

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790073

研究課題名(和文)極性細胞の脂質輸送におけるカルミンの役割の解明

研究課題名(英文)Analysis for role of calumin in lipid transport of polarized cells

研究代表者

山本 伸一郎 (Yamamoto, Shinichiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10542102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)： Calumin は小胞体膜タンパク質であり、その欠損マウスは胎生致死になることから生体内で必須の役割を担っていることが分かっている。しかしその生理的役割は不明なままである。

小胞体はタンパク質を合成する場所であり、小胞体の恒常性を維持するために小胞体はタンパク質品質管理機構である ER-associated degradation (ERAD) を備えている。本研究にて calumin が ERAD に関与し、胎児期におけるその重要性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)： Calumin is a novel ER-resident protein. Disruption of calumin gene in mice cause s embryonic lethality, suggesting that calumin plays the indispensable physiological role. But, the physiological role of calumin is not clear.

To maintain ER homeostasis, ER is equipped with ERAD functioning as protein quality control system. This study suggests not only the importance of calumin in ERAD but also the significance of ERAD in visceral e ndoderm cells functioning as the very few secretory cells around the embryonic day when calumin-knockout m ice die.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ERAD

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の所属研究室で発見された calumin は小胞体一回膜貫通タンパク質である。Calumin 欠損マウスは胎生 10.5 日付近で胎性致死となることから calumin は生体内において必須の役割を担っていることが考えられるが、その詳細な生理機能は不明である。また、calumin 欠損マウス胎児は発育および血管形成の遅延が認められていた。しかし詳細な検討の結果血管形成の異常は二次的に引き起こされていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

Calumin はこの時期には卵黄嚢の内胚葉細胞の粗面小胞体に発現しており、calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞において脂質の貯留が認められた。内胚葉細胞は脂質輸送などを行う極性細胞であり、本申請研究においては脂質輸送に着目し、calumin の生理機能の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### ・相互作用分子の探索

マウス小腸上皮細胞から得たマイクロソームに対し、抗 calumin 抗体を用いて免疫沈降を行った。調整したサンプルを SDS-PAGE ・銀染色後、特異的なバンドを LC-MS/MS にて分子同定を行った。

### ・ Cycloheximide chase assay

$\alpha 1$  antitrypsin Hong Kong null mutant (NHK) 発現ベクターを HEK 293 細胞にトランスフェクションした。その 24 時間後、細胞に cycloheximide (50  $\mu$ g/ml) を処置し、経時的な NHK の発現変化をウエスタンブロットにて確認した。

### ・ Cholera toxin retro-translocation assay

HEK 293 細胞に cholera toxin (10 nM) を処置し、45 および 90 分後に小胞体から細胞質中に retro-translocation する cholera toxin の発現量をウエスタンブロットにて確認した。

### ・ 解剖学的観察

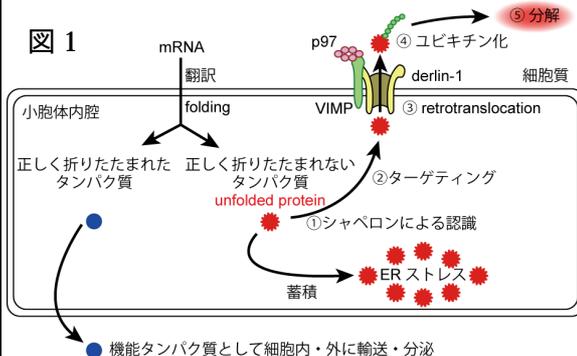
免疫組織染色および電子顕微鏡を用いて観察を行った。

## 4. 研究成果

内胚葉細胞と同様な機能を有する小腸上皮細胞において calumin 発現が認められ、内胚葉細胞と同様に粗面小胞体に局在していた。そこで小腸上皮細胞において calumin と相互作用する分子を共免疫沈降法と LC-MS/MS を用いて探索し、calumin の生理的役割の解明を試みた。その結果 ER-associated degradation (ERAD) へ関与する

ことが示唆されている分子を同定できた。タンパク質は機能タンパク質になるために小胞体内で翻訳後折りたたまれ、立体構造を構築し輸送される。折りたたまれず機能タンパク質になれないタンパク質 (unfolded protein) は小胞体内で蓄積しないよう ERAD によって分解される。ERAD の機能異常は unfolded protein を蓄積し、ER ストレスを惹起し、最終的には細胞死を引き起こすことが知られている。ERAD には unfolded protein の認識、targeting、小胞体から細胞質への移動 (retro-translocation)、ユビキチン化そして分解の 5 つの工程が存在する (図 1)。そこでこれ

図 1

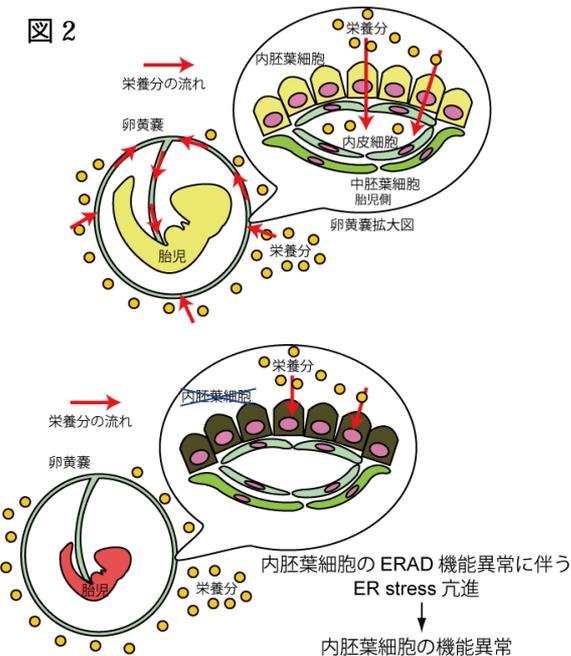


機能タンパク質として細胞内・外に輸送・分泌

らの工程に関与する分子と calumin の相互作用を免疫沈降法にて確認したところ retro-translocation を行う分子である p97、VIMP、derlin-1 や derlin-2 との相互作用が認められた。次に HEK 293 細胞を用いて calumin の ERAD への機能的な関与の検討を行った。その検討を行うにあたり、小腸上皮細胞で認められた calumin と相互作用する分子を HEK 293 細胞でも確認したところ、同様に calumin と p97、VIMP、derlin-1 や derlin-2 との相互作用が認められた。まず、ERAD の基質である NHK を用いた cycloheximide chase assay を行ったところ、siRNA を用いて calumin 発現を低下させた HEK 293 細胞では NHK の分解能が低下していた。また cholera toxin retro-translocation assay を行ったところ calumin 発現を低下させた HEK 293 細胞では cholera toxin の小胞体から細胞質への retro-translocation が抑制されており、calumin が機能的にも ERAD に関与することを確認できた。更に calumin の発現低下に伴う ERAD の機能低下は ER ストレスを惹起した。以上の結果から calumin は ERAD の一員として重要な役割を果たしており、その機能異常は ER の恒常性の破綻につながることを in vitro レベルで明らかにすることができた。

そこで calumin の in vivo な重要性を明らかにするために calumin 欠損マウスを用いた検討を行った。Calumin 欠損マウスは胎生 10.5 日付近で胎性致死となるが、胎生 9.5 日において calumin と相互作用が認められた retro-translocation を行う分子である VIMP、derlin-1 や derlin-2 は calumin と同様に主に卵黄嚢の内胚葉細胞に発現しており、この時期の卵黄嚢の内胚葉細胞における

ERAD の重要性を確認することができた。さらに小胞体膜タンパク質である VIMP と derlin-1 は卵黄嚢の内胚葉細胞の粗面小胞体に calumin と共同在していることを免疫組織染色にて確認することができた。最後に calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞における ERAD 機能異常によって引き起こされる表現系の探索を行った。Calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞において ER ストレス応答の一つである NF-kB の活性化を伴った ER overload response が認められた。また電子顕微鏡を用いて ER の構造を観察したところ、ER ストレスの亢進に認められることが報告させている ER の断片化やリボソームの脱離などといった ER の形態異常が calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞において認められた。また上記の「研究の目的」にも記したように calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞に脂質の貯留が認められており、当初は脂質輸送に着目していた。細胞内における脂質の貯留は ER ストレスの亢進によって認められる表現系であることが知られている。Calumin 欠損マウスの卵黄嚢の内胚葉細胞において認められた脂質の貯留は ERAD 機能異常とそれに伴う ER ストレスの亢進によって引き起こされることが考えられる。



このようにこれまで生理的役割が全く明らかにされていなかった calumin の ERAD における重要性と、発生段階の卵黄嚢の内胚葉細胞の ER の恒常性の維持における calumin を含んだ ERAD の重要性を本研究にて明らかにすることができた。卵黄嚢の内胚葉細胞は頂端膜側から栄養分を吸収し、基底膜側に存在する血管に養分を放出する。そしてその養分は胎児に供給される。したがって卵黄嚢の内胚葉細胞は小腸上皮細胞と同様な働きをし、胎盤形成前の胎児への栄養供給・発育に必須の役割を果たしている (図 2)。

また卵黄嚢の内胚葉細胞は様々なタンパク質を合成し、分泌する分泌細胞である。分泌細胞はタンパク質合成が盛んに行われており、ERAD などといったタンパク質品質管理機構が ER の恒常性の維持に重要な役割を担っている。したがって calumin 欠損による ERAD の機能異常・ER ストレスの亢進が引き起こされると ER の恒常性の破綻に伴う内胚葉細胞の機能低下が惹起されることが考えられる。このような胎盤形成前の胎児の発育のための栄養供給に必須の役割を果たしている卵黄嚢の内胚葉細胞の機能低下により発育および、血管形成の遅延が引き起こされ、最終的に胎生致死に至っていることが考えられる (図 2)。

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 1 件)

TRIM50 protein regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells.

Nishi M, Aoyama F, Kisa F, Zhu H, Sun M, Lin P, Ohta H, Van B, Yamamoto S, Kakizawa S, Sakai H, Ma J, Sawaguchi A, Takeshima H.

*The Journal of Biological Chemistry*, 287, 33523–33532 (2012).

10.1074/jbc.M112.370551

〔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：  
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

山本 伸一郎 (Yamamoto Shinichiro)

研究者番号 : 10542102

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :