

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18510

研究課題名(和文)小胞体ストレスで発動するDerlin-3の分子機能と細胞保護効果の解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of cell protective function of Derlin-3

研究代表者

樋口 由佳(江浦由佳)(Eura, Yuka)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30443477

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)は、小胞体内腔に生じた構造異常タンパク質を分解除去することで、細胞の恒常性維持に寄与する。本研究では、小胞体ストレスで発動するDerlin-3に注目して、その機能の重要性を探る解析を実施した。低酸素ストレスに晒すと、Derlin-3欠損マウス、およびDerlin-3と複合体を形成するHerp欠損マウスが脆弱性を示すこと、さらに、両マウスに心機能異常があることを発見した。その原因の一端として、Herpが心臓において細胞内シグナル伝達を制御するIP3レセプターの量を調節している事実を突き止めた。

研究成果の概要(英文):ER-associated degradation (ERAD) contributes to the maintenance of cellular homeostasis by degrading and eliminating structurally abnormal proteins generated in the endoplasmic reticulum. In this study, we focused on Derlin-3 whose expression is induced by endoplasmic reticulum stress and analyzed the importance of its function. In the in vivo experiments using hypoxic conditions, we found that Derlin-3 deficient mice exhibited the survival vulnerability. Herp (a protein forming an ERAD complex with Derlin-3)-deficient mice also exhibited the vulnerability. We also found that these mice have functional abnormalities in their hearts. Our findings that Herp controls the level of IP3 receptor, an intracellular signal transduction protein in the heart, may partly explain the cardiac abnormalities of Derlin-3 and Herp deficient mice.

研究分野: cell biology

キーワード: ERAD ER stress Derlin-3 Herp

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌タンパク質や膜タンパクの合成と成熟を担っており、その過程では酸化ストレスや低酸素状態など様々な理由で正常に成熟できない不良タンパク質が生じる。小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) は小胞体を持つタンパク質の品質管理機構であり、小胞体膜や内腔に生じた構造異常タンパク質 (ERAD 基質) を分解除去する。ERAD は、ERAD 基質の認識、小胞体内腔から細胞質への逆輸送、細胞質のプロテアソームによる分解という 3 つの過程からなる [Nat Cell Biol 7, 766 (2005)]。本研究が対象とする Derlin-3 を含む Derlin ファミリー (Derlin-1, -2, -3) タンパク質は、この過程に関与すると考えられており、そのほかに Herp、HRD1、p97 などが共に関与する [Biochim Biophys Acta 1808, 925 (2011)]。各因子の分子機能の研究が精力的に進められており、Derlin-1 と HRD1 は逆輸送のチャネルの候補 [Nature 429, 841 (2004)、Cell 143, 579 (2010)]。Herp は各因子の会合を促進する因子の候補 [Mol Cell 36, 782 (2009)]。ATPase である p97 は逆輸送駆動力の候補 [Cell 158, 1375 (2014)] である。その中で、Derlin-3 の研究は国内外ともきわめて少ない。しかし最近、結腸癌における抗癌作用 [Nat Commun 5, 3608 (2014)]、虚血にさらされた心臓における心筋細胞の保護効果 [Circ Res 106, 307 (2010)] など、Derlin-3 の生体における重要性が報告されており、その分子機能の解明が待たれている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、ERAD 因子である Derlin-1、Derlin-3、Herp の各欠損マウスを作製し解析を進めてきた。Derlin-1 ホモ欠損マウスは胎生 8.5 日で致死になり、Derlin-1 は発生に必須であることを示した。一方、Herp と Derlin-3 の各欠損マウスは一見正常に誕生した。そこで欠損の影響を調べるため、肝臓や膵臓などの臓器でタンパク質発現量を比較したところ、ERAD 因子群の発現量バランスの異常を発見した。その後、Herp 欠損マウスの解析をさらに進め、耐糖能低下および脳虚血再灌流に対する脆弱性と、ERAD モデル基質の分解阻害も認め、以上の結果を報告した [PLoS One 7, e34298 (2012)]。次に、これらの現象の分子メカニズムを明らかにするために、我々はマウス肝臓を材料に Herp や Derlin-3 を含む小胞体膜上の ERAD 複合体の生化学的解析を進めた。その結果、構成因子の異なる ERAD 複合体が少なくとも 2 種類存在し、Herp と Derlin-3 は同じ複合体に含まれるという結果を得た (論文投稿中)。また、肝臓の Derlin-3 は小胞体ストレスで劇的な発現量増加を示し、Derlin-3 の機能を解明する手がかりになると考えられた。病態における重要性の報告も考慮し、Derlin-3 の分子機能の解明が次なる重要課

題との着想に至った。

本研究では、『小胞体ストレス時に一過的に発現した Derlin-3 が何をしているのか』、その機能の分子メカニズムと意義を突き止めることを目的とした。そのため、まず Derlin-3 が発現してくる環境では、どのようなことが起こっているのか、そして、Derlin-3 が必要とされる状況下で Derlin-3 を欠損させると、どのような不具合が生じるのかを明らかにすることから着手した。ストレス下で発現した Derlin-3 は Herp と強く結合し、複合体を形成する。そのため、Derlin-3 の発現が与えるインパクトを、Derlin-3 および Herp の両側面から解析をすることは、互いに相乗効果を持つと考え、並行して解析を計画した。これまでの Derlin-3 および Herp 欠損マウスの解析をさらに生理的機能という観点から掘り下げ、Derlin-3 の心臓における保護効果を検証し、なぜ Derlin-3 がそのような効果を発揮するのか明らかにすることを目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究では、ERAD における Derlin-3 とその協働因子 Herp の分子機能と細胞保護効果を解明する。マウス個体レベルでの解析と細胞レベルでの解析を並行しておこなう。低酸素負荷実験で、野生型マウスと Derlin-3 欠損マウスおよび Herp 欠損マウスの心臓へのダメージを比較し、Derlin-3 の心筋細胞保護効果の検証をおこなう。野生型との違いが認められた場合には、通常飼育下での比較もおこない、その発症機序についても解析する。Derlin-3 がストレス時に一過的に発現した際に ERAD 機能にどのような変化を与えるかを解析する。Derlin-3 の機能に直結する結合因子群についても ERAD 複合体や ERAD 基質の観点から重点的に解析する。これらの解析を通じ、細胞レベルでの Derlin-3 の動態を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、ERAD に関与する Derlin-3 に注目して研究を実施した。まず、低酸素ストレスに対する適応応答において、Derlin-3 欠損および Herp 欠損マウスが野生型と比較して生存率の低下を示すことを明らかにした。低酸素ストレスに晒した個体の心臓や肺の組織切片試料を作製して、HE 染色やマッソントリクローム染色などを実施し、その結果、肺組織に大きな違いは見られなかったが、心臓組織における血栓形成や線維化が Derlin-3 欠損マウスで顕著であることが分かった。また、これらと並行して、Derlin-3 を含む ERAD 複合体のメカニズムについての解析を進め、マウス肝臓における ERAD 複合体の構成と調節について新たな結果を得た。低酸素下で観察された欠損マウスの心臓脆弱性は、通常条件下でもみられるのか、それとも低酸

素ストレスに晒されて出現したものなのかを見極めるために、通常条件下での検討もおこなった。その結果、通常飼育下においても Derlin-3 欠損および Herp 欠損マウスは心機能異常を示すことが分かった。Herp 欠損に関しては、チリ大学との共同研究により、心臓において Herp が、異常タンパク質の除去だけでなく、細胞内シグナル伝達を制御するカルシウムイオンチャネルである IP3 レセプターの量をタンパク質分解により制御している事実を突き止めた。今後は、これらの成果を基に、Derlin-3 が高発現する膵臓の解析に着手し、Derlin-3 の生理的機能の解明に取り組む。

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 8 件)

Navarro-Marquez M, Torrealba N, Troncoso R, Vásquez-Trincado C, Rodriguez M, Morales PE, Villalobos E, Eura Y, Garcia L, Chiong M, Klip A, Jaimovich E, Kokame K, Lavandero S. Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca²⁺-calcineurin-Akt axis. *Biochim Biophys Acta*. 1864. 1653 ~ 1662. 査読有 2018 年.
DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.02.018

Torrealba N, Navarro-Marquez M, Garrido V, Pedrozo Z, Romero D, Eura Y, Villalobos E, Roa JC, Chiong M, Kokame K, Lavandero S. Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor Degradation. *Sci Rep*. 7. 13402 ~ 13413. 査読有 2017 年.
DOI: 10.1038/s41598-017-13797-z

樋口(江浦)由佳

ダイレクトシーケエンシング法の弱点を補完するゲノム定量 PCR 法の確立 .
日本血栓止血学会誌.
28. 537 ~ 542. 査読有 2017 年. [総説]
DOI: 10.2491/jjsth.28.537

宮田敏行, 樋口(江浦)由佳, 杉本充彦 .
血栓形成機序の新概念と次世代型抗血栓療法 .
生化学.
89. 333 ~ 342. 査読有 2017 年. [総説]
DOI:
10.14952/SEIKAGAKU.2017.890333

Fan X, Kremer Hovinga JA, Shirohani-Ikejima H, Eura Y, Hirai H,

Honda S, Kokame K, Taleghani MM, von Krogh AS, Yoshida Y, Fujimura Y, Lämmle B, Miyata T. Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. *Int J Hematol*. 103. 283 ~ 291. 査読有. 2016 年. DOI: 10.1007/s12185-015-1933-7

Naito N, Mizuno T, Nishimura T, Kishimoto S, Takewa Y, Eura Y, Kokame K, Miyata T, Date K, Umeki A, Ando M, Ono M, Tatsumi E. Influence of a rotational speed modulation system used with an implantable continuous-flow left ventricular assist device on von Willebrand factor dynamics. *Artif Organs*. 40. 877 ~ 883. 査読有 2016 年.
DOI: 10.1111/aor.12666.

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市 .
先天性 TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の遺伝子解析.
血栓と循環. 24. 20 ~ 24. 査読有 2016 年. [総説]

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市 .
低出力レーザー療法は、巨核球の「生き」を良くすることで、血小板減少を副作用なく非侵襲的に治療する.
日本血栓止血学会誌. 27. 586. 査読有 2016 年. [総説]

[学会発表](計 4 件)

Kokame K and Eura Y. Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. ACCDiS Symposium 7 at XL Annual Meeting of the Chilean Society of Biochemistry and Molecular Biology. 2017 年. [招待講演]

Eura Y. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. 第 22 回日本血栓止血学会学術奨励賞受賞講演. 2017 年. [招待講演]

樋口(江浦)由佳，池島裕子，宮田敏行，
小亀浩市。
小胞体膜タンパク質 Derlin-3 は小胞体ス
トレスによる小胞体関連分解 (ERAD) 複
合体の変化に必要である。
第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年

樋口(江浦)由佳，小亀浩市，水野敏秀，
巽英介，宮田敏行。
補助人工心臓装着による高分子量 VWF マ
ルチマーの減少は循環開始直後に始まる。
第 37 回日本血栓止血学会学術集会. 2015
年

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/index.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
樋口由佳 (江浦由佳) (EURA, Yuka)
国立循環器病研究センター・研究所
・研究員
研究者番号：30443477