

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460304

研究課題名(和文)容積感受性アニオンチャンネル活性における細胞内ATP要求性の分子的機構の解明

研究課題名(英文)The role of cytosolic ATP in VSOR channel activity

研究代表者

赤塚 結子 (Ando-Akatsuka, Yuko)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：90321611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞容積調節能は、動物細胞の生存に必須である。低浸透圧刺激後の細胞に見られる調節性容積減少(RVD)においては、容積感受性アニオンチャンネル(VSOR)の機能が不可欠である。最近我々は、VSORの抑制性調節分子であるABCF2と γ -アクチニン-4(ACTN4)との相互作用が、RVDに影響することを報告した。VSORチャンネル活性には細胞内ATPが必要であるが、本研究では、その作用点がABCF2である可能性を検討した。その結果、ATPとACTN4へのABCF2の結合能には相関が見られ、細胞内ATPはACTN4とABCF2の相互作用を調節することでVSORチャンネル活性を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Volume regulation is fundamental mechanism for animal cells. By the exposure to hypotonic stimulation, cells show the regulatory volume decrease (RVD) to efflux osmotically obligated water, which is accomplished by the efflux of K^+ and Cl^- . A volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- -channel (VSOR) plays a major role in RVD, and it shows cytosolic ATP dependence. Recently, we reported that a swelling-enhanced interaction between γ -actinin-4 (ACTN4) and ABCF2 prevents ABCF2 from suppressing VSOR activity and results in the facilitation of RVD. ABCF2 has nucleotide binding domains. So, we studied the possibility that ABCF2 is involved in the requirement of cytosolic ATP for the VSOR activity. With point mutants of ABCF2, we investigated their affinity to ATP and ACTN4 and found that ABCF2 with higher affinity to ATP has higher ability to bind with ACTN4. From these results, we considered cytosolic ATP effects on the interaction between ACTN4 and ABCF2 and modifies VSOR channel activity.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：調節性容積減少(RVD) ABCF2 γ -アクチニン-4 容積感受性アニオンチャンネル(VSOR) 細胞内ATP

1. 研究開始当初の背景

硬い細胞壁を持たない動物細胞は、細胞内外の環境における浸透圧変化に常に曝され自らの容積を容易に変化させるが、それを元に戻す能力を備えている。低浸透圧暴露を受けて膨らんだ細胞容積が等浸透圧下の正常容積に戻る過程は、調節性容積減少 (Regulatory volume decrease: RVD) と呼ばれ、数種類のチャネルと細胞内情報伝達系が活性化された後、 K^+ と Cl^- チャネルが開口し、 KCl が流出することで生じた浸透圧変化によって、細胞内の余分な水が細胞外に排出され達成される。特に Cl^- の流出口は、低浸透圧刺激を受けて細胞の容積が増大した時に開口するチャネルであることより容積感受性アニオンチャネル (volume-sensitive outwardly rectifying: VSOR) と呼ばれている。本チャネルは細胞死を含む様々な生理的現象に関わることが報告されているにもかかわらず、研究開始当時、未同定であった。現在候補蛋白質が報告されているが、低浸透圧刺激後の細胞容積調節を司る分子基盤は今も不明な点が多い。研究代表者はこの VSOR の分子同定を試みる過程で、VSOR の調節タンパク質として ATP-binding cassette (ABC) タンパク質スーパーファミリーに属する ABCF2 を同定した。ABCF2 は膜貫通領域を欠く細胞質型の ABC タンパク質であるが、ATP 結合領域を 2 か所 (NBD1 及び NBD2) 持っている VSOR の抑制性の調節因子である。また、研究代表者は ABCF2 がアクチン結合タンパク質である γ -アクチニン-4 (ACTN4) と結合すること、ACTN4 は RVD を亢進させる方向に働くことを見出した。さらに、両者の結合能力が低浸透圧刺激後に高まることも明らかにしており、それによって VSOR を負に調節するタンパク質である ABCF2 は VSOR から離れやすくなり、RVD が亢進することが考えられる。

この両者の相互作用に、細胞内 ATP はどのような影響を及ぼすのか。また、VSOR の電流は細胞内 cAMP の増加で有意に増大することが分かっているので、細胞内 cAMP によってこの相互作用は修飾されるのか。本研究では、低浸透圧刺激後の細胞容積調節機構における細胞内 ATP の役割を明らかにすることにより、細胞容積調節メカニズムとその分子基盤のさらなる解明を目指す。

2. 研究の目的

低浸透圧刺激後の細胞容積調節の過程に必須である VSOR のチャネル活性は、細胞内 ATP の加水分解を伴わない結合に大きく依存することがわかっているが、その具体的な分子基盤は不明である。研究代表者が同定した VSOR の抑制性調節因子 ABCF2 には ATP 結合領域が 2 か所あり、細胞内 ATP の作用点が ABCF2 である可能性が考えられる。また、ABCF2 と ACTN4 の相互作用が RVD を調節していることも明らかとなっている。本研究は、ABCF2 と

ACTN4 との相互作用に ATP がいかに関わるかを検討し、VSOR チャネル活性における細胞内 ATP の役割を分子レベルで解明することを目的とする。また、低浸透圧刺激後に活性化される細胞内情報伝達系によって、ATP は cAMP に変換されることも示されている。細胞内 cAMP 濃度の上昇が ABCF2 と ACTN4 との相互作用に及ぼす影響を検討することによって cAMP の供給源としての ATP の役割も明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

野生型 ABCF2 は、低浸透圧刺激下で ACTN4 との結合能が亢進することが分かっているが、NBD1 と NBD2 の LSGGQ モチーフ内のグリシンをアスパラギン酸に置換した点突然変異体である G232D と G520D では、同様の現象が見られるかどうかを検討した。HEK293T 細胞に FLAG タグ付 ACTN4 と HA タグ付 G232D 又は HA タグ付 G520D を共発現させ、低浸透圧刺激を加えた細胞と加えない細胞に分けて膜分画を抽出し、界面活性剤で可溶化した後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降 (オーバーナイトインキュベーション) を行った。免疫沈降後の flow through も回収し、免疫沈降に用いた膜分画の可溶化液の 1/10 量の input、免疫沈降物、flow through を同時にウエスタンブロットティングに供した。1 次抗体として抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて検出した。検出したバンドの intensity を測定し、沈降した ACTN4 タンパク質量に対する共沈 (結合) した ABCF2 タンパク質量を求めて標準化し、その値を、低浸透圧刺激なし、ありで統計的に比較した。

次に、HEK293T 細胞に HA タグを付した野生型、G232D、G520D の 3 種類の ABCF2 を発現させ、2 分間低浸透圧刺激を加えた後抽出した膜分画を界面活性剤で可溶化し、FLAG タグ付 ACTN4 及び ATP への結合実験を行った。ACTN4 は、抗 FLAG 抗体と架橋しているビーズに固定化させたものを、ATP はアガロースに架橋されている市販の ATP アガロースを用いた。両実験に用いた膜分画の可溶化液は、同日に調整されたものである。ACTN4 結合実験では、ACTN4 を固定化したビーズにそれぞれの ABCF2 の膜分画の可溶化液を投入して室温で 2 時間浸透した後、ビーズを洗浄し SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加えて熱処理したものを、膜分画の可溶化液の 1/10 量の input、及び flow through とともにウエスタンブロットティングに供した。1 次抗体として抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて検出した。検出したバンドの intensity を測定し、あらかじめビーズに固定した ACTN4 タンパク質量に対する結合したそれぞれの ABCF2 タンパク質量を求めて標準化し、その値を、野生型、G232D、G520D の間で統計的に比較した。ATP 結合実験では、同じ volume の ATP アガロースに上記の各 ABCF2 膜分画の可溶化液を投入し、25 で 1 分、または 10 分インキュベ

ーションした後、即座に ATP アガロースを洗浄し、SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加えて熱処理を行った。これらのサンプルを膜分画の可溶化液の 1/20 量の input とともにウエスタンブロッティングに供し、抗 HA 抗体を用いて検出した。検出したバンドの intensity を測定し、input 中のそれぞれの ABCF2 のどれくらいが ATP アガロースに結合したのかを % intensity として求め、野生型、G232D、G520D の間で統計的に比較した。

研究代表者は、の免疫沈降実験を行う過程で、G232D と G520D の低浸透圧刺激後の細胞内での挙動が野生型と異なることに気付いた。野生型は、低浸透圧刺激が加わると膜分画の界面活性剤可溶、不溶の両分画において ABCF2 量が増えることが分かっている。つまり、細胞質に存在する ABCF2 が低浸透圧刺激後に細胞膜直下へ移動してくるのであるが、G232D と G520D においては、界面活性剤不溶分画の量的な変化が見られなかった。この点をさらに詳しく検討するために、HA を付した野生型、G232D、G520D を発現させた HEK293T 細胞を、低浸透圧刺激を加えないもの、及び 2 分間、20 分間、30 分間の低浸透圧刺激を加えたものに分けて膜分画を抽出した。これを界面活性剤に可溶性分画と不溶性分画に分け、等量のタンパク質をウエスタンブロッティングに供した。1 次抗体として抗 HA 抗体と抗カベオリン-1 抗体を用いて検出を行い、検出したバンドの intensity を測定し、カベオリン-1 タンパク質量に対するそれぞれの ABCF2 タンパク質量を求めて標準化し、その値を、低浸透圧刺激なし、ありで統計的に比較した。

さらに、cAMP の影響を検討するために、FLAG タグを付した ACTN4 と HA タグを付した ABCF2 を共発現させた HEK293T 細胞の膜分画を、ジブチル cAMP、フォルスコリン、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン) 存在下に抽出し、界面活性剤可溶と不溶の分画に分けたものと、細胞質分画を用いて、ACTN4 と ABCF2 の結合能の変化を免疫沈降法により定量的に検討した。本実験には 2 分間と 30 分間の低浸透圧刺激を細胞に加えた。コントロールとして、上記の細胞から溶媒のみ (エタノール、H₂O、DMSO) の存在下で抽出した膜分画と細胞質分画を用いた。抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、沈降後の flow through も回収し、免疫沈降に用いた膜分画の可溶化液の 1/10 量の input、免疫沈降物、flow through を同時にウエスタンブロッティングに供した。1 次抗体として抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて検出した。検出したバンドの intensity を測定し、沈降した ACTN4 タンパク質量に対する共沈 (結合) した ABCF2 タンパク質量を求めて標準化し、その値を、コントロール (溶媒のみで cAMP 添加なし) の膜分画と細胞質分画を用いて免疫沈降を行ったものと統計的に比較した。

4. 研究成果

ACTN4 と変異体 ABCF2 (G232D 及び G520D) を共発現させた HEK293T 細胞を用いた定量的免疫沈降実験では、ACTN4 とそれぞれの変異 ABCF2 との結合能は低浸透圧刺激によって有意に亢進しており、野生型と同様な結果となった。これにより、野生型、G232D、G520D の三者間における ACTN4 に対する結合能を同時に比較する必要が生じた。

ACTN4 への結合実験を行った結果、G520D の結合能は界面活性剤可溶・不溶の両膜分画で、また G232D の結合能は界面活性剤不溶の膜分画で野生型よりも有意に高いことが分かった。さらに ATP への結合実験でも、G520D が、界面活性剤可溶・不溶の両膜分画において 1 分と 10 分のインキュベーション時間で結合能が野生型より有意に亢進していることがわかった。また G232D は、界面活性剤不溶分画において 10 分間インキュベーションすると野生型よりも結合能の亢進が見られた。これにより、ABCF2 の ATP 結合能と ACTN4 への結合能は相関することが示され、ATP 結合能が高いほど ACTN4 に対する結合力が増すことが示唆された。

低浸透圧刺激下での ABCF2 の挙動に関して、細胞質から細胞膜直下への移動を検討した結果、野生型は界面活性剤可溶・不溶の両分画において ABCF2 タンパク質量が有意に増えたのに対して、G232D と G520D では界面活性剤不溶の分画において ABCF2 タンパク質量の増加は見られなかった。界面活性剤不溶の膜分画は、細胞骨格が密な細胞膜直下を反映していると考えられるため、低浸透圧刺激を受けた細胞内の G232D と G520D は、細胞質から細胞骨格が密な細胞膜へは移動しにくいことが示された。ATP 結合能が野生型よりも高い G232D と G520D はその立体構造や大きさが変化していると考えられるため、細胞骨格によって密に裏打ちされている細胞膜の部分への ABCF2 の移行を可能にする立体構造の調節に ATP が関わる可能性が示唆された。

cAMP を添加した細胞を用いた定量的免疫沈降実験の結果、cAMP 濃度の上昇は、界面活性剤可溶の膜分画において、ABCF2 と ACTN4 の相互作用を有意に亢進させることがわかった。この現象は、細胞質分画や界面活性剤不溶の膜分画においては見られなかった。

以上の結果より、VSOR チャネル活性における細胞内 ATP の役割として、

低浸透圧刺激後の ABCF2 と ACTN4 の相互作用を亢進させることで VSOR チャネルの開閉状態を続きやすくさせる。

ABCF2 と結合することによって、ABCF2 が細胞質から細胞骨格によって密に裏打ちされている細胞膜 (界面活性剤不溶の膜分画) へ移動しにくくなり、ABCF2 の VSOR チャネル抑制効果を減少させる。

低浸透圧刺激後の細胞内情報伝達系の活性化によって cAMP に変換され、界面活性剤

可溶の膜分画における ABCF2 と ACTN4 の相互作用を亢進させることで VSOR チャネルの開閉状態を維持する。

ということが、考えられた。

VSOR チャネル活性は、細胞死に関わることが明らかになっていることから、本チャネル活性を制御するメカニズムの解明は、細胞死を防ぐという観点からも重要である。本研究は VSOR チャネル活性における細胞内 ATP の役割を初めて分子レベルで解明した意義深いものである。

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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤塚 結子 (AKATSUKA, Yuko)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号: 9 0 3 2 1 6 1 1

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: