

## 107. エズリンを基軸とする胎児発育制御分子ネットワーク

西村 友宏

慶應義塾大学 薬学部 薬剤学講座

Key words : 胎児発育不全, 胎盤, ネットワーク解析

### 緒言

胎児発育不全は胎児の生命および生後の予後に関わる重篤な病態である。妊娠中期以降に発症する胎児発育不全は胎盤を原因とすることが多いが、現在の発症予測は確率論にすぎない。胎盤において母体-胎児のインターフェースとなる syncytiotrophoblast は層構造を形成する多核化された細胞で、物質輸送の関門機能を担う。生体小分子の経細胞輸送を担う細胞膜トランスポーター群は、胎児成長に必要な物質の輸送速度を調節する重要な因子である。主に物質交換の機能を担うタンパク群に対し、これらのタンパクを制御する司令塔の役割を果たすタンパクを同定するため、スクリーニングした結果、細胞膜タンパクと細胞骨格との連結に関与する ezrin に着目した。これまでに 1) ezrin は特に妊娠中期の胎盤に高発現すること<sup>1)</sup>、2) ezrin 遺伝子欠損マウスが胎児発育不全を起こすこと<sup>2)</sup>、3) ezrin が胎児胎盤系で抗酸化物質である hypotaurine の供給に特異的かつ顕著に関与すること、4) hypotaurine は細胞膜トランスポーター SLC6A13 の新規基質となること、5) ezrin は SLC6A13 の機能を促進することを明らかにした。しかし、ezrin 欠損によりどのように胎児発育不全が発症するかは依然として不明である。したがって、胎児発育不全は複雑な分子機構からなる胎児成長維持の破綻に由来するため、分子機構の単純化を原則とする一般的な仮説立案では、解明できないとの発想の転換に至った。

一方で、個々の遺伝子の機能を解明する研究をシステムティックに集約することにより、非バイアス化された手法で統合的に理解することに取り組んでいる。これまでに、作用点が独立した2つの薬剤の薬力学的相互作用が起こる分子機序を、薬剤の標的遺伝子間の関係性を遺伝子ネットワーク解析による手法で探索し、新規分子機序による相互作用を発表した<sup>3)</sup>。以上の経緯および状況により、胎児発育不全の発症機序を解明するため ezrin を起点とした遺伝子ネットワーク解析を適用することにより、胎児発育不全の俯瞰的理解と治療法の開発を目指す。

裏打ちタンパク質 ezrin をはじめとする ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) family は、C 末端 (C-ERMAD) を介して細胞骨格である F-actin と結合し、N 末端 (FERM ドメイン) を介して、トランスポーター等の膜タンパク質と結合する<sup>4)</sup>。Ezrin によるトランスポーターの機能調節、局在、相互作用は栄養物、代謝物の輸送機構に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では hypotaurine を基質とするトランスポーターである Slc6a13 を含め、胎盤において ezrin と相互作用するタンパク質を明らかにすることを目的とする。

### 方法および結果

#### 1. Ezrin が関与する胎児発育制御分子ネットワークの構築

著者の行う遺伝子ネットワーク解析は遺伝子間の相互反応を、探索元となる遺伝子 (シード遺伝子) と、探索先となる遺伝子 (ターゲット遺伝子) 間を中継する遺伝子群から遺伝子相互作用情報に基づき、広範かつ高精度に推定する手法である。現在では、タンパク-タンパク相互作用、転写調節、リン酸化など、遺伝子相互作用情報は膨大に蓄積されているが、有効活用されていない。対象の病態に関係する候補遺伝子群を中継遺伝子とともに遺伝ネットワーク形成を情報学的に行い、実際には発現の少ないタンパクをネットワークから除去することにより、信頼のあるネットワークとして抽出することが重要である。

Ezrin (遺伝子名 *VIL2*) をシード遺伝子として、胎児発育関連遺伝子をターゲット遺伝子 (濃いグレー) としたときの遺伝子ネットワークが構築された (Fig. 1)。Ezrin は胎児発育不全にも関連する遺伝子群ネットワーク上に位置づ

けられることから、ezrin 欠損マウスが胎児発育不全を呈した機構を推定している可能性がある。一方で、ezrin 欠損マウスで観察されている hypotaurine の動態に関わる分子は本ネットワーク上には位置づけられていない。特に細胞膜タンパクとの相互作用情報が乏しいため、本ネットワークによる胎児発育不全の機構推定を強化するため、実験的にも ezrin と他の分子群との相互作用を検討する必要があると考えられた。

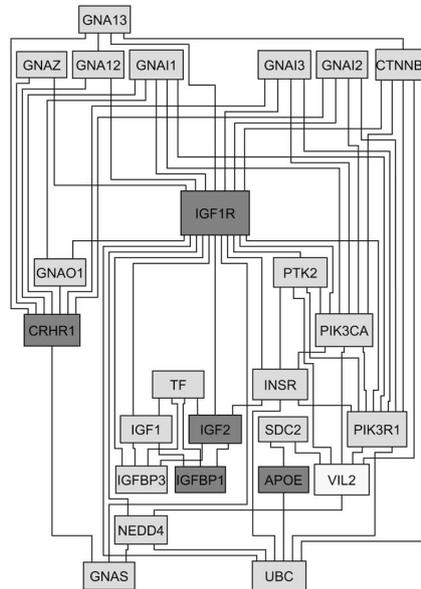


Fig. 1. Estimated Network for VIL2 and Fetal Growth Retardation-related Genes

Ezrin (*VIL2*) is connected to fetal growth retardation-related genes (dark gray) via intermediates (light gray).

## 2. 胎盤細胞において ezrin が相互作用する分子の探索

Ezrin は不活性型である閉環構造からリン酸化を受けて活性型である開環になると N 末端である FERM ドメインが標的タンパクと結合する。本研究では 1) ezrin の FERM ドメインと GST 融合タンパク (pET SUMO vector) を大腸菌を用いて作製し、2) マウス胎盤の粗画分から ezrin 標的タンパクを GSH 結合カラムにより精製、3) SDS-PAGE で western blot にて分画後標的タンパクを検出した。

Ezrin がタンパク相互作用する細胞質タンパクおよび細胞膜タンパクの陽性対照としてそれぞれ NHERF1 および ICAM1 との相互作用を検出した。NHERF1 との相互作用は検出されたものの、ICAM1 との相互作用は検出されなかった (Fig. 2)。

## 3. Ezrin と Slc6a13 との相互作用の検討

Slc6a13 は C 末端 (細胞質内に位置する部分として 40 アミノ酸残基、以下 Slc6a13C-term) に細胞内タンパクとの結合モチーフを有する。Slc6a13C-term と His タグとの融合タンパクを大腸菌にて作製し精製後、ezrin の FERM ドメインとの相互作用を検討した。また ezrin の FERM ドメインとマウス胎盤における Slc6a13 との相互作用を検討した。Slc6a13 の胎盤における発現は western blot にて検出されたものの、Ezrin の FERM ドメインとの相互作用は検出されなかった。また、ezrin の FERM ドメインと Slc6a13C-term との直接的相互作用も検出限界以下であった。

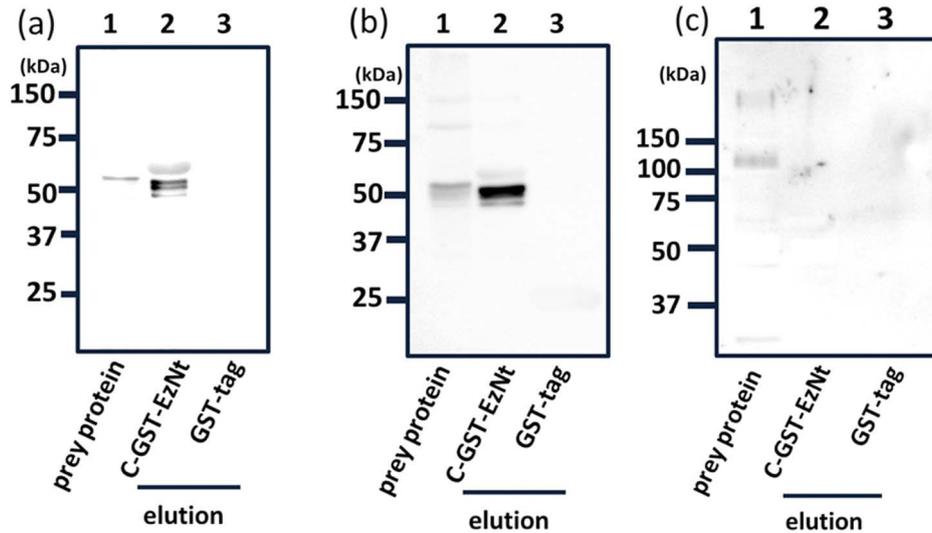


Fig. 2. Interaction of C-GST-Ezrin with NHERF1 and ICAM-1 in Mouse Placental Extracts

Protein interaction between bait and prey proteins was analyzed by a pulldown assay. The assays were performed by using 120  $\mu$ g of C-GST-EzNt or 120  $\mu$ g of GST-tag as bait proteins, and (a, c) 240  $\mu$ g of plasma membrane fraction or (b) 1,640  $\mu$ g of cytosol protein fraction as prey proteins. Protein samples were separated by 10 % SDS-PAGE and detected by western blotting by using NHERF1 rabbit antibody (a, b) (ThermoFisher scientific, PA1-090) or ICAM-1 goat antibody (c) (Sanra Cruz, sc-1511) as primary antibodies, and HRP-conjugated anti-rabbit IgG (a, b) or anti-goat IgG (c) as secondary antibodies. Lane 1, prey protein; Lane 2, 3, concentrated bait-prey elution.

## 考 察

Ezrin が関与する胎児成長不全は著者らによるデータ以外は報告がないため、成長不全の機構は不明である。既知の胎児成長不全に関わる遺伝子群と関わりがある可能性を検証した結果、Fig.1 に示したネットワークの成立が示唆された。しかし、ezrin 遺伝子欠損マウスで観察された hypotaurine の代謝に直接的に関係するネットワークは得られず、ezrin による胎児発育不全の原因が Fig.1 で示されるネットワークの機能不全によるものか、hypotaurine 欠乏によるものかは未解決である。

上述のネットワーク解析における弱点でもある膜タンパクとのタンパク相互作用を実験的に検証するため、ezrin の FERM ドメインとマウス胎盤抽出画分での相互作用の検出を行った。陽性対照実験により細胞質タンパクとの相互作用は検証可能であるものの、細胞膜タンパク質との相互作用は本実験条件では難しいことが示された。Ezrin 遺伝子欠損マウスで示された hypotaurine 欠乏より、ezrin は hypotaurine の輸送担体である Slc6a13 と相互作用が推察されたが、Slc6a13 は膜タンパクであるため、胎盤抽出画分においても ezrin と Slc6a13 との相互作用はやはり検出されず、ezrin と Slc6a13 との相互作用を検出するためには別の実験条件で検討する必要があることが示唆された。Slc6a13 のアミノ酸配列のうち、ezrin と相互作用する部位は不明であるが、FERM ドメインとの相互作用のモチーフと近い配列をもつ C 末端と ezrin との相互作用を検証したが、これも検出されなかった。Ezrin は Slc6a13 と相互作用しない可能性もあるが、ezrin は Slc6a13 と C 末端以外で相互作用する可能性および ezrin は Slc6a13 と間接的に相互作用する可能性も含まれ、さらなる検討が必要である。

本研究により、ezrin が関与する胎児発育不全の遺伝子ネットワークが一部推定された。一方で、ezrin 欠損マウスで観察されている hypotaurine 欠乏の原因の解明には至らなかった。細胞膜タンパクとの相互作用情報を実験的に収集することにより、胎児発育不全の機構がさらに解明されることが期待される。

## 文 献

- 1) Higuchi K, Iizasa H, Sai Y, Horieya S, Lee KE, Wada M, Deguchi M, Nishimura T, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Kose N, Kang YS, Nakashima E. Differential expression of ezrin and CLP36 in the two layers of syncytiotrophoblast in rats. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(8):1400-6. PubMed PMID: 20686238.
- 2) Nishimura T, Higuchi K, Sai Y, Sugita Y, Yoshida Y, Tomi M, Wada M, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Soga T, Nakashima E. Fetal growth retardation and lack of hypotaurine in ezrin knockout mice. *PLoS One.* 2014 Aug 21;9(8):e105423. doi:10.1371/journal.pone.0105423. eCollection 2014.
- 3) Zhao S, Nishimura T, Chen Y, Azeloglu EU, Gottesman O, Giannarelli C, Zafar MU, Benard L, Badimon JJ, Hajjar RJ, Goldfarb J, Iyengar R. Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med.* 2013 Oct 9;5(206):206ra140. doi: 10.1126/scitranslmed.3006548.
- 4) Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):276-87. doi: 10.1038/nrm2866. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Sep;11(9):674.