

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461026

研究課題名(和文) 外分泌顆粒膜動態から追跡するオートファジー制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of autophagy mechanisms to tracking from exocrine secretory granule membrane

研究代表者

川島 麗 (Kawashima, Rei)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：70392389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓腺房細胞のチモーゲン顆粒膜に特異的に発現するタンパク質Glycoprotein2 (GP2)が細胞内のオートファジー機構を調節するのかを明らかにすることで、未だその全容が明らかにされていないオートファジー機構を解明することを目的とした。GP2ノックアウトマウスを用いた実験により、膵臓外分泌消化酵素アミラーゼの分泌、オートファゴソーム膜形成関連タンパク質発現およびER小胞体形成関連タンパク質発現がGP2の有無によってコントロールされていることが明らかになった。結論として、オートファジーが起こる過程において、ER膜からの膜成分供給の時点でGP2分子の制御がかかる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal whether the glycoprotein2 (GP2) that expressed in zymogen granule membrane of pancreatic acinar cells control the autophagy mechanism. Experiments using GP2 knockout mice, the secretion of pancreatic exocrine digestive enzymes amylase, autophagosomal film forming related protein expression and ER endoplasmic reticulum formed related protein expression were found to have been controlled by the presence or absence of GP2. In conclusion, in the process of autophagy occurs, it was considered to be GP2 molecule relevant at the time of the ER membrane provided.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵臓 GP2 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) オートファジーについて

オートファジーの役割は、飢餓状態を生き抜くために自己消化することで栄養源を確保すると理解されるが、通常的环境下でもプロテアソーム系と並んで細胞成分の代謝系として機能する細胞の生存維持活動である。細胞が飢餓条件下におかれると、隔離膜と呼ばれる扁平な小胞が細胞質を取り込みながら伸長し、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームに包み込まれた内包物はリソソームと融合することで分解され、分解後に得られたアミノ酸は栄養源として再利用される。オートファジー経路は、各ステップでオートファジー関連遺伝子群(ATGs)が制御しながら順調に進行していく。一方で、隔離膜がどのように出現するのかは長らく未解明のままであったが、最近になって、隔離膜の由来は小胞体(ER)であるという事象がもたらされた(Hamasaki et al. 2010 *FEBS Letters* 584, 1296-1301)。この発見は、オートファジー機構全容解明に向けて加速度を増したが、次に解明すべき点は、飢餓などのストレス情報をどのようにして小胞体に伝えるのか、さらに、何をきっかけにして膜成分が供給されるのかという点であろう。また、オートファジーは細胞内で取り込んだ空間をまるごと消化するため、バルク分解系と呼ばれている。このような自己の大規模消化は細胞にとっては危険な作業であることから、オートファジーの進行は厳密に制御されているはずである。チモーゲン顆粒が細胞内に溜まり始めると、開口分泌の準備と同時にオートファジー誘導に対する何らかのシグナルが送られているはずであり、逆に、何の刺激を受けずとも小胞体から定常的に隔離膜成分が生み出されているとなると、あまりにも非効率である。

### (2) Glycoprotein2 (GP2)

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 (glycosylphosphatidyl inositol) 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が膜ソーティン

グ機能を持ち合わせていると予想される。また、アミラーゼのパッケージングシグナルはGP2のポリペプチド部位に位置していることや(Colomer et al. 1994 *The EMBO Journal* 13, 3711-3719)、GPIアンカー型構造がタンパク質輸送における小胞体離脱の細胞間接着を制御していること(Chen et al. 1999 *The Journal of Cell Biology* 144, 687-699)、さらに、申請者がこれまでに行ってきた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を変化させ、チモーゲン顆粒の蓄積を引き起こしていることから、細胞の危機的状況からの救出作戦となるオートファジーの膜合成過程においてGP2が何らかの制御を行っていると考えられる。

## 2. 研究の目的

膵臓腺房細胞のチモーゲン顆粒膜に特異的に発現するタンパク質Glycoprotein2 (GP2)が膵臓腺房細胞におけるオートファジー隔離膜形成の制御分子としての役割を持つと仮説を立て、未だその全容が明らかになっていないオートファジー機構の一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 絶食モデル作製および試料採取

GP2<sup>+/+</sup>およびGP2<sup>-/-</sup>を18時間絶食群と対照群(自由摂食群)とに分けた。18時間絶食群は代謝ケージに入れ、絶食を行った。水のみ自由摂取可能な状態にて実験開始まで飼育した。絶食期間は実験前日の午前7時から当日の午前1時までとした。一方、対照群は通常ケージにて、飼料及び水が自由摂取可能な状態にて実験開始まで飼育した。

それぞれのマウスは頸椎脱臼によって安楽死させ、腹部を切開し膵臓を摘出した。

### (2) $\alpha$ -Amylase 活性測定

膵臓組織 Extract をサンプルとして、アミラーゼ量を $\alpha$ -Amylase測定キット(キッコマン株式会社、野田)を用いて測定した。

### (3) Western blot analysis

摘出した膵臓は 3 mL/g pancreas weight の Lysis buffer に入れ、ハサミで膵臓を細切後、超音波破碎を行いホモジェナイズした。4  $\square$ 、14,500 rpm で 15 分間遠心し上清 (Extract) を取り、タンパク質濃度を BCA 法 (Pierce, USA) により測定した。

Extract は 2  $\times$  SDS sample buffer と等量で混ぜることでタンパク質濃度 10  $\mu$ g/ $\mu$ l に調製し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

SDS-PAGE 用サンプル (30  $\mu$ g protein/lane) は 10% (p62, Beclin 1) 15% (LC3) のポリアクリルアミドゲルにアプライし、定電流 37 mA で泳動した。泳動後、ゲルを PVDF メンブレンに転写した。転写後は、メンブレンを 4  $\square$ で一晩ブロッキング (1% Skim milk - TBST) を行い、室温にて 1 時間一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、メンブレンを TBST で 3 回リンス、5 分  $\times$  2 回洗浄した。二次抗体反応を室温にて 1 時間を行った後、同様に洗浄し、Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) と反応させ、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, USA) を用いてシグナルを検出した。

### (4) RT-PCR

摘出した膵臓を Trizol reagent により Total RNA を抽出し、逆転写反応により、cDNA を合成した。各種オートファジー関連タンパク質のプライマーを設計し、SYBR Green 酵素を用いて、リアルタイム PCR を行った。解析は、18srRNA の値で補正した。

## 4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡観察により、正常なマウスでは絶食時にチモーゲン顆粒がオートファゴソームに取り込まれ、分解されることは過去の文献により確認されている。

また、アミラーゼはチモーゲン顆粒内に含まれる主要な消化酵素であり、チモーゲン顆粒のマーカーである。そのため、GP2<sup>-/-</sup>における膵臓内に存在するアミラーゼ量の絶食に伴う変化を調べるた

めに、膵臓内アミラーゼ量を計測した。

その結果、GP2<sup>+/+</sup>では絶食に伴い有意に減少したが、GP2<sup>-/-</sup>では絶食による減少が抑制した (図 1)。これは、当研究室の先行研究と同様の結果であった。

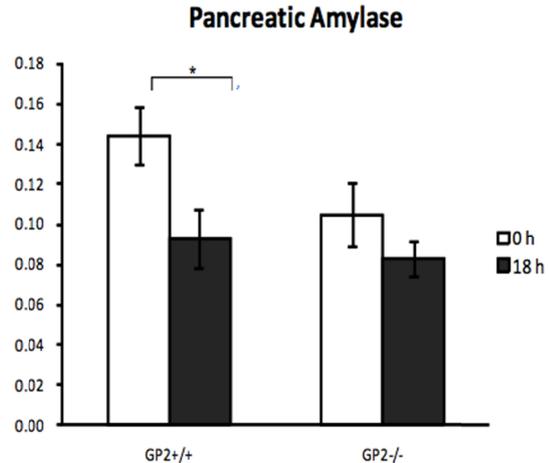


図 1 膵臓アミラーゼ量の比較

(2) Western blot の結果、オートファジー関連タンパク質 LC3-II のタンパク質発現量は、GP2<sup>+/+</sup>では絶食に伴い有意に増加したが、GP2<sup>-/-</sup>では絶食による増加が抑制された (図 2)。

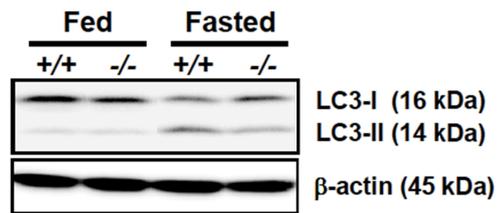
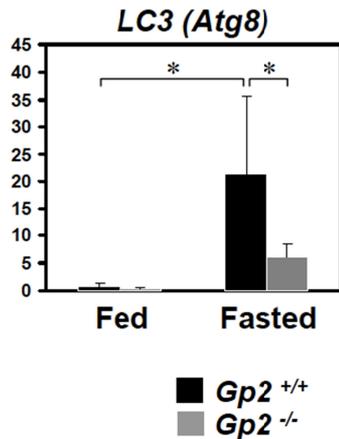


図 2 膵臓 LC3-II タンパク質発現量の比較

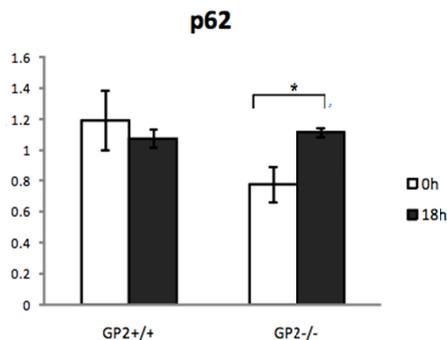
(3) また、LC3 の発現自体においても遺伝子レベルで制御があるかを調べるため、リアルタイム PCR により LC3 の mRNA 発現を比較したところ、LC3 mRNA 発現量は、GP2<sup>+/+</sup>では絶食に伴い有意に増加したが、GP2<sup>-/-</sup>では絶食による増加が抑制された (図 3)。これは、ウエスタンブロットの結果と相関しており、GP2 がオートファジー関連タンパク質の mRNA 発現から制御し、

さらに、タンパク質の LC3-II フォームへの修飾をもコントロールする可能性が示唆された。



**図3 肝臓 LC3-mRNA 発現量の比較** (縦軸：mRNAexpression)

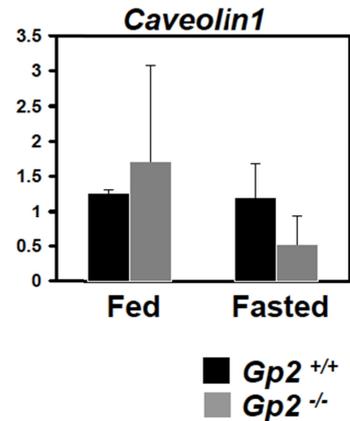
- (4) また、オートファゴソーム膜供給に関連する Beclin1 の mRNA 発現は、LC-3 の結果と同様の動きを示した (Data not shown)。これより、オートファゴソーム膜成分の調達の時点で GP2 が関与する可能性が示唆された。
- (5) オートファジーによって選択的に分解される p62 タンパク質発現が、絶食下の GP2 ノックアウトマウス肝臓において増加した (図4)。したがって、GP2 を欠損させると、オートファジーによる細胞内成分の分解を滞らせる可能性が考えられた。



**図4 肝臓 p62 タンパク質発現量の比較**

- (6) ER 小胞体形成関連タンパク質カベオ

リン1発現を解析したところ、GP2 欠損下において発現が抑制されることから、ER 膜からの膜成分供給の時点で GP2 分子の制御がかかる可能性が示唆された (図5)。



**図5 肝臓 Caveolin1 mRNA 発現量の比較** (縦軸：mRNAexpression)

以上、本研究により、飢餓など細胞が危機的状況になると、GP2 がオートファジーの膜合成、供給、形成過程に関連し、その機能制御を行っている可能性が考えられ、これまでその全てが解明されていなかったオートファジー機構において、GP2 分子がその一端を担っていることが明らかになった。

## 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7件)

1. Kawashima R, Fujimaki M, Ikenoue Y, Danjo K, Koizumi W, Ichikawa T. Influence of an elemental diet on 5-fluorouracil-induced morphological changes in the mouse salivary gland and colon. Support Care Cancer. 2016 Apr;24(4):1609-16. doi: 10.1007/s00520-015-2947-7. Epub 2015 Sep 23. (査読有)
2. Kawashima R, Kawakami F, Maekawa T, Yamamoto H, Koizumi W, Ichikawa T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. Cancer

- Chemother Pharmacol. 2015 Aug;76(2):269-77. doi: 10.1007/s00280-015-2790-z. Epub 2015 Jun 6. (査読有)
3. Kawamura YI, Adachi Y, Curiel DT, Kawashima R, Kannagi R, Nishimoto N, Dohi T. Therapeutic adenoviral gene transfer of a glycosyltransferase for prevention of peritoneal dissemination and metastasis of gastric cancer. *Cancer Gene Ther.* 2014 Oct;21(10):427-33. doi: 10.1038/cgt.2014.46. Epub 2014 Sep 12. (査読有)
  4. Dohi T, Kawashima R, Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Amatucci A, Michaelson J, Burkly LC. Pathological activation of canonical nuclear-factor  $\kappa$ B by synergy of tumor necrosis factor  $\alpha$  and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis. *Cytokine.* 2014 Sep;69(1):14-21. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.001. Epub 2014 May 27. (査読有)
  5. Yokoyama T, Nakamura S, Horiuchi E, Ishiyama M, Kawashima R, Nakamura K, Hasegawa K, Yagishita S. Late onset GM2 gangliosidosis presenting with motor neuron disease: an autopsy case. *Neuropathology.* 2014 Jun;34(3):304-8. doi: 10.1111/neup.12088. Epub 2013 Dec 20. (査読有)
  6. Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Hagiwara T, Mizutani N, Okada T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Matsukawa A, Haga T, Kakuta S, Iwakura Y, Hosokawa S, Dohi T. Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages. *PLoS One.* 2014 Apr 8;9(4):e94445. doi: 10.1371/journal.pone.0094445. eCollection 2014. (査読有)
  7. Kawakami F, Shimada N, Ohta E, Kagiya G, Kawashima R, Maekawa T, Maruyama H, Ichikawa T. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates tau phosphorylation through direct activation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *FEBS J.* 2014 Jan;281(1):3-13. doi: 10.1111/febs.12579. Epub 2013 Nov 28. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. 川上文貴、川島麗、前川達則、他 1 名 パーキンソン病原因分子 LRRK2 と p53 の相互作用とリン酸化 MBM2015 2015 年 12 月 1 日 (ポスター発表) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  2. 川島麗、雲井利亮、曾根曆美、他 5 名 5-FU 起因性消化管粘膜傷害において成分栄養剤が生体防御機構に与える影響 MBM2015 2015 年 12 月 1 日 (ポスター発表) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  3. 山下博徳、前川達則、川島麗、他 4 名 神経細胞 LRRK2 を介する腸管上皮細胞調節機構の解析 MBM2015 2015 年 12 月 1 日 (ポスター発表) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  4. 津島博道、前川達則、川島麗、他 4 名 消化管運動における LRRK2 の機能解析 MBM2015 2015 年 12 月 1 日 (ポスター発表) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  5. 合田瑞紀、飯田泰広、川島麗、他 5 名 ラット唾液ムチンを認識するモノクローナル抗体の作製 MBM2015 2015 年 12 月 1 日 (ポスター発表) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  6. 山下博徳、前川達則、川島麗、他 5 名 腸管神経 LRRK2 を介する腸管上皮細胞調節機構の解析 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2015 年 8 月 6 日 (口頭発表) 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市)
  7. 津島博道、山下博徳、川島麗、他 4 名 消化管運動における LRRK2 の機能解析 第 28 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2015 年 8 月 6 日 (口頭発表) 北里大学相模原キャンパス (神奈川県相模原市)
  8. 小坂裕、飯田泰広、川島麗、五艘行信、石原和彦、市川尊文、栗原誠 ラット小腸ムチン分子種を認識するモノクローナル抗体 第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 15 日 (ポスター発表) 国立京都国際会館 (京都府京都市)
  9. 川島麗、雲井利亮、菅原節子、前川達則、

川上文貴、石原和彦、市川尊文  
5-Fluorouracil 起因性消化管粘膜傷害  
に対する成分栄養剤の効果 第 87 回日  
本生化学会 2014 年 10 月 15 日(ポスタ  
ー発表)国立京都国際会館(京都府京都  
市)

10. 川上文貴、川島麗、前川達則、嶋山ひとみ、石原和彦、市川尊文 LRRK2 による GSK-3β の活性化を介したタウのリン酸化調節 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11 日(ポスター発表)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
11. 小坂裕、白玉洋平、飯田泰広、川島麗、五艘行信、石原和彦、市川尊文、栗原誠 ラット小腸ムチンに対するモノクローナル抗体の作製 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11 日(ポスター発表)パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
12. 丸山弘子、黄純聰、川島麗、木村武俊、吉永恵子、加原卓一、仲野隆久 わかめの脂肪代謝に及ぼす影響についての検討 第 12 回日本応用藻類学会 2013 年 5 月 15 日 日本海洋大学楽水会館(東京都港区)
13. Dohi T, Kawashima R. TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis and fibrosis mediated by IL-13-TSLP axis. IMMUNOLOGY 2013 May 3 2013 Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)

## 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・講師  
研究者番号：70392389

### (2)研究分担者

市川 尊文(ICHIKAWA Takafumi)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：30245378

川上 文貴 (KAWAKAMI Fumitaka)  
北里大学・医療衛生学部・講師  
研究者番号：50511896