

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500451

研究課題名(和文)小胞体内腔タンパク質の酸化還元制御と神経機能

研究課題名(英文) Redox-dependent regulation of an endoplasmic reticulum resident protein in neural function

研究代表者

久恒 智博 (Hisatsune, Chihiro)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10321803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ERp44欠損マウスは、血圧を上げる作用をもつアンジオテンシンIIの濃度が低下して低血圧を示した。また、アンジオテンシンIIを分解するアミノペプチダーゼの1つERAP1が、小胞体内腔でERp44とジスルフィド結合し、ERp44欠損でERAP1が細胞外に多量に分泌され、その結果、アンジオテンシンIIを分解して低血圧を起こすことを明らかにした。また、敗血症のモデル実験では、ERp44とERAP1との相互結合が増加し、血圧低下を抑制した。以上の結果から、小胞体内腔に存在するERp44がERAP1の細胞の内外における局在を調節することでアンジオテンシン濃度を制御し、血圧を調節すると結論した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that ERp44, a factor involved in disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum (ER), regulates angiotensin II. In mice, genetic loss of ERp44 destabilizes angiotensin II and causes hypotension. We found that ERp44 forms a mixed disulfide bond with ERAP1, an aminopeptidase that cleaves angiotensin II. ERp44 controls release of ERAP1 in a redox-dependent manner to control blood pressure. Additionally, we found that systemic inflammation triggers ERAP1 retention in the ER to inhibit hypotension. These results suggest that ERp44 redox-dependently regulates the intra- or extra-cellular localization of ERAP1, which contributes the control of serum angiotensin II level and blood pressure.

研究分野：分子生物学

キーワード：酸化還元

1. 研究開始当初の背景

細胞に感染したウイルスや細菌は、細胞内のプロテアソームでペプチドへと分解され、小胞体内腔に輸送される。ロイシンアミノペプチダーゼの一つ ERAP1 は、小胞体内腔に輸送されたペプチドをさらに消化し、Major histocompatibility complex class I (MHC class I) 結合性ペプチドを供給し、MHC-class I の安定した細胞表面への発現を促すことが知られている (Elena G. 2006 *Nature Immunology*)。しかしながら、ERAP1 は ER 貯留シグナルを持たず、如何にして小胞体内腔に ERAP1 が存在するのか現在まで不明であった。

一方、申請者が在籍する研究室では、IP<sub>3</sub> 受容体結合タンパク質として ERp44 を同定し、ERp44 が IP<sub>3</sub> 受容体の活性を酸化還元・pH 依存的に制御することを明らかにしていた (Cell, 2005)。しかしながら、ERp44 のマウス個体レベルでの役割は明らかでなかった。

2. 研究の目的

ERp44 の成体マウスにおけるターゲット分子の解析とマウス個体レベルの表現型(脳高次機能)の解明を目的とした。

3. 研究の方法

ERp44 欠損マウスを C57BL/6 バックグラウンドで相同組み換え法を用いて作成した。また、C57BL/6 ERp44 ヘテロマウスを FVB バックグラウンドの野生型マウスと交配し、F2 FVB:C57BL6 バックグラウンドの ERp44 欠損マウスを作成した。

4. 研究成果

C57BL/6 バックグラウンド ERp44 欠損マウスは成体に 4 匹のみが成長し、それ以外のすべてのマウスが生後 24 時間以内に死亡した。そこで、マウスのバックグラウンドを FVB との交雑マウスに変えてみることにした。その結果、ほとんどすべての F2 FVB:C57BL6 バックグラウンドの ERp44 欠損マウスが、成体まで成長した。しかしながら、これらのミックスバックグラウンドが、行動解析や神経可塑性に影響する恐れがあるため、ERp44KO マウスの脳特異的 ERp44KO マウスを作成した。この脳特異的 ERp44KO マウスに関しては現在解析中である。

一方、P0 ERp44 欠損マウス (C57BL/6 および FVB:C57BL6 共に) の腎臓の尿細管の肥大・尿が少ないことを発見した為、マウスの血圧を測定した。その結果、野生型マウスに比べて低血圧であることが明らかになった (図 1A)。

そこで、レニン-アンジオテンシン系の異常があるかどうか次に検討する事にした。まず、アンジオテンシンの血液中の濃度を測定

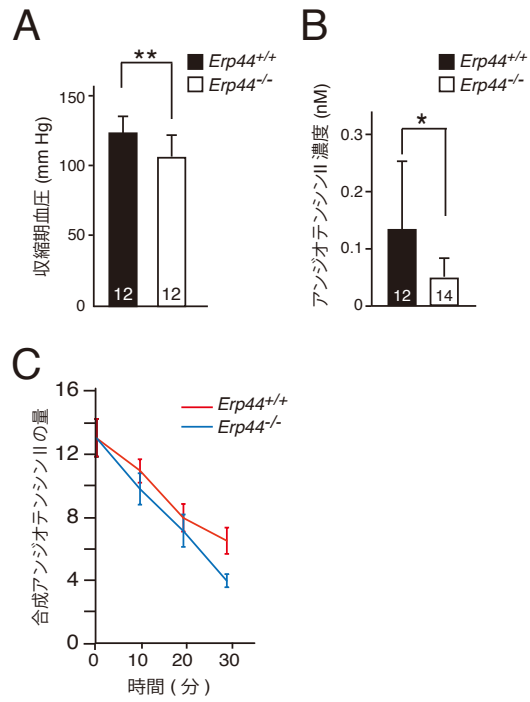


図 1 ERp44 欠損マウスは血中アンジオテンシン II 濃度が低下して低血圧を呈す  
 A: 野生型 (Erp44<sup>+/+</sup>) と ERp44 欠損マウス (Erp44<sup>-/-</sup>) の血圧  
 B: 血液中のアンジオテンシン II の濃度  
 C: 野生型 (Erp44<sup>+/+</sup>, 赤ライン) と ERp44 欠損マウス (Erp44<sup>-/-</sup>, 青ライン) の血清を用いた合成アンジオテンシン II の分解の様子

した結果、ERp44 欠損マウスの血中アンジオテンシン II の濃度が野生型より減少していることを明らかにした (図 1B)。しかしながら、アンジオテンシノーゲンや、レニン、ACE などの酵素の発現に異常はなかった。

次に、アンジオテンシンの血中における安定性を調べる為に、ERp44 欠損マウスの血清を用いて合成アンジオテンシン II の分解アッセイをおこなった。その結果、ERp44 欠損マウスの血清中で、合成アンジオテンシン II の分解速度が速いことを明らかにした (図 1C)。以上の結果から、ERp44 は小胞体内腔において様々な分子を小胞体貯留する機能があるため、ERp44 が不在ことでアンジオテンシンを分解する酵素が細胞外に分泌されると推定した。実際、血中におけるロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) 活性が顕著に上昇している事を明らかにした (図 2A)。

その分子を同定する為に、ERp44 の結合タンパク質のスクリーニングを肝臓の抽出液をもちいて行った。その結果、アミノペプチダーゼの一つ、ERAP1 を ERp44 結合分子として同定した。両者の結合は、酸化還元に依存しておりジスルフィド結合で結合していた (図 2B)。また、HeLa 細胞に強制発現させると両者は小胞体で共局在した。

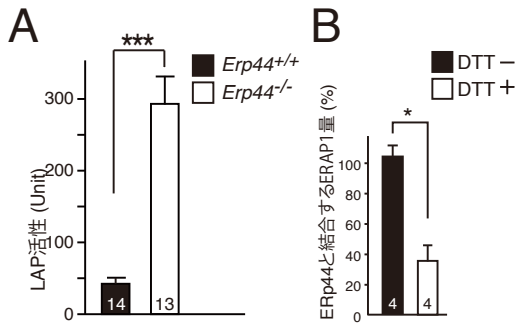


図2 ERp44 欠損マウスの血液中の LAP 活性の上昇 (A) と ERp44-ERAP1 結合量の DTT による変化 (B)

A: 野生型 (*Erp44*<sup>+/+</sup>) と ERp44 欠損マウス (*Erp44*<sup>-/-</sup>) の血液中の LAP 活性。  
 B: 還元剤 DTT の存在下では、ERp44 と ERAP1 の相互作用は低下する。

両者の結合部位を詳細に決めた所、ERp44 の 29 番目の Cysteine と ERAP1 の 475 番目の Cysteine であった。ERp44 が ERAP1 の小胞体貯留に果たす役割を明らかにする為に、ERAP1 と ERp44 を HeLa 細胞に発現させて、細胞外に分泌される ERAP1 の活性を測定した。その結果、ERp44 は ERAP1 の細胞外分泌を抑制することがわかった。また、変異型 ERp44 (C29S) は、ERAP1 の小胞体貯留能力が低下した。一方、変異型 ERAP1 (C475S) は、ERp44 による小胞体貯留が減少した。

また、ERp44<sup>-/-</sup>MEF を作成して、細胞外および細胞内に存在する ERAP1 を検出したところ、野生型 MEF に比較して細胞内の ERAP1 が減少し、細胞外に分泌された ERAP1 が増加することが明らかになった (図 3A)。また、ERp44<sup>-/-</sup>MEF に ERp44 を強発現させるとこの細胞外への ERAP1 の分泌が抑制された。

さらに、ERp44 欠損マウスの血中 ERAP1 が、野生型マウスよりも増加していることがわかった。また、ERAP1 を抗体で除去すると、ERp44 欠損マウスの血液にみられた LAP 活性の上昇がなくなり、合成アンジオテンシン II の分解速度が、野生型の血清と同じになることがわかった (図 3B)。

これらの実験結果より、ERp44 は ERAP1 を小胞体に貯留しており、ERp44 の欠損は ERAP1 の細胞外濃度を上昇させ、その結果アンジオテンシン II を分解し、低血圧をしめすことを示唆することがわかった。

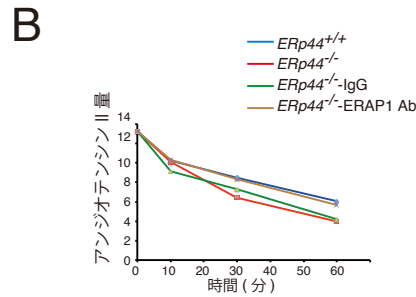
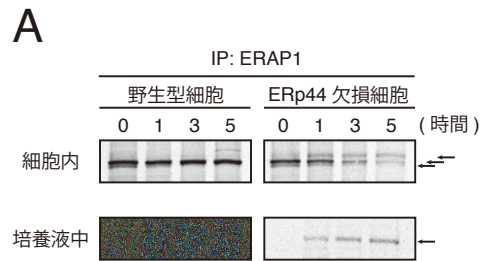


図3 S<sup>35</sup> 同位体ラベルした ERAP1 の細胞内での動態 (A) と ERp44 欠損マウスの血清から ERAP1 を抗体で除去したサンプルを用いたアンジオテンシン II の分解アッセイ (B)

A: 野生型の ERAP1 は 5 時間経っても、細胞内 (上パネル) に検出される。一方、ERp44 欠損細胞では細胞内の ERAP1 の量は減少し、培養液中 (下パネル) に検出されるようになる。矢印は分泌過程で糖鎖修飾を受けて異なる分子量をもった ERAP1。  
 B: ERAP1 を除去する (茶ライン) と野生型マウスの血清 (青ライン) を用いた分解速度と同じになる。

敗血症は細菌が血液中に侵入しておこる全身性の感染症であり、血圧の急激な低下を伴うことが知られている。この敗血症時に、ERp44-ERAP1 の結合がどのように変化するかをマウスのモデルを用いて調べた。その結果、ERp44-ERAP1 の結合が増加することがわかった (図 4A)。また、ERp44 を通常の半分しか持たない ERp44 ヘテロマウスは、ERAP1 を小胞体に留める能力が低下して、野生型よりもより大きな血圧低下を示すことがわかった (図 4B)。この結果から、ERp44 は敗血症発症時に ERAP1 と結合して細胞外への分泌を防ぐ事で、血圧低下に抑制的に働くことが明らかになった。

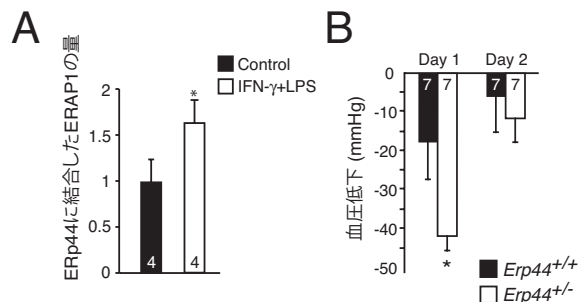


図4 敗血症時の ERp44 と ERAP1 の結合と 血圧低下への影響。

A: 敗血症 (IFN $\gamma$ +LPS) 誘導時の ERp44 と ERAP1 結合の増加。

B: 野生型と ERp44 ヘテロ欠損マウスにおける敗血症における血圧変化。各棒グラフの数は、マウスの数。

以上の結果から、ERp44 は、ERAP1 と小胞体内腔で酸化還元状態に依存して結合しており、ERAP1 を小胞体に貯留させることが明らかになった。また、その結合がはずれると ERAP1 は細胞外に分泌されてアンジオテンシン II を分解し、血圧の低下をもたらすことが明らかになった(図5)。

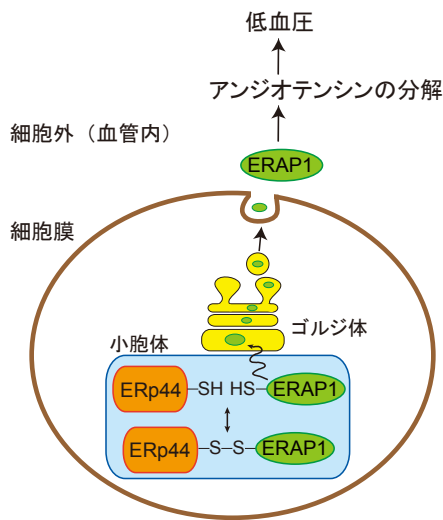


図5 モデル図

ERp44 は、ERAP1 (小胞体アミノペプチダーゼ 1) とジスルフィド結合を介して結合し、ERAP1 を小胞体に留める。ジスルフィド結合が還元されて ERp44 との結合が無くなると ERAP1 は細胞外に放出されて、アンジオテンシン II を分解して血圧に影響する。つまり、ERp44 は酸化還元により ERAP1 の細胞内・細胞外の局在を決定し血圧を調節する。

## 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 12 件)

1: Hisatsune C#., Ebisui E., Usui M., Ogawa N., Suzuki A., Mataga N., Takahashi-Iwanaga H., and Mikoshiba K#.

ERp44 exerts redox-dependent control of blood pressure at the endoplasmic reticulum.

*Molecular Cell* (2015) in press.

#Corresponding authors. 査読有り

doi:10.1016/j.molcel.2015.04.008

2: Kawaai K., Mizutani A., Shoji H., Ogawa N., Ebisui E., Kuroda Y., Wakana S., Miyakawa T., Hisatsune C#., Mikoshiba K. IRBIT is novel determinant of catecholamine homeostasis through the TH phosphorylation by CaMKII $\alpha$ .

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2015) in press.

査読有り doi: 10.1073/pnas.1503310112.

3: Klar J\* , Hisatsune C\* , Shahid M. Baig, Tariq M, Johansson C.V.A, Rasool M, Malik AN, Ameer A, Sugiura K, Feuk L, Mikoshiba K#, and Dahl N#.

Abolished InsP<sub>3</sub>R2 function inhibits sweat secretion in both humans and mice.

*J. Clin. Invest.*, (2014) 124(11):4773-80.

\* Co-first author. #Corresponding authors.

査読有り doi: 10.1172/JCI170720.

4: Hamada K, Terauchi A, Nakamura K, Higo T, Nukina N, Matsumoto N, Hisatsune C , Nakamura T, Mikoshiba K#. Aberrant calcium signaling by transglutaminase-mediated posttranslational modification of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111:

E3966-75. 査読有り

doi: 10.1073/pnas.1409730111.

5: Inaba T, Hisatsune C , Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisui E, Ogawa N, Matsui M, Takeuchi T, Mikoshiba K#, Tsubota K.

Mice lacking inositol 1,4,5-trisphosphate receptors exhibit dry eye. 査読有り

*PLoS One.* (2014) 9: e99205.

doi: 10.1371/journal.pone.0099205.

6: Hisatsune C#\* , Miyamoto H\* , Hirono M, Yamaguchi N, Sugawara T, Ogawa N, Ebisui E, Ohshima T, Yamada M, Hensch TK, Hattori M, Mikoshiba K# .

IP<sub>3</sub>R1 deficiency in the cerebellum /brainstem causes basal ganglia-independent dystonia by triggering tonic Purkinje cell firings in mice.

*Front. Neural Circuits.* (2013) 7: 156.

#Corresponding authors. \* Co-first author.

査読有り

doi: 10.3389/fncir.2013.00156.

7: Sugawara T, Hisatsune C# , Le TD, Hashikawa T, Hirono M, Hattori M, Nagao S, Mikoshiba K#.

Type 1 inositol trisphosphate receptor regulates cerebellar circuits by maintaining the spine morphology of Purkinje cells in adult mice.

*J. Neurosci.* (2013) 33: 12186-12196.

#Corresponding authors. 査読有り

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0545-13.

8: Hisatsune C#, Ogawa N, Mikoshiba K#. Striatum-specific expression of Cre recombinase using the Gpr88 promoter in mice.

*Transgenic Res.* (2013) 22: 1241-1247.  
#Corresponding authors. 査読有り  
doi: 10.1007/s11248-013-9711-x.

9: Sato-Miyaoka M\*, Hisatsune C\*#, Ebisui E, Ogawa N, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K#. Regulation of hair shedding by the type 3 IP<sub>3</sub> receptor.

*J. Invest. Dermatology.* (2012) 132:2137-2147.  
\* Co-first author. #Corresponding authors.  
査読有り  
doi: 10.1038/jid.2012.141.

10: Kuroda Y, Hisatsune C, Mizutani A, Ogawa N, Matsuo K, Mikoshiba K. Cot kinase promotes Ca<sup>2+</sup> oscillation/calcineurin-independent osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1 protein.  
*Mol. Cell Biol.* (2012) 32: 2954-2963. 査読有り  
doi: 10.1128/MCB.05611-11.

11: Drawnel FM, Wachten D, Molkentin JD, Maillet M, Aronsen JM, Swift F, Sjaastad I, Liu N, Catalucci D, Mikoshiba K, Hisatsune C, Okkenhaug H, Andrews SR, Bootman MD, Roderick HL.

Mutual antagonism between IP<sub>3</sub>R2 and miRNA-133a regulates calcium signals and cardiac hypertrophy.  
*J. Cell Biol.* (2012) 199: 783-798. 査読有り  
doi: 10.1083/jcb.201111095.

12: Staats KA, Bogaert E, Hersmus N, Jaspers T, Luyten T, Bultynck G, Parys JB, Hisatsune C, Mikoshiba K, Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L.  
Neuronal overexpression of IP<sub>3</sub> receptor 2 is detrimental in mutant SOD1 mice.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) 429: 210-213. 査読有り  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
久恒 智博 (HISATSUNE Chihiro)  
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員  
研究者番号 : 10321803

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :