

平成21年6月3日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570147

研究課題名（和文）小胞体膜タンパク質によるタンパク質品質管理に関する研究

研究課題名（英文）Research on protein quality control by the endoplasmic reticulum membrane proteins

研究代表者

小亀 浩市（KOKAME KOICHI）

国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室長

研究者番号：40270730

研究成果の概要：小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理機能をもつ細胞小器官である。本研究では、小胞体がどのような仕組みで品質管理を行っているのかを分子レベルで解明することを目的とした。特に小胞体の過負荷で発現誘導される **Herp** や **Derlin** に着目して解析した。その結果、小胞体では構成因子が異なる複数種のタンパク質複合体が品質管理を行っていることや、それらが小胞体の状態によってダイナミックに変化することがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構・ストレス応答・小胞体

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞小器官である小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成や成熟過程において重要な役割を担っている。小胞体の機能的負荷が過剰になった状態、特に小胞体に構造形成不全タンパク質が蓄積した状態は小胞体ストレスと呼ばれ、このとき細胞はストレスを軽減するように応答する。小胞体ストレス応答には、タンパク質全般の翻訳抑制、分子シャペロン遺伝子などの転写誘導、不用タンパク質を処理する小胞体関連分解（endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD）が含まれる。

近年、小胞体のタンパク質品質管理機構の主要経路として、ERAD が注目されている。小胞体内腔に生じた構造不全タンパク質を識別し、小胞体膜を經由して細胞質へ移送し（逆輸送と呼ばれる）、細胞質のユビキチン-プロテアソーム系で分解する、という一連の細胞機能である。小胞体ストレス時に発現誘導されるタンパク質の一部が ERAD に関与していることが近年わかってきた。我々は以前、小胞体ストレスで著しく発現誘導される機能未知のタンパク質として **Herp** を発見したが、最近の成果から、**Herp** も ERAD に寄与することが明らかになってきた。また、小

胞体膜タンパク質 Derlin も、Herp と同様、小胞体ストレスで発現誘導され、ERAD を促進する。Derlin には3つのアイソフォーム、Derlin-1、Derlin-2、Derlin-3 が存在する。Herp と Derlin は種々の小胞体膜タンパク質と共に会合しているらしい。

以上の背景から、Herp や Derlin は ERAD において中心的な役割を担っていることが推定される。平常時には発現が低く抑制され、小胞体ストレス時に発現誘導される性質を考慮すると、Herp や Derlin などの小胞体膜タンパク質の発現量調節が、小胞体機能にとって重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、Herp や Derlin が ERAD のどの段階でどのような分子機能を発揮しているのか、未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、小胞体においてタンパク質の品質管理を担うシステムの分子機構を明らかにすることを目的とした。特に、小胞体ストレス時に発現誘導される小胞体膜タンパク質 Herp および Derlin-1, 2, 3 に着目し、それらとともに小胞体膜に形成されるタンパク質複合体の成分を調べる。さらに、その複合体が、ERAD システムの過程でどのように機能しているのかを調べる。これと並行して、Derlin-1, 2, 3 の各欠損マウスを作製し、すでに完成している Herp 欠損マウスとともに、それらのタンパク質の生理機能を解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

まず、小胞体膜上で ERAD に関与していると考えられる膜タンパク質 Herp や Derlin を含むタンパク質複合体 (ERAD 複合体と呼ぶ) の構成要素を明らかにする。そして、ERAD 複合体が ERAD 基質とどのように相互作用するのか、平常時と小胞体ストレス時で構造的・機能的に違いがあるのかなどの観点で、ERAD 複合体の動的变化を解析する。

はじめに、ERAD 複合体の構成因子を同定することを試みた。小胞体ストレスで発現誘導される膜タンパク質 Herp は、Derlin や HRD1 などの ERAD 関連タンパク質と大きな複合体を形成している可能性がある。そこで、なるべく生理的条件を維持したまま小胞体膜タンパク質成分を抽出し、その構成因子を分析するために、野生型マウスから調製した胚性線維芽細胞あるいは臓器から、小胞体画分を穏やかに抽出した。そして、そこに含まれるタンパク質を分析するために、Blue-Native ポリアクリルアミドゲル電気泳動やアガロースゲル電気泳動、ショ糖密度勾配遠心などを利用してタンパク質を分画し、それらを特異的抗体を用いたウエスタンブロットングで検出した。

どのような分子が ERAD 複合体を構成しているのかを調べるために、特異的抗体を用いた共免疫沈降実験を行った。3者以上のタンパク質が同一の複合体を形成していることを証明するために、2者間の相互作用を検出する共免疫沈降実験だけでなく、複数の抗体を利用した連続共免疫沈降実験も行った。さらに、複合体に含まれる未知のタンパク質を同定するために、共免疫沈降した成分を質量分析法で解析した。

上述のような実験において、野生型マウスから調製した胚性線維芽細胞や臓器だけでなく、Herp 欠損マウスから調製した細胞や臓器を用いることによって、複合体の形成に及ぼす Herp 欠損の影響を調べた。さらに、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘導剤を培地に加えることで培養細胞に小胞体ストレスを負荷したり、ツニカマイシンをマウスの腹腔に注射することによって臓器に小胞体ストレスを負荷したのちに、小胞体画分を分析し、ERAD 複合体の構成がどのように変化するのかを調べた。

以上のような生化学的解析と並行して、本研究では Derlin-1, 2, 3 各欠損マウスを遺伝子ターゲティングにより作製した。すでに完成していた Herp 欠損マウスは際立った表現型を示さないことから、Derlin 群が Herp 欠損を補償している可能性もある。Derlin 欠損マウスを利用することで、それを検証することが可能になる。

## 4. 研究成果

小胞体膜のタンパク質複合体を同定するために、野生型マウスの胚性線維芽細胞および肝臓から調製したミクロソーム画分を分析した結果、Herp や Derlin などの構成因子の組み合わせが異なる複数種の複合体が存在することを見出した。そして、小胞体ストレスを負荷することによって、複合体構成因子の組成が変化することを発見した。さらに、本研究で新たに作製した抗体を用いてウエスタンブロットングや連続共免疫沈降実験などを行った結果、小胞体ストレスが負荷されていない状態では、Herp と Derlin-2、HRD1 の3者を同時に含むタンパク質複合体が存在することや、小胞体ストレス状態では Herp と HRD1 の結合が増強し、さらに、新たに発現誘導される Derlin-3 が Herp を含む複合体に参入することを明らかにした。Derlin-3 の挙動をタンパク質レベルで観察できたことは、本研究の中でも特筆すべき成果であった。また、並行して進めていた Derlin-1, 2, 3 各遺伝子欠損マウスの作製については、いずれもヘテロ欠損マウスはほぼ正常に誕生するものの、Derlin-1 および Derlin-2 の完全欠損マウスは全く誕生しないことが明らかになった。一方、Derlin-3 完

全欠損マウスは正常に誕生した。これらのことから、Derlin-1 および Derlin-2 は、マウスの個体発生に必須であることや、互いに機能損失を補償できないことが初めて示された。今後、本研究で得られた ERAD 複合体に関する知見や Derlin 群欠損マウスを利用することで、当該分野の研究を大きく発展させることができるかと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- [1] M. Hatanaka, S. Shimba, M. Sakaue, Y. Kondo, H. Kagechika, K. Kokame, T. Miyata, and S. Hara: Hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  functions as an accelerator of 3T3-L1 adipose differentiation. *Biol. Pharm. Bull.*, in press. 査読有り
- [2] F. Banno, A. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, D. Wagner, and T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. *Blood* 113, 5323-5329 (2009) 査読有り
- [3] Y. Inaoka, T. Yazawa, T. Mizutani, K. Kokame, K. Kangawa, M. Uesaka, A. Umezawa, and K. Miyamoto: Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod. Biol. Endocr.* 6(62) 1-10 (2009) 査読有り
- [4] T. Yokota, K. Oritani, S. Butz, K. Kokame, P. W. Kincade, T. Miyata, D. Vestweber, and Y. Kanakura: The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. *Blood* 113, 2914-2923 (2009) 査読有り
- [5] Y. Fujimura, M. Matsumoto, K. Kokame, A. Isonishi, K. Soejima, N. Akiyama, J. Tomiyama, K. Natori, Y. Kuranishi, Y. Imamura, N. Inoue, S. Higasa, M. Seike, T. Kozuka, M. Hara, H. Wada, M. Murata, Y. Ikeda, T. Miyata, and J. N. George: Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br. J. Haematol.* 144, 742-754 (2009) 査読有り
- [6] T. Miyata, Y. Sato, J. Ishikawa, H. Okada, S. Takeshita, T. Sakata, K. Kokame, R. Kimura, S. Honda, T. Kawasaki, E. Suehisa, H. Tsuji, S. Madoiwa, Y. Sakata, T.

Kojima, M. Murata, and Y. Ikeda: Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Res.* 124, 14-18 (2009) 査読有り

[7] M. Akiyama, K. Kokame, and T. Miyata: ADAMTS13 P475S polymorphism causes a lowered enzymatic activity and urea lability *in vitro*. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1830-1832 (2008) 査読有り

[8] A. Tripodi, F. Peyvandi, V. Chantarangkul, R. Palla, A. Afrasiabi, M. T. Canciani, D. W. Chung, S. Ferrari, Y. Fujimura, M. Karimi, K. Kokame, J. A. Kremer Hovinga, B. Lämmle, S. F. De Meyer, B. Plaimauer, K. Vanhoorelbeke, K. Varadi, and P. M. Mannucci: Second international collaborative study evaluating performance characteristics of methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J. Thromb. Haemost.* 6, 1534-1541 (2008) 査読有り

[9] G. Liang, Q. Li, Y. Tang, K. Kokame, T. Kikuchi, G. Wu, and X.-Z. Chen: Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1109-1119 (2008) 査読有り

[10] T. Okuda, K. Kokame, and T. Miyata: Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 175-182 (2008) 査読有り

[11] K. Kokame, Y. Aoyama, M. Matsumoto, Y. Fujimura, and T. Miyata: Inherited and *de novo* mutations of *ADAMTS13* in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 6, 213-215 (2008) 査読有り

[12] Y. Taketomi, K. Sunaga, S. Tanaka, M. Nakamura, S. Arata, T. Okuda, T. C. Moon, H. W. Chang, Y. Sugimoto, K. Kokame, T. Miyata, M. Murakami, and I. Kudo: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *NdrG1*-deficient mice. *J. Immunol.* 178, 7042-7053 (2007) 査読有り

[13] J.S. Truettner, B. Hu, O.F. Alonso, H.M. Bramlett, K. Kokame, and W.D.

Dietrich: Subcellular stress response after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24, 599-612 (2007) 査読有り

[14] S. Shinozaki, T. Chiba, K. Kokame, T. Miyata, M. Ai, A. Kawakami, E. Kaneko, M. Yoshida, and K. Shimokado: Site-specific effect of estradiol on gene expression in the adipose tissue of ob/ob mice: *Horm. Metab. Res.* 39, 192-196 (2007) 査読有り

[15] T. Miyata, K. Kokame, F. Banno, Y. Shin, and M. Akiyama: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 277-283 (2007) 査読有り

[16] 江浦由佳: 小胞体逆輸送の謎にせまる *in vitro* アッセイ法. *蛋白質核酸酵素* 52, 1474-1475 (2007) 査読有り

[17] 江浦由佳: 小胞体関連分解における AAA-ATPase, p97 の役割. *蛋白質核酸酵素* 52, 74-75 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

[1] 武市敏明 他: NDRG2 はアストログリアの運動を制御する. 第 81 回日本生化学会大会, 第 31 回日本分子生物学会年会 (2008 年 12 月) 神戸.

[2] 橋田耕治 他: ERAD 分子 Herp の発現減少は  $\alpha$ -synuclein 及び synphilin-1 の分解を促進する. 第 81 回日本生化学会大会, 第 31 回日本分子生物学会年会 (2008 年 12 月) 神戸.

[3] 江浦由佳 他: ERAD 複合体の構成因子は ER ストレスに応答してダイナミックに変化する. 第 81 回日本生化学会大会, 第 31 回日本分子生物学会年会 (2008 年 12 月) 神戸.

[4] 生野雄二 他: Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の発現低下は脳虚血後の環境刺激による神経機能回復に関係する. 第 20 回日本脳循環代謝学会総会 (2008 年 11 月) 東京.

[5] 原田晃名 他: 脳虚血障害後の環境刺激による神経機能回復に関する検討. 第 20 回日本脳循環代謝学会総会 (2008 年 11 月) 東京.

[6] 田村恵美 他: HUVEC におけるレスベラトロール連続処理による遺伝子発現変動の検討. 第 47 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (2008 年 10 月) 奈良.

[7] 奥田智彦 他: ストレス誘導タンパク質 NDRG1 は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する. 第 80 回日本生化学会大会, 第 30 回日本分子生物学会年会 (2007 年 12 月) 横浜.

[8] 江浦由佳 他: Herp 欠損は小胞体ストレス誘導性の ERAD 複合体形成を抑制する. 第 80 回日本生化学会大会, 第 30 回日本分子生物学会年会 (2007 年 12 月) 横浜.

[9] 篠崎昇平 他: ob/ob マウス脂肪組織におけるエストロジオールの部位特異的な作用の解明. 第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会 (2007 年 7 月) 大阪.

[10] 篠崎昇平 他: 小胞体ストレスと動脈硬化: 小胞体ストレス蛋白 Herp 欠損は動脈硬化進展を抑制する. 第 39 回日本動脈硬化学会総会学術集会 (2007 年 7 月) 大阪.

[11] 武富芳隆 他: マスト細胞の成熟に伴って発現誘導される NDRG1 の解析. 第 8 回 Pharamaco-Hematology シンポジウム (2007 年 6 月) 金沢.

[12] Yuji Shouno et al.: Analysis of gene expression related to enrich environment after ischemic stroke in rats. 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (May, 2007) Osaka.

[13] Shohei Shinozaki et al.: Deficiency of Herp, an ER stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE deficient mice. ATVB Annual Conference 2007 (April, 2007) Chicago.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小亀 浩市 (KOKAME KOICHI)

国立循環器病センター研究所・

脈管生理部・室長

研究者番号: 40270730

### (2) 研究分担者

江浦 由佳 (EURA YUKA)

国立循環器病センター研究所・

病因部・流動研究員

研究者番号: 30443477