

報告番号	甲栄第 211 号
------	-----------

論文内容要旨

氏名	宇都宮 健郎
----	--------

題目	An Intracellular Fragment of Osteoactivin Formed by Ectodomain Shedding Translocated to the Nucleoplasm and Bound to RNA Binding Proteins (オステオアクチビンのシェディング機序とその生理作用)
----	--

オステオアクチビンは廃用性筋萎縮や大理石骨病、肝硬変など組織の線維化に関係する疾病で発現増大する I 型膜蛋白質である。我々の研究室では、マイクロアレイ解析により微小重力環境に供したラット骨格筋でもオステオアクチビン発現が亢進していることを明らかにした。しかしながら、オステオアクチビンがどのような生理機能を有しているのかは不明なままである。

多くの I 型膜蛋白質は細胞膜上でプロテアーゼによる分解 (シェディング) を受け活性型となる。本研究では、まず膜結合型オステオアクチビンが細胞外に分泌される N 末断片と細胞内に残る C 末断片として存在することを示した。このことからオステオアクチビンは細胞膜に発現した後、細胞内外の 2 つの断片に開裂を受けていることが示された。つぎに、オステオアクチビン C 末断片 (OA-CTF) のアミノ酸配列分析法によりオステオアクチビンの開裂部位を同定した。結果、2カ所で開裂を受けていることがわかった。1つは 499 番目のアルギニンと 500 番目のアラニンの間で、これはオステオアクチビンの細胞膜表面の領域に存在することから、この場所でシェディングを受けている事が示された。もう1つは 505 番目のロイシンと 506 番目のイソロイシンの間で、これは細胞膜貫通部であった。I 型膜蛋白質の細胞外領域での開裂に関わる酵素として A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) などが報告されているが、オステオアクチビンの開裂部位が細胞表面と膜内の両方に存在したことから、膜貫通領域内での切断を担う γ -secretase もオステオアクチビンの開裂に関与することが示唆された。次に、OA-CTF の局在を免疫染色により検討した。OA-CTF は主に核内に存在し、小胞体内にも存在が認められた。さらに、細胞の各分画における OA-CTF の存在を検討した結果においても、核分画に OA-CTF の存在が認められた。以上のことから、OA-CTF はシェディングを受け放出された後、核へ移行することが示唆された。次に、OA-CTF を強発現させた細胞の核蛋白質を回収し、核内で OA-CTF が結合する蛋白質の同定を試みた。LC-MS/MS 解析により OA-CTF と共沈してきたタンパク質の同定をおこなった結果、Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) と Splicing factor, arginine/serine-rich 9 (SFRS9) が OA-CTF と結合する事を見いだした。さらに、GST-pull-down assay により SFRS9 と hnRNPA1 が OA-CTF と結合する事を確認した。そして、SFRS9 のほうが hnRNPA1 よりも強く OA-CTF と結合する事が示された。これらの蛋白質は、mRNA のスプライシング等に関わる蛋白質であるので、OA-CTF は、これらの蛋白質と結合し、mRNA のスプライシングを制御している可能性が示唆された。

以上の結果より、オステオアクチビンは坐骨神経切除による不動や微小重力などの機械的ストレスに応答して発現増大し、さらに、細胞膜表面と細胞膜貫通部において細胞外分泌断片と細胞内断片に開裂を受けることがわかった。細胞外断片は MAPK 経路を介し、主に線維芽細胞の matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) や I 型コラーゲン発現を増大し (既発表)、細胞内断片は、核や小胞体に移行し、SFRS9 や hnRNPA1 などのスプライシング因子と結合することで mRNA の成熟に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲栄第 211 号 氏名 宇都宮 健郎
審査委員	主査 武田 英二 副査 寺尾 純二 副査 宮本 賢一

題 目

An Intracellular Fragment of Osteoactivin Formed by Ectodomain Shedding Translocated to the Nucleoplasm and Bound to RNA Binding Proteins
(オステオアクチビンのシェディング機序とその生理作用)

著 者

Kenro UTSUNOMIYA, Kanako OWAKI, Yuushi OKUMURA, Momoko YANO, Takahiro OTO, Eri SUZUKI, Seiko TAMURA, Tomoki ABE, Shohei KOHNO, Ayako OHNO, Katsuya HIRASAKA, Shigetada TESHIMA-KONDOH, and Takeshi NIKAWA

2012年12月発行 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
第76巻第12号 2225~2229 ページに発表済

要 旨

オステオアクチビンは廃用性筋萎縮や大理石骨病、肝硬変など組織の線維化に関係する疾病で発現増大するI型膜蛋白質である。これまでに、マイクロアレイ解析により微小重力環境に供したラット骨格筋でもオステオアクチビン発現が亢進していることが明らかになっている。しかしながら、オステオアクチビンがどのような生理機能を有しているのかは不明なままである。

多くのI型膜蛋白質は細胞膜上でプロテアーゼによる分解(シェディング)を受け活性型となる。本研究では、まず膜結合型オステオアクチビンが細胞外に分泌されるN末断片と細胞内に残るC末断片として存在することを示した。このことからオステオアクチビンは細胞膜に発現した後、細胞内外の2つの断片に開裂を受けていることが示された。つぎに、オステオアクチビンC末断片(OA-CTF)のアミノ酸配列分析法によりオステオアクチビンの開裂部位を同定した。結果、2カ所で開裂を受けていることがわかった。1つは499番目のアルギニンと500番目のアラニンの間で、これはオステオアクチビンの細胞膜表面の領域に存在することから、この場所でシェディングを受けている事が示された。もう1つは505番目のロイシンと506番目のイソロイシンの間で、これは細胞膜貫通部であった。I型膜蛋白質の細胞外領域での開裂に関わる酵素としてA Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM)などが報告されているが、オステオアクチビンの開裂部位が細胞表面と膜内の両方に存在したことから、膜貫通領域内での切断を担う γ -secretaseもオステオアクチビンの開裂に関与することが示唆された。次に、OA-CTFの局在を免疫染色により検討した。OA-CTFは主に核内に存在し、小胞体内にも存在が認められた。さらに、細胞の各分画におけるOA-CTFの存在を検討した結果においても、核分画にOA-CTFの存在が認められた。以上のことから、OA-CTFはシェディングを受け放出された後、核へ移行することが示唆された。次に、OA-CTFを強発現させた細胞の核蛋白質を回収し、核内でOA-CTFが結合する蛋白質の同定を試

みた。LC-MS/MS 解析により OA-CTF と共沈してきたタンパク質の同定をおこなった結果、Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) と Splicing factor, arginine/serine-rich 9 (SFRS9) が OA-CTF と結合する事を見いだした。さらに、GST-pull-down assay により SFRS9 と hnRNPA1 が OA-CTF と結合する事を確認した。そして、SFRS9 のほうが hnRNPA1 よりも強く OA-CTF と結合する事が示された。これらの蛋白質は、mRNA のスプライシング等に関わる蛋白質であるので、OA-CTF は、これらの蛋白質と結合し、mRNA のスプライシングを制御している可能性が示唆された。

本研究は、坐骨神経切除による不動や微小重力などの機械的ストレスに応答して発現増大したオステオアクチビンが、細胞膜表面と細胞膜貫通部において細胞外分泌断片と細胞内断片に開裂を受けることを明らかにし、細胞内断片は、核や小胞体に移行し、SFRS9 や hnRNPA1 などのスプライシング因子と結合することで mRNA の成熟に関与していることを示唆したもので、博士（栄養学）の学位授与に値するものと判定した。