doi:10.1152/ajpcell.00228.2012.

(5) Fujita K., Fujii T., Shimizu T.,

Takeguchi N., Sakai H. Role of cholesterol in functional association between K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter-3a and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, Vol.424, 2012, 136-140. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.089.

〔学会発表〕(計 21 件)

(1) 藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. 胃壁細胞頂端膜における ERp57 の機能. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27 日-30 日. 熊本市総合体育館 (熊本県熊本市)

(2) 藤井拓人, 阿波加隼也, 清水貴浩, 塚田一博, 酒井秀紀. ERp57 up-regulates gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity independently of its chaperoning function. 第 91 回日本生理学会大会. 2014 年 3 月 16 日-18 日. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)

(3) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 強心配糖体による癌細胞特異的な細胞増殖抑制機構. 生体制御・創薬研究ワークショップ in 鹿児島. 2014 年 3 月 15 日. プラザN ヴァリエホール (鹿児島県鹿児島市)

(4) 洞口拓也, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀. 機械刺激応答に関与する細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストア. 日本薬学会北陸支部. 第 125 回例会. 2013 年 11 月 17 日. 北陸大学薬学部アネックスファーム (石川県金沢市)

(5) 齋藤知里, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀. 胃プロトンポンプ活性に対する Cl<sup>-</sup>チャンネル阻害薬の効果. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 2013 年 11 月 17 日. 北陸大学薬学部アネックスファーム (石川県金沢市)

(6) 船山佳佑, 藤井拓人, 清水貴浩, 酒井秀紀. 低濃度ウアバインによる癌細胞増殖抑制機構の解明. 日本薬学会北陸支部 第 125 回例会. 2013 年 11 月 17 日. 北陸大学薬学部アネックスファーム (石川県金沢市)

(7) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. ウアバインによる癌細胞増殖抑制の早期シグナルとしての容積感受性アニオンチャンネル活性化. 第 35 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2013 年 11 月 21 日-22 日. 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区)

(8) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 受容体型ナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャンネルの機能連関による癌細胞増殖制御メカニズム. 2013 年度 生理学研究所研究会「上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構」. 2013 年

8 月 26 日-27 日. 自然科学研究機構 生理学研究所 (愛知県岡崎市)

(9) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 酒井秀紀. 癌細胞における非イオン輸送型 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase と容積感受性外向き整流性アニオンチャンネル VSOR との機能連関. 第 8 回トランスポーター研究会年会. 2013 年 6 月 15 日-16 日. 熊本大学薬学部 (熊本県熊本市)

(10) 藤井拓人, 船山佳佑, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. ナトリウムポンプ阻害剤の抗癌メカニズムにおける容積感受性外向き整流性アニオンチャンネル(VSOR)の役割. 日本薬学会第 133 年会. 2013 年 3 月 27 日-30 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(11) 藤井拓人, 高橋佑司, 藤田恭輔, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. Chloride-proton antiporter CIC-5 is functionally associated with gastric proton pump. 第 90 回日本生理学会大会. 2013 年 3 月 27 日-29 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(12) 皆川拓磨, 藤井拓人, 清水貴浩, 田淵圭章, 竹口紀晃, 酒井秀紀. ヒト肝癌細胞 GLUT3 のウアバインによるトラフィック制御. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012 年 11 月 18 日. 富山大学 (富山県富山市)

(13) 藤次温子, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. 膜刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇の 2 つの機構. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012 年 11 月 18 日. 富山大学 (富山県富山市)

(14) 二谷章大, 藤田恭輔, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. 胃酸の Cl<sup>-</sup>分泌実体としての SLC26A9 の可能性. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012 年 11 月 18 日. 富山大学 (富山県富山市)

(15) 本領智, 藤井拓人, 小泉桂一, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. 大腸癌細胞におけるナトリウムポンプの病態生理機能. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012 年 11 月 18 日. 富山大学 (富山県富山市)

(16) 玉井泰光, 藤井拓人, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. P5-ATPase による新規細胞死誘導メカニズム. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会. 2012 年 11 月 18 日. 富山大学 (富山県富山市)

(17) 藤田恭輔, 清水貴浩, 藤井拓人, 竹口紀晃, Ursula Seidler, 酒井秀紀. マウス胃酸分泌細胞における SLC26A7 の機能. 第 59 回中部日本生理学会. 2012 年 11 月 16 日-17 日. 自然科学研究機構 (愛知県岡崎市)

(18) 藤井拓人, 藤田恭輔, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞における分子シャペロン ERp57 の発現と機能. 第 59 回中部日本生理学会. 2012 年 11 月 16 日-17 日. 自然科学研究機構 (愛知県岡崎市)

(19) 藤田恭輔, 藤井拓人, 高橋佑司, 清水貴浩, 竹口紀晃, 酒井秀紀.  $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$  交換輸送体 CIC-5 と胃  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能連関. 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2012 年 11 月 15 日-16 日. 京都大学 (京都府京都市)

(20) Sakai H., Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takeguchi N. Association of CIC-5  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  exchanger with  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase. The 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC). 2012 年 10 月 12 日-13 日. 京都府立医科大学 (京都府京都市)

(21) Fujii T., Funayama K., Fujita K., Shimizu T., Honryo A., Takeguchi N., Sakai H. Association of non-pumping sodium pump with volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in human cancer cells. The 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer (ISPDC). 2012 年 10 月 12 日-13 日. 京都府立医科大学 (京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 拓人 (FUJII, Takuto)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教  
研究者番号 : 50567980

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :