

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380081

研究課題名（和文）

臓器特異的ジータゲティング法による小胞体 ER-60 の生理機能に関する研究

研究課題名（英文）

Studies on physiological roles of ER-60 by tissue-specific gene targeting analysis

研究代表者

裏出 令子（URADE REIKO）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90167289

研究成果の概要（和文）：肝臓特異的な ER-60 のノックアウトにより、肝臓での膜糖たんぱく質の構造形成が部分的に遅滞することを見いだした。このため、高脂肪食による高度肥満にすると、ER-60 の欠失により肝臓で小胞体ストレスが惹起されやすくなることを示した。脳特異的な ER-60 の欠失により、ER-60 によるアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドβの毒性抑制作用の検証を試みるとともに、ER-60 とアミロイドβとの複合体の構造解析に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we found that the folding efficiency of some membrane glycoproteins was impaired by liver-specific knockout of ER-60. It was demonstrated that ER stress might be easily induced in ER-60 knockout mice by long feeding of high-fat diet. We attempted to confirm the protective effects of ER-60 against toxicity of amyloid beta peptides by brain-specific ER-60 knockout. In addition, we succeeded in X-ray structural analysis of a complex with the bb' fragment of ER-60 and β-amyloid peptide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品生化学

キーワード：ER-60、小胞体、分子シャペロン、ノックアウトマウス、小胞体ストレス、アミロイドβ、X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

動物細胞の小胞体には約 20 種類の PDI ファミリータンパク質が存在し、粗面小胞体で合成された新生タンパク質のジスルフィド結合形成を伴う高次構造形成（フォールディング）や品質管理を担っている。個々の PDI

ファミリータンパク質が特異的な生理的役割を分担すると予想されるが、その詳細は不明である。ER-60 は、研究代表者が 1992 年に世界に先駆けて発見した PDI ファミリータンパク質のひとつであり、哺乳動物ではタンパク質合成の盛んな臓器に広く発現してい

る。我々の報告後、ER-60 は多くの研究者の注目を集め研究代表者及び他の複数のグループにより研究が行われた。その結果、ER-60 はレクチン型分子シャペロン（カルネキシン及びカルレチキュリン）との複合体形成を介して活性化され、糖タンパク質のフォールディングに特に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。ER-60 の他の生理作用については、研究代表者とトロント大学及びワシントン大学との共同研究による肝臓細胞からのリポタンパク質（VLDL）の分泌量の制御、抗原提示におけるMHC class I と抗原ペプチドとの複合体形成作用、及び小胞体のカルシウムホメオスタシスの調節作用などが報告されている。疾病との関係では2型糖尿病を引き起こすインスリン抵抗性に伴うER-60 の発現低下や狂牛病の原因であるプリオンタンパク質の沈着に対するER-60 の抑制作用が報告されている。研究代表者は、ER-60 が脳では神経細胞に特異的に高発現し、アルツハイマー病モデルマウスのアミロイド斑に濃縮されていること、ER-60 がアミロイド $\beta$ の線維化を抑制することによりアミロイド $\beta$ の毒性を緩和する作用があることを見いだしていた。ER-60 に関する研究の進展には、2つの課題の追求が必要であると考えられた。1つは遺伝子ターゲティングによる包括的な生理作用の追求であり、本応募課題の中心的主題である。他の1つは構造解析による反応機構の解明である。特に、ER-60 と基質タンパク質の複合体の構造解析がこの課題を進展させるために必須である。研究代表者はアミロイド $\beta$ との複合体形成に必要なER-60 のbb'サブドメインの結合領域を既に同定し、アミロイド $\beta$ とbb'サブドメインの複合体の結晶化にも予備的に成功していたので、この課題についても他に先んじて研究を展開することができると考えた。研究代表者は、上記のようにER-60 の研究に関して世界のなかで常に先駆的な研究を展開するとともに、長年にわたり動物細胞の脂質代謝と食品との関係に関する生化学研究をも行ってきており、それらから得られた知識や技術も本研究の遂行に利用することが可能であった。一方、研究分担者は多種類のトランスジェニック及びノックアウトマウスを作製し、それらを用いて生化学・分子生物学及び生理学的な解析を駆使して睡眠研究及び神経変性疾患の分野で国際的に卓越した業績

を挙げた。従って、両者の共同研究により、極めて独創的で高度な研究の遂行が可能であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は研究代表者が世界に先駆けて発見した動物細胞の主要な小胞体分子シャペロンであるProtein Disulfide Isomerase (PDI) family ER-60 の生理的役割を解明し、ER-60 と脂質異常症やアルツハイマー病などとの関係を明らかにすることにより健康科学への応用を目指した。具体的には、*IoxP/Cre* リコンビナーゼ系を用いたコンディショナルターゲティング法により、臓器特異的にER-60 をノックアウトさせたマウスを用い、肝臓及び脳におけるER-60 の生理的役割を探索する。すなわち、これまでにER-60 の関与が報告されている血清中性脂肪濃度の制御、インスリン抵抗性の一因と見られている小胞体ストレス応答及びアルツハイマー病発症の主因とされている $\beta$ -アミロイド線維形成の抑制作用を解析する。また、最近研究代表者が見出したレプチン情報伝達系の攪乱による肝臓及び脳でのER-60 発現量の減少と生理機能との関連についても追及する。手法としては、分子生物学、生化学、生理学・組織化学等の手法を駆使して、個体レベルで明らかになったER-60 の生理作用の分子レベルでの作用機構の解明を目指す。ER-60 は、肝臓においてApoB-100 分解の活性化によるVLDL の分泌量調節への関わりが示唆されている。これにより、脂質異常症やアルツハイマー病などを予防する小胞体機能調節を目指した健康的な食生活のデザインを提示することが可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝臓特異的ノックアウトマウスの繁殖

*IoxP/Cre* リコンビナーゼ系はCreリコンビナーゼが*IoxP*配列を認識し、その部分でDNAの組換えを起こす現象を利用したノックアウトマウス作製法であり、Creリコンビナーゼのプロモータによる発現調節により遺伝子欠損を臓器特異的に生じさせることができる。我々は既にER-60遺伝子のエクソンの前後に*IoxP*配列を導入したfloxマウスを作製し、肝臓特異的にアルブミンプロモータ下でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配してヘテロノックア

ウトマウス (図2) を得ていた。そこで、ヘテロノックアウトマウスを交配することにより、肝臓特異的ホモノックアウトマウスを繁殖させた。ノックアウト個体はPCR法により現有の装置を用いて判定した。また、現有の抗ER-60抗体を用いてER-60タンパク質の欠損をウエスタンブロッティングにより確認した。

(2) アデノウイルスを用いた脳特異的ノックダウンマウスの作製

研究連携者は、Creリコンビナーゼを導入したAAV-Creウイルスベクターを作製し、既に、floxマウス脳内へのウイルス注入による局所での遺伝子ノックアウト実験に成功していた)。ステレオタキシス装置とマイクロシリンジを用いて、AAV-CreウイルスをER-60-1oxPターゲティングマウスの脳に接種し、2~4週間飼育した後、実験に供した。AAV-ウイルスの感染部位は、ベクターに挿入したレポーター遺伝子GFPの発現により確認した。一方、ER-60のノックダウンは、研究代表者の開発したER-60抗体を用いて確認した。

(3) ER-60欠損が肝臓脂質代謝に及ぼす影響の解析

肝臓特異的ノックアウトマウス、肝臓特異的ノックダウンマウスと正常マウスを普通食及び高脂肪食で飼育し、正常マウス及びER-60欠損マウスの血清成分 (各リポタンパク質及び構成脂質成分、インスリン、グルコース、アルブミン、肝機能指標タンパク質等) を定法により定量した。

(4) 肝臓特異的ER-60欠損マウスのプロテオーム解析

小胞体機能に及ぼすER-60欠損の影響を明らかにするために、普通食及び高脂肪食で飼育した肝臓特異的ノックアウトマウス、肝臓特異的ノックダウンマウスと正常マウスの肝臓の各タンパク質発現量を現有の2次元電気泳動装置により分離し、備品として購入するケミルミ撮影装置を用いて発現量を比較した。発現量が減少もしくは増加したタンパク質をブロッティング後、N末端配列分析により同定した。

(5) ER-60とアミロイドβペプチド複合体の結晶構造解析

ER-60のアミロイドβ結合部位であるbb'ドメインのリコンビナントタンパク質と、アミロイドβの複合体の結晶化を行い、高

分解能のX線結晶構造を大型放射光施設 (SPring-8) を用いて決定した。

(6) 脳神経細胞でのER-60の欠損が細胞形態影響の解析

脳神経細胞特異的ノックアウトマウスあるいはノックダウンマウスの脳組織をニッスル染色やミエリン染色を行なった後、現有の光学顕微鏡で観察した。

(7) レプチン欠損及びレプチンレセプター欠損マウスにおけるER-60の発現低下部位の同定

レプチン情報伝達系異常マウス (ob/ob, db/db) の脳領域を、ER-60抗体を用いた組織免疫染色により同定した。

(8) レプチン欠損マウスへのレプチン投与によるER-60発現量の変化の解析

ob/obマウスにレプチンを腹腔内投与した後、肝臓及び脳におけるER-60の発現量の変化をウエスタンブロッティングで解析する。かにする。

#### 4. 研究成果

(1) 肝臓特異的なノックアウトマウスを繁殖させた。通常条件では野生型とノックアウトマウス間で生殖能、成長、運動能力等に差は認められず、肝臓特異的ER-60のノックアウトは致命的な影響を動物に与えないことが明らかとなった。普通食を与えた場合には血中の肝障害及び脂質代謝パラメーターにはほとんど差がなかった。さらに、肝重量、脂肪肝の程度、グルコース負荷後の血中グルコース取り込み能も両動物で有意な差は見られなかった。さらに、代表的分子シャペロンBiP、カルレチキュリン、ERp72、PDI、P5のタンパク質量及びmRNA量は野生型とノックアウトマウス間でほとんど差が見られなかった。この結果は、ER-60は糖タンパク質のジスルフィド結合形成を行うプロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーであるが、肝臓ではER-60に代替して作用する他の機構が存在することを示唆している。

(2) 雄9週齢の野生型あるいは肝臓特異的ノックアウトマウスに4週間あるいは30週間高脂肪食を与えた。4週間摂取では、ノックアウトマウスの血中トリアシルグリセロール量が野生型に比して有意に低いことが明らかとなった。30週間高脂肪食摂取では、ノックアウトマウスで体重の増加が野生型より低い傾向があった。しかし、血中の肝障

害及び脂質代謝パラメーターにはほとんど差がなかった。さらに、肝重量、脂肪肝の程度、グルコース負荷後の血中グルコース取り込み能も両動物で有意な差は見られなかった。これらの結果から、肝臓でのER-60の欠損は高脂肪食ストレス下で決定的な影響を与えないことが明らかとなった。

さらに、肝臓の、小胞体分子シャペロンのタンパク質およびmRNAレベルの解析を行った。4週間摂取では、高脂肪食により代表的分子シャペロンBiPのタンパク質量が低下した。野生型とノックアウトマウス間で分子シャペロンのタンパク質量に差は見られなかった。一方、カルレチキュリン、ERp72、PDI、P5のmRNA量はノックアウトマウスでのみ高脂肪食で増加した。30週間の食餌摂食実験では、野生型、ノックアウト型ともにBiP、カルネキシン、カルレチキュリン、ERp72、P5のタンパク質量が減少することを見出した。このうちBiP、カルレチキュリン、P5はmRNA量も低下していた。一方、mRNA量の低下の程度は野生型に比してノックアウトマウスで緩やかであった。

(3) 4週間あるいは30週間普通食あるいは高脂肪食を与えた野生型あるいは肝臓特異的ノックアウトマウス(オス)また、肝臓タンパク質のプロテオーム解析により、複数の膜結合型糖たんぱく質の量が野生型に比してノックアウトマウスで減少していることを見いだした。これらの結果から、ER-60の欠損により肝臓で合成された一部の膜たんぱく質の構造形成効率が低下することが推定された。そして、高脂肪食摂取により小胞体分子シャペロンの発現量が低下するが、この状況下ではER-60の欠失により小胞体ストレスが惹起されやすいため小胞体ストレス応答シャペロン遺伝子の発現が野生型に比して高くなることが示唆された。

(4) ob/obマウス及びdb/dbマウスの脳及び肝臓におけるER-60及びER-60以外の小胞体分子シャペロンの発現の低下、及びob/obマウスへのレプチンの腹腔内投与による小胞体分子シャペロンの発現誘導を見いだした。ob/obマウスの脳を免疫組織染色法により観察し、大脳皮質でER-60の発現量が低下していることを明らかにした。これらの結果から、病的肥満で起こるレプチン抵抗性やインスリン抵抗性により小胞体の分子シャペロン量が低下することが示唆された。

(5) loxP 配列で挟まれたゲノム領域が Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスの感染により脱落することを利用して、flox/flox マウスの脳の左半球に Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスを注射し、4週間後に注射部位で ER-60 の発現低下を認めた。同様の処理を行った flox/flox マウスの脳にアミロイドβペプチドを注射し、脳組織への影響を検討した。

(6) ER-60 のアミロイドβペプチド結合領域である bb' ドメインの結晶を作製し、単独およびアミロイドβの結合最小単位ペプチドとの複合体の構造解析を行った。この解析により分解能 1.38 Å の解析データが得られ、アミロイドβと推定される電子密度が存在する bb' 領域が同定された。すなわち、アミロイドβと推定される電子密度が bb' の境界に存在するトンネルの入り口付近に見いだされ、一定の立体構造を持ったアミロイドβペプチドを ER-60 が結合するのではなく、フレキシブルな構造のアミロイドβペプチドとの会合・解離を繰り返すことによりその線維化を阻害するというメカニズムの提唱に至った。この成果は、小胞体分子シャペロンの基質認識に関する初めての知見である。

## 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)

① Wadahama H, Iwasaki K, Matsusaki M, Nishizawa K, Ishimoto M, Arisaka F, Takagi K, Urade R., Accumulation of β-conglycinin in soybean cotyledon through the formation of disulfide bonds between α'- and α-subunits. *Plant Physiol.*, 査読有, **158**, 2012, 1395-1405 10.1104/pp.111.189621

② Wang YQ, Tu ZC, Xu XY, Li R, Qu WM, Urade Y, Huang ZL., Acute administration of fluoxetine normalizes rapid eye movement sleep abnormality, but not depressive behaviors in olfactory bulbectomized rats. *J. Neurochem.*, 査読有, **120**, 2012, 314-324 10.1111/j.1471-4159.2011.07558.x.

③ Inaka K, Takahashi S, Aritake K, Tsurumura T, Furubayashi N, Yan B, Hirota E, Sano S, Sato M, Kobayashi T, Yoshimura Y, Tanaka H, Urade Y., High-Quality

Protein Crystal Growth of Mouse Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Microgravity. *Cryst. Growth Des.*, 査読有, **11**, 2011, 2107-2111  
10.1021/cg101370v

④Lazarus M, Shen HY, Cherasse Y, Qu WM, Huang ZL, Bass CE, Winsky-Sommerer R, Semba K, Fredholm BB, Boison D, Hayaishi O, Urade Y, Chen JF., Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, 査読有 2011, **31**, 10067-10075  
10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011

⑤Ogasawara M, Ogasawara M, Hirose A, Ono M, Aritake K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Sakamoto S, Iwasaki S, Asanuma T, Taniguchi T, Urade Y, Onishi S, Saibara T, Oben JA, A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. *Liver Int.* 査読有, **31**, 2010, 542-551  
10.1111/j.1478-3231.2010.02443.x

⑥Koh A, Nishimura K, Urade R, Relationship between endogenous protein disulfide isomerase family proteins and glutenin macropolymer. *J. Agric. Food Chem.* 査読有, **58**, 2010, 12970-12975  
10.1021/jf103347p

⑦Iwasaki K, Kamauchi S, Wadahama H, Ishimoto M, Kawada T and Urade R, Molecular cloning and characterization of soybean protein disulfide isomerase family proteins with nonclassic active center motifs. *FEBS J.*, 査読有, **276**, 2009, 4130-4141  
10.1111/j.1742-4658.2009.07123.x

⑧Mochizuki, Y., Maebuchi, M., Kohno, M., Hirotsuka M, Wadahama H, Moriyama T, Kawada T and Urade R, Changes in lipid metabolism by soy beta-conglycinin-derived peptides. in HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 査読有, **57**, 2009, 1473-1480  
10.1021/jf8031793

[学会発表] (計7件)

- ①和田濱裕之、岩崎健佑、石本政男、西澤けいと、裏出令子、ダイズ子葉細胞におけるジスルフィド結合を介した $\beta$ -コングリシニン複合体の形成、日本農芸化学会大会、2012年3月24日、京都女子大学
- ②裏出令子、和田濱裕之、有竹浩介、永田奈々恵、裏出良博、脳におけるER-60の発現量とレプチン作用との関係、日本農芸化学会大会、2012年3月23日、京都女子大学
- ③伊中浩二、古林直樹、裏出良博、魚留信子、鶴村俊治、和田濱裕之、裏出令子、小胞体分子シャペロン ER-60の基質結合ドメインとアミロイド $\beta$ ペプチド複合体の結晶構造解析、日本農芸化学会大会、2012年3月23日、京都女子大学
- ④高木悠希、有竹浩介、大石陽、鈴木比佐子、和田濱裕之、河田照雄、裏出良博、裏出令子、ER-60ノックアウトの肝細胞小胞体機能への影響、日本農芸化学会大会、2011年3月5日、京都女子大学 (大震災のため発表中止となり、講演要旨発行をもって発表成立とされた)
- ⑤高木悠希、有竹浩介、大石陽、鈴木比佐子、和田濱裕之、河田照雄、裏出良博、裏出令子、肝臓特異的ER-60/ERp57ノックアウトの小胞体機能への影響、日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸国際会議場
- ⑥Urade R, Thiol oxidoreductases involved in soybean storage protein biogenesis, 34<sup>th</sup> FEBS Congress, 2009年7月5日、Prague Congress Centre Czech Republic
- ⑦和田濱裕之、有竹浩介、裏出良博、河田照雄、裏出令子、レプチンによる小胞体分子シャペロンの発現調節、日本生化学会大会、2009年10月21日、神戸国際会議場

[図書] (計2件)

- ① Urade R, Academic Press, Elsevier, Fortification of bread with soy proteins to normalize serum cholesterol and triacylglycerol levels in Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, 2011, 417-427
- ② Kamiya Y, Kamiya D, Urade R, Suzuki T and Kato K, Nova Science Publishers, Inc., Sophisticated modes of sugar recognition by the intracellular lectins involved in quality control of glycoproteins in Glycobiology Research

6. 研究組織

(1) 研究代表者

裏出 令子 (URADE REIKO)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：90167289

(2) 研究分担者

裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)  
大阪バイオサイエンス研究所・研究部長  
研究者番号：10201360

(3) 連携研究者

柏木香保里 (KASHIWAGI KAHORI)  
大阪バイオサイエンス研究所・研究員  
研究者番号：10372666

ラザルス ミハイル (LAZARUS MICHAEL)  
大阪バイオサイエンス研究所・研究員  
研究者番号：80469650