

氏名・(本籍)	まつ ぎき ひろ し 松 崎 洋 吏 (千葉県)		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第1536号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)		
学位論文題目	Tespal is a novel component of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and affects mitochondrial calcium flux (Tespal は MAM と呼ばれるミトコンドリアとそれに接触する特殊な小胞体からなる領域の新規構成分子であり、ミトコンドリアへのカルシウム流入に関与する)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	白 澤 専 二
	(副 査) 福岡大学	教授	井 上 隆 司
	福岡大学	教授	岩 本 隆 宏
	福岡大学	准教授	喜 多 紗 斗 美

## 内 容 の 要 旨

### 目的

細胞内Ca<sup>2+</sup>は、多くの生物学的プロセスを制御する普遍的なセカンドメッセンジャーである。細胞内小器官の一つである小胞体はCa<sup>2+</sup>を貯蔵する役割を有しており、IP<sub>3</sub>R (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) は小胞体膜上でカルシウム遊離チャネルとして機能している。

Tespal (thymocyte-expressed, positive selection-associated gene 1) は、近年胸腺のT細胞分化に重要な役割を担う遺伝子として同定されたが、我々は、TespalがTおよびBリンパ球で非常に強く発現され、物理的にIP<sub>3</sub>Rのアミノ末端部位と相互作用することを報告している。[Matsuzaki et al. 2012] 小胞体とミトコンドリアはMAM (mitochondria-associated ER membranes) と呼ばれる接触部位を経て相互作用することが知られており、MAMを通じた小胞体からミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>シグナリングの重要性が示唆されているが、この領域におけるカルシウム輸送の正確な分子機構は解明されていない。

そのため、我々はMAMにおけるTespalとIP<sub>3</sub>Rの間の相互作用が、Ca<sup>2+</sup>シグナリングに何らかの役割を有している可能性を考慮し、その正確な分子機構と機能的な関連を解明することを目的とした。

## 方法と結果

### Jurkat 細胞株における Tespal の細胞内局在

我々は、ヒト急性T細胞性白血病細胞株である Jurkat 細胞株で Tespal が IP<sub>3</sub>R サブタイプ3 (IP<sub>3</sub>R3) とよく共局在していることを以前報告しており [Matsuzaki et al. 2012]、Tespal が MAM 領域に局在し、IP<sub>3</sub>R3 の調節を通して小胞体からミトコンドリアへのカルシウム流入の調節因子として機能する可能性があると仮定した。

Jurkat 細胞における小胞体と Tespal の二重免疫染色では、Tespal は大多数の小胞体とは局在が一致せず、一部分の小胞体と共局在していた。

対照的にミトコンドリアと Tespal の二重免疫染色では、Tespal はミトコンドリアの非常に近くに局限していた。

これらの結果は、Tespal が Jurkat 細胞においてミトコンドリアの非常に近くにある特殊な小胞体に存在することを示している。

### Tespal ノックダウンにおける細胞内Ca<sup>2+</sup>動態

Tespal が細胞内カルシウム輸送に関与するかどうかを明らかとするために、TCR (T cell receptor) 刺激によって誘発される細胞内Ca<sup>2+</sup>動態を Ca<sup>2+</sup> イメージング法で検証し Tespal のノックダウン効果を検討した。

Ca<sup>2+</sup> イメージングは、細胞内Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブである Rhod-2 (ミトコンドリア)、Fluo4 (細胞質) をそれぞれ Jurkat 細胞にローディングし、BD FACSCalibur with CellQuest software (BD Biosciences 社) で測定し、FlowJo software (Tree Star) で解析を行った。

TCR 刺激後のミトコンドリア内の Ca<sup>2+</sup> 流入の総量はコントロールと比較して2種類の siRNA による Tespal ノックダウンによりそれぞれ60%と73%に減少した。

さらに、細胞質の Ca<sup>2+</sup> 流入の総量はコントロールと比較し Tespal ノックダウン細胞でそれぞれ82%と83%に減少した。

これらの結果は、Tespal が TCR 刺激によって誘発される小胞体からの Ca<sup>2+</sup> の細胞質への放出とミトコンドリアへの流入に必要であることを示し、優先してミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入に影響することを示唆した。

### Tespal の MAM における局在

Tespal が MAM の構成分子に関与する可能性を検討するために、MAM 関連タンパク質である GRP75 (glucose-regulated protein 75) とミトコンドリア外膜タンパク質である VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1) との関係性を共免疫沈降法で検討した。

HEK293 細胞に HA タグをつけた Tespal と、FLAG タグを付けた GRP75 もしくは VDAC1 をダブルトランスフェクションした。抗HA抗体による共免疫沈降では、FLAG タグをつけた VDAC1 タンパク質とは会合は無かったが、FLAG-GRP75 と HA-Tespal の会合を明らかにした。

同様に、抗FLAG抗体による共免疫沈降は、FLAG-VDAC1 とは会合しなかったが、HA-Tespal と FLAG-GRP75 の会合を明らかにした。さらに、HA-Tespal と FLAG-GRP75 の二重免疫染色では、Tespal は GRP75 と部分的に局在が一致していた。

これらの結果は、Tespal が物理的に GRP75 と相互作用する MAM の構成分子であることを示唆した。

## 結論

本研究において、IP<sub>3</sub>R と相互作用する Tespal がミトコンドリアの非常に近くに局在し、Jurkat 細胞において TCR 刺激により誘導されるミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入に関与することを示した。

また、Tespal は物理的に MAM 関連タンパク質である GRP75 と相互作用することを明らかにした。

これらの結果は、Tespal が MAM 領域で IP<sub>3</sub>R の調節を通して小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 輸送に関与しているということである。

本論文は Tespal が MAM の新しい構成分子で、小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入を調整していることを証明した最初の報告であり、Tespal の役割の正確な理解は、細胞内プログラムと免疫関連疾患のより良好な理解を導くものと考えられる。

## 審査の結果の要旨

本論文は、Tespal (thymocyte-expressed, positive selection-associated gene 1) が、MAM (mitochondria-associated ER membranes) と呼ばれる小胞体とミトコンドリアの膜間領域における新しい構成分子で、小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入を調整していることを証明した最初の報告である。申請者は以前に Tespal が T および B リンパ球で非常に強く発現され、物理的に小胞体上の IP<sub>3</sub>R (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) のアミノ末端部位と相互作用することを報告しているが [Matsuzaki et al. 2012]、その機能的役割については明らかとなっていなかった。

そのため申請者は、本論文において IP<sub>3</sub>R と相互作用する Tespal が小胞体の中でもミトコンドリアに非常に近い小胞体に局在し、Jurkat 細胞において T 細胞受容体刺激により誘導されるミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入に関与することを示し、さらに Tespal が MAM 関連タンパク質である GRP75 (glucose-regulated protein 75) と物理的に相互作用することを明らかにした。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性は以下のとおりである。

### 1. 斬新さ

T 細胞の分化に重要な役割を担う Tespal が、小胞体の中でもミトコンドリアに非常に近い小胞体に局在し、近年注目されている MAM 領域において MAM 関連タンパク質 GRP75 と相互作用すること、IP<sub>3</sub>R を介した小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入に関与することを明らかとしたのは初めてである。

### 2. 重要性

MAM 領域については Ca<sup>2+</sup> シグナリングや脂質輸送、エネルギー代謝、アポトーシスなど細胞生存に関わる重要な役割があることが近年注目されているが、詳細なメカニズムについては未だ不明な部分が多い。Tespal は胸腺における T 細胞の分化に重要なタンパク質であることが報告されているが、本論文において Tespal が MAM の新規構成分子で IP<sub>3</sub>R を介したミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流入に関与することが明らかとなり、細胞内プログラムと免疫関連疾患のより良好な理解を導くものと考えられる。

### 3. 実験方法の正確性

本研究に使用した細胞株は既に確立されたもので、カルシウムイメージング法や免疫染色法についても実験手法としてこの分野において確立されている。また、複数回の実験において再現性のある信憑性の高い結果であり、実験方法の正確性は保たれているものと考えられる。

### 4. 表現の明瞭性

本論文は、peer review を受けた英文原著であり、すでに Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に掲載されている。審査公聴会におけるプレゼンテーションでも正確に用語などの説明がなされた。なお、申請者は以前に Tespal が IP<sub>3</sub>R と会合することを報告しており、今回、Tespal が IP<sub>3</sub>R を介した小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> を調整するとした仮説に基づいて実験を行っている。さらに Tespal が MAM の新規構成分子であることを明らかとしていることから仮説に対する最終的な結論も妥当と判断した。

### 5. 主な質疑応答

学位申請論文の内容の発表の後、以下の質疑応答が審査員から申請者に対し行われた。

Q1: カルシウム指示薬として Rhod-2 を使用しているが、これはミトコンドリアに集積する性質があるものの多少サイトゾルへの影響もあるかと思う。今回のデータでどの程度信頼性があるのか？

A1: Jurkat 細胞で Rhod-2 がミトコンドリア特異的であるかどうかについては、Rhod-2 と、ミトコンドリアのマーカーであるミトトラッカーおよび ATP synthase が免疫染色にて局在が一致することを確認しています。また、過去の論文においても Rhod-2 がミトコンドリアに特異的であることが報告されているためそれにならって実験を行っております。

Q2: 小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出によって導かれる免疫応答は？

A2: 小胞体から放出される Ca<sup>2+</sup> イオンは限られており、Ca<sup>2+</sup> ストアの枯渇を感知して STIM-ORAI の活性化が起こり細胞外からのストア作動性の Ca<sup>2+</sup> 流入が起こります。これによりカルモジュリン、カルシニューリンが活性化され NFAT が核内に移行することで T 細胞においては IL-2 の発現が導かれます。

Q3: Jurkat 細胞は不死化した細胞だが、fresh に採取した正常細胞でも同様のことが起こるのか？

A3: 先に報告されている nature immunology の論文において Tespal 遺伝子欠損マウスの胸腺細胞を用いた実験がなされていますが、細胞質への Ca<sup>2+</sup> 流入が Tespal-KO マウスで減少することが示されていることから、vivo の系においても今回の実験結果と整合していると考えております。

Q4: KRAP と Tespal は局在は一致しているのか？

A4: そもそも両者の発現する組織が KRAP は一部を除いて全身の組織にユビキタスに発現が見られますが、Tespal は免疫細胞特異的であるためまずそこが異なります。免疫細胞において両者の局在が一致するかは確認はしておりません。

Q5: 無刺激の状態の Jurkat 細胞で Tespal の局在を免疫染色で示しているが、TCR 刺激によって Tespal の局在などが変わる可能性はないのか？

A5: 当研究室より Tespal についても 1 報論文が出ており、その中で、Tespal がストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入による細胞質の Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇により翻訳後修飾によるリン酸化が起こることが示されています。ただしその場合でも IP<sub>3</sub>R との会合は保たれていたため基本的な分子間構造は保たれているも

のと思われます。

Q6: Tespal と GRP75 の局在が一致するという免疫染色のデータで、細胞の辺縁領域で一致していることだがこの意味は？

A6: この実験系は両者ともに過剰発現させて免疫染色した実験であるため、正確な細胞内局在を表しているというよりは、主には両者の生化学的な会合があることを示しているデータとなります。

Q7: Tespal は小胞体とミトコンドリアのテザリングとして機能しているのか、それとも IP<sub>3</sub>R の活性制御を行っているのか？

A7: おそらくは両方の機能があるものと思われます。IP<sub>3</sub>R を介した機能については今回の論文で Tespal ノックダウンで小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 流出障害が細胞質、ミトコンドリア両方で生じることを明らかとしています。MAM については小胞体とミトコンドリアの距離が変わることでアポトーシスやオートファジーの経路を導くと言われていることから、GRP75 と Tespal が会合することで MAM の距離を調整していることが考えられますが、このことについては証明は出来ておりません。

Q8: 今回示している Jurkat 細胞の Ca<sup>2+</sup> の結果は、nature immunology の結果と比較してどうなのか？また、これから導かれる表現型としては何かあるのか？

A8: 基本的には整合する結果であると思います。先の論文では胸腺細胞での Fluo-4 を用いた実験で Tespal-KO マウスで Ca<sup>2+</sup> 流入が減少することを示しているものの、そのメカニズムについては明らかになっていませんでした。今回我々が示したデータについても Ca<sup>2+</sup> については同様の結果が得られ、さらに IP<sub>3</sub>R を介したメカニズムについて明らかとしたことでこの理由付けが出来たものと思っております。表現型については Tespal-KO マウスでは T 細胞のポジティブセレクションの障害が起こることが示されております。

Q9: Tespal は IP<sub>3</sub>R からの Ca<sup>2+</sup> の放出以外に、IP<sub>3</sub>R の制御について何か他の機能があるのでは？

A9: ホモロジーとなる KRAP の研究データで、トリチウムでラベルした IP<sub>3</sub> が IP<sub>3</sub>R に結合する能力を調べた実験があり、それではコントロールと KO で差がみられませんでした。おそらく Tespal におきましても同じ機能を有していると考えられますので、IP<sub>3</sub> の結合能には影響はないと思われます。

以上のように、審査員との間で様々な質疑応答がなされたが、申請者は適切に応答していた。

本論文の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、申請者は学位授与に値すると評価された。