

## 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 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790288

研究課題名（和文）カルシウムイオン結合性小胞体タンパク質カルミンの生理的役割の解明

研究課題名（英文）Analysis for physiological role of the Ca<sup>2+</sup>-binding ER protein calumin

研究代表者

山本 伸一郎（YAMAMOTO SHINICHIRO）

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：10542102

研究成果の概要（和文）：

Calumin は小胞体膜タンパク質である。Calumin 欠損マウスは E10.5-11.5 で胎生致死となるが、その詳細な生理機能は不明である。本申請研究においては、calumin の生理機能の解明を目指し検討を行った。

胎児における calumin の発現を観察したところ、栄養の吸収を行う卵黄囊の内胚葉細胞に特異的に発現していた。さらにその内胚葉細胞に脂肪滴の異常な貯留が認められ、脂質輸送に calumin が関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Calumin is transmembrane protein on endoplasmic reticulum. Although calumin knockout in mice is embryonic lethal around E10.5-11.5, the physiological role is no clear. Thus, we investigated the physiological role of calumin. Calumin is specifically expressed in yolk sac endoderm cells which are the principal nutrient-transporting cells. Additionally, lipid droplets are accumulated in calumin knockout yolk sac endoderm cells. Therefore, it was suggested that calumin was involved in lipid transport in endoderm cells

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：小胞体 Ca<sup>2+</sup>

## 1. 研究開始当初の背景

Ca<sup>2+</sup> シグナルは筋収縮、伝達物質放出、遺伝子発現や細胞増殖など多彩な細胞機能を制御する。細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇を引き起こす経路として細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアである小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出が存在し、小胞体膜に存在するイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体お

よびリアノジン受容体を介した Ca<sup>2+</sup> 放出は多彩な細胞応答に関与し、その重要性は周知されている。また、小胞体は細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストア機能を有すると同時に、分泌タンパク質の合成とホールディングする場としても重要な役割を担っている。一方、そのホールディング機構の破綻によりミスホールディン

グされたタンパク質が小胞体に蓄積すると小胞体ストレスが惹起される。小胞体ストレスは最終的に細胞死を引き起こすが、小胞体においてミスホールディングタンパク質の蓄積はタンパク質の合成抑制・代謝促進、およびホールディング機構を活性化するなど、小胞体ストレスを緩和する機構も備えている。ホールディングや糖鎖修飾には  $\text{Ca}^{2+}$  依存性シャペロンや糖鎖転移酵素の働きが不可欠である。 $\text{Ca}^{2+}$  放出に伴い小胞体内腔では  $\text{Ca}^{2+}$  が枯渇することになるが、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性タンパク質の活性維持には  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵量を厳密に制御することが必要とされる。例えば、細胞質中に放出された  $\text{Ca}^{2+}$  は、小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプである SERCA によって小胞体に再取り込みされる。また、小胞体膜に存在する STIM1 は小胞体管腔側の  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインを有して、小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を監視している。内腔で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下すると、STIM1 は多量体を形成して、形質膜上の Orai  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを活性化して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を引き起こすことで、小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  再充填を導くことが知られている。さらに、未知の機構による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ストアとしての恒常性維持も予見される申請者の所属教室で発見された calumin は 1 本の膜貫通セグメントを有する小胞体膜タンパク質であり、様々な細胞系に発現が確認されている。Calumin の小胞体内腔領域は  $\text{Ca}^{2+}$  結合活性を示すが、既知モチーフ配列のない細胞質領域には構造上の特徴は見出せない。これまでの成果から、calumin は小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリングに寄与することが示唆されるが、その詳細な生理機能は不明である。

## 2. 研究の目的

申請者の所属研究室では、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ストア機能を分子レベルから理解することを目指して、新規な膜タンパク質の分子同定、機能解明、病態関連解析などを遂行している。当研究室にて近年同定された小胞体膜貫通タンパク質 calumin は、内腔側に  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を有するものの、推定 coiled-coil 領域を有する細胞質領域の機能はまったく不明である。

これまで解剖学的解析では、calumin 欠損マウス胎児は卵黄囊の血管形成の異常を原因として胎齢 10.5 日から 11.5 日に死亡することが見出されている。胎児期卵黄囊の血管形成では、まず中胚葉から分化した内皮細胞によって de novo に脈管が形成され (脈管形成 vasculogenesis)、中胚葉由来の壁細胞が内皮細胞に直接相互作用することで血管のリモデリングが引き起こされ、新しい管腔が作られる (血管新生 angiogenesis)。この過程における内胚葉由来の液性因子や内皮細胞-壁細胞相互作用などが精力的に研究されて

いるが、具体的なシグナル伝達経路の詳細については不明確な点が多く残されている。この分子機構の未開拓な血管形成において、どのような細胞応答に calumin が関与しているかについては謎である。したがって、本申請研究においては、血管形成への関与について着目し、calumin の生理機能の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 解剖学的観察

卵黄囊における血管形成異常がいつから引き起こされているのかを知るために、経時的な卵黄囊の血管形成について組織サンプルを作製し、形態学的観察を行った。同時に、胎児側の血管形成についても異常の有無を検討した。

どの細胞に異常が引き起こされているのかを電子顕微鏡を用いて細胞の微細形態異常の有無を指標に検討した。

### (2) 血管形成における機能的評価

異常が認められた卵黄囊を calumin 欠損マウスより単離して、主に血管形成に重要な液性因子 (fibronectin、Ihh/Shh、BMP4、TGF $\beta$ ) についてタンパク質の発現の違いをウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

マウス胎児から調製した組織片を用いて、*ex vivo* 系での血管形成の実験を行った。

### (3) Calumin 発現細胞の断定

抗 calumin 抗体を用いて異常が認められている卵黄囊における calumin 発現細胞を免疫組織染色法にて特定した。また免疫組織染色で calumin 発現が認められた細胞における calumin 発現をウエスタンブロッティング法や RT-PCR 法も用いて確認した。さらに各種の細胞内小器官のマーカー (calureticurin/小胞体、LAMP1/リソソーム、ribopholin/粗面小胞体、58K/ゴルジ体) に対する抗体を用いて calumin が細胞内のどの細胞内小器官に発現しているのかを確認した。

### (4) 脂質染色

Oil red O および sudan black B を用いて組織中に存在する脂質の染色を行った。

## 4. 研究成果

Calumin 欠損マウスは E10.5 ~ E11.5 あたりで死亡することを確認している。そこでまず E8.5 ~ E10.5 における胎児の形態学的観察を行った。死亡時期が近付くにつれて様々な異常が生じてくるが、それらの異常より先にまず E9.0 ~ E9.5 にかけて卵黄囊における血管形成の異常が認められた。そこで

内皮細胞のマーカーである PECAM1、および壁細胞のマーカーである  $\alpha$  smooth muscle actin に対するそれぞれの抗体をもちいて免疫組織染色を行った。野生型では内皮細胞を囲むように壁細胞が付着している成熟した血管が認められたが、calumin 欠損マウスの卵黄嚢では壁細胞が認められず内皮細胞のみで形成された未成熟な血管しか認められなかった。さらに PECAM1 抗体を用いて卵黄嚢および胎児の whole mount 免疫組織染色を行った。野生型の卵黄嚢および胎児では太い血管から細い血管が分岐し、きめ細やかな血管網を形成していたが、calumin 欠損マウスでは血管形成は認められるものの、血管径が同様であり、血管形成が未熟であることが明らかになった。血管は内皮細胞によって de novo に脈管が形成される脈管形成 (vasculogenesis)、そしてその脈管の内皮細胞に分化してきた壁細胞が直接相互作用することで血管のリモデリングが引き起こされ、新しい管腔が作られる血管新生 (angiogenesis) が引き起こされ成熟していく。Calumin 欠損マウスの血管は発達が未熟であるものの、血管自体は認められていることから angiogenesis の過程に欠落があることが予想された。そこで胎児の paraaortic splanchnopleural (P-Sp) 領域を採取し、各種血管形成因子を添加した培地を用いて OP9 細胞上で培養することで血管形成能を評価した。この系では P-Sp からまず内皮細胞が分化し、vascular bed を形成する。この過程は vasculogenesis に相当する。さらに vascular bed から内皮細胞が vascular network を形成し、分化した壁細胞がリクルートしてくる。この過程が angiogenesis に相当することが知られている。Calumin 欠損マウスの胎児から採取した P-Sp を採取し、培養したところ野生型と同様に vascular bed、および vascular network の形成、そして壁細胞の分化が認められた。したがって calumin 欠損マウスは正常な血管形成能を有していることが明らかになった。この評価系では血管形成を起すための液性因子などが十分に供給された環境下で P-Sp が培養されている。Calumin 欠損マウスでは血管形成の異常が認められたが、血管形成能自体には障害ない。そこで血管形成を誘導する液性因子等の発現に欠落がある可能性が考えられた。そこでこの時期に重要な役割を担うことが知られている血管形成因子 (fibronectin、Ihh/Shh、BMP4、TGF $\beta$ ) の卵黄嚢における発現を調べた。その結果、野生型と calumin 欠損マウスの卵黄嚢における fibronectin、Ihh/Shh、BMP4、および TGF $\beta$  の発現に違いが認められなかった。以上

の結果から calumin 欠損マウスは正常な血管形成能および血管形成因子発現を有しており、血管形成の異常は二次的に引き起こされていることが強く示された。そこで卵黄嚢における calumin の発現を免疫組織染色にて観察したところ内胚葉細胞に特異的に発現していることが分かった。

胎児には胎盤を介して母親から栄養分が供給される。マウスでは胎生10.0日付近で胎盤が形成されるが、それより前の段階では卵黄嚢が栄養分を胎児に供給するために重要な役割を担っている。マウスでは卵黄嚢の外側に栄養分である卵黄が存在し、卵黄嚢は胎児を包み込んでいる (図1)。また卵

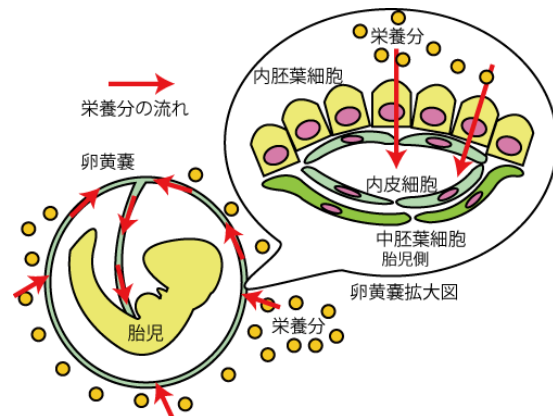


図1 卵黄嚢における栄養分吸収

黄嚢と胎児は卵黄動・静脈によって結ばれており、卵黄嚢で吸収された栄養分が胎児に供給される。卵黄嚢は主に内胚葉細胞、中胚葉細胞そして内皮細胞によって構成されている (図1)。内皮細胞が中胚葉細胞から分化し、血管を形成する。内胚葉細胞は栄養分である卵黄に接している。小腸上皮細胞は管腔側から栄養分を吸収し、血液へ受け渡す極性細胞であるが、内胚葉細胞も極性細胞としての性質を有し、小腸上皮細胞と類することが知られており、栄養の吸収・輸送に重要な役割を担っている。

そこで更に卵黄嚢を酵素処置し、内胚葉細胞と中胚葉細胞/内皮細胞の二つに分離し、それぞれの calumin の発現をウエスタンブロットングおよび RT-PCR 法にて調べたところ、内胚葉細胞に特異的に発現しており、免疫組織染色と同様の結果を得ることが出来た。さらに内胚葉細胞における calumin の細胞内局在を免疫組織二重染色法にて調べたところ、内胚葉細胞の基底膜側に位置する粗面小胞体に calumin が局在していることを確認できた。そこで calumin 発現が認められた内胚葉細胞における詳細な解剖学的な観察を電子顕微鏡を用いて行った

ところ、calumin 欠損マウスの内胚葉細胞の基底膜側に顕著な脂肪滴の貯留が認められた。さらに oil red O および sudan black B を用いた脂質染色でも内胚葉細胞に脂質が貯留していることを確認することが出来た。

Calumin 欠損マウスは顕著な血管形成異常がみとめられたが、栄養輸送能の欠落を起因として二次的に血管形成の異常が引き起こされていることが考えられる。また卵黄囊の内胚葉細胞や小腸の上皮細胞において吸収された脂質は小胞体内でコレステロールエステルやトリグリセリドなどといった中性脂肪へ合成される。そして中性脂肪は microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の働きによって apolipoprotein B (apo B) に付加されていく。そして内胚葉細胞では very low density lipoprotein (VLDL)、小腸上皮細胞ではキロミクロンとして小胞輸送によりゴルジ体を経由して放出される。興味深いことに MTP および apo B 欠損マウスでは calumin 欠損マウスと同様に内胚葉細胞において脂質の貯留が認められ、胎生 10.5 日付近で胎性致死となる。したがって本研究によって、calumin が脂質輸送に関与していることが強く示された。卵黄囊や小腸上皮細胞と同様に肝細胞も中性脂肪・VLDL を合成し、分泌する極性細胞として知られている。またこれらの小腸上皮細胞や肝細胞といった極性細胞において calumin 発現が高いことを確認しており、普遍的な役割を担っていることが考えられる。

#### 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 3 件)

① The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death.

Katano M, Numata T, Aguan K, Hara Y, Kiyonaka S, Yamamoto S, Miki T, Sawamura S, Suzuki T, Yamakawa K, Mori Y.

*Cell Calcium*. 51, 179-185 (2012).

10.1016/j.ceca.2011.12.011,

査読有

② TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance.

Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, & Takeshima H.

*Cell Metabolism*, 14, 231-2413 (2011).

10.1016/j.cmet.2011.05.011

査読有

③ TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>.  
Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y.

*Nature Chemical Biology*, 10, 701-711 (2011).

10.1038/nchembio.640

査読有

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 伸一郎 (YAMAMOTO SHINICHIRO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：10542102

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし