

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440060

研究課題名(和文) シス型プロリン残基をもつ分泌タンパク質の小胞体における品質管理

研究課題名(英文) Quality control of secretory proteins containing proline residues in the cis form

研究代表者

小亀 浩市 (KOKAME, KOICHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：40270730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を構成するプロリン残基の異性化反応は、タンパク質の構造形成と機能発現に重要である。本研究は、シス型プロリン残基をもつ分泌タンパク質の品質管理における異性化の役割解明を目的とした。以前我々がシス型プロリン残基4個の存在を見出したADAMTS13-MTCSドメインをモデルタンパク質として利用した。培養細胞およびマウスを用いた実験から、MTCSドメインの分泌には小胞体cyclophilin Bによるプロリン異性化が重要であることが分かった。また、少なくとも一部のcyclophilin Bは小胞体関連分解(ERAD)タンパク質複合体と結合し、ERADに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Catalysis of cis-trans isomerization of proline residues is often necessary for proper protein folding and function. This study was aimed at understanding the functional importance of the proline isomerization in the quality control of secretory proteins. We used MTCS domains of ADAMTS13 that contain four proline residues in the cis form as a model protein. As the results using cultured cells and mice, it was revealed that the proline isomerization catalyzed by cyclophilin B in the endoplasmic reticulum was important for the secretion of the MTCS domains. At least a subset of cyclophilin B molecules were associated with the protein complexes involved in endoplasmic reticulum-associated degradation.

研究分野：血栓止血学、細胞ストレス応答学

キーワード：タンパク質品質管理 小胞体 プロリン異性化酵素 ADAMTS13

1. 研究開始当初の背景

成熟したタンパク質では、プロリン残基N末端側のペプチド結合がシス型になっていることがある。プロリン残基のシス-トランス異性化は、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) という一群の酵素によって触媒される反応であり、そのタンパク質の立体構造形成(フォールディング)と機能発現にとって重要である。

我々は以前、分泌型メタロプロテアーゼ ADAMTS13 において基質認識を担う DTCS ドメインの立体構造を決定し、シス型プロリン残基4個を同定した。血漿 ADAMTS13 活性の低下は血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)の原因となる。我々は先天性 TTP 患者の約50家系に ADAMTS13 遺伝子変異を発見したが [PNAS 99, 11902 (2002); JTH 9, 1654 (2011); 他]、変異の多くは ADAMTS13 の細胞外分泌不全をもたらすことから、合成された変異体は小胞体のタンパク質品質管理機構である小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD)で処理されると考えられる。

ERAD は小胞体膜や内腔に生じた構造異常タンパク質を積極的に分解処理する細胞機能である。異常タンパク質を正常タンパク質と区別して認識し、それを細胞質に輸送し、プロテアソームに分解させる。これらの過程では多数のタンパク質が協調的に機能する。最近我々は ERAD に関連する遺伝子のノックアウトマウス3系統を作製し、Herp 欠損マウスは小胞体ストレスに対して脆弱であること、Derlin-1 欠損は胎性致死となり、Derlin-3 欠損は正常に発育することを示した [PLOS ONE 7, e34298 (2012)]。

PPIase に分類される酵素のうち、cyclophilin B (CypB) は小胞体におけるタンパク質フォールディングに重要である。ERAD では、内腔に生じた異常タンパク質を細胞質に輸送する際に、高次構造をほどこす必要がある。このときに CypB のプロリン残基異性化活性が役立つ可能性がある。しかし、CypB の関与を想定した ERAD 研究は国内外とも見当たらない。

2. 研究の目的

ADAMTS13 におけるシス型プロリン残基の存在と重要性を我々は見出し、一方でタンパク質品質管理における PPIase に関する知見が乏しいという現状を考慮し、本研究、すなわち小胞体における PPIase の働きをタンパク質のフォールディングと ERAD の両面から解析するという計画を立案した。

この研究計画では、これまでに我々が研究対象としてきた ADAMTS13 や Herp 等に関する試料と知見が格好の研究ツールとなる。そこで、シス型プロリン残基をもつ分泌タンパク質のモデルとして ADAMTS13 を利用し、分泌タンパク質のフォールディングに対する

CypB 等の寄与を解析する。医学分野にも貢献できる成果を想定しながら、シス型プロリン残基をもつ分泌タンパク質に対する小胞体の品質管理機構を、フォールディングと分解処理の両面から明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

まず、シス型プロリン残基をもつ分泌タンパク質のモデルとして組換え ADAMTS13-MDTCs ドメイン(MDTCs)を利用し、そのフォールディングに対する PPIase の関与を調べた。正常にフォールディングした MDTCs の量は、細胞外に分泌された MDTCs 量の測定で見積もることができる。MDTCs を恒常的に発現する CHO 細胞を、cyclophilin 阻害剤であるシクロスポリン A 存在下で培養し、培地に蓄積する MDTCs 量を抗体および ADAMTS13 特異的合成基質で定量した。一方、FKBP (cyclophilin 群と異なる PPIase 群)阻害剤である FK506 の効果も調べ、MDTCs の分泌が PPIase 群の中でも cyclophilin 群に特異的であるか否かを検討した。また、小胞体 PPIase である CypB の発現を抑制する siRNA で同細胞を処理し、MDTCs の分泌量に対する影響を調べた。

次に、MDTCs 発現細胞に CypB および不活性型 CypB(R95A 変異体)を過剰発現させ、MDTCs 分泌量への影響を検討した。また、CypB の siRNA 存在下、あるいはシクロスポリン A 存在下で MDTCs 発現細胞を培養し、MDTCs の分泌や細胞内蓄積等を調べ、小胞体関連分解(ERAD)阻害処理の影響も解析した。

さらに、マウス個体に対するシクロスポリン A の効果を調べるため、シクロスポリン A を腹腔投与後、経時的にマウス血液を少量採取し、ADAMTS13 活性を測定した。

また、CypB と ERAD の関連性を調べるため、マウス肝臓の ERAD 関連タンパク質複合体をタンパク質科学的に分析した。マウス腹腔にツニカマイシンを投与することで肝臓に小胞体ストレスを与えたのち、肝臓を摘出し、その小胞体膜画分を調製した。界面活性剤で可溶化し、種々の抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。

4. 研究成果

MDTCs を恒常的に発現する CHO 細胞を、cyclophilin 阻害剤であるシクロスポリン A 存在下で培養し、培地に蓄積する MDTCs 量を抗体および ADAMTS13 特異的合成基質で定量した結果、シクロスポリン A の用量依存的に MDTCs の分泌量が減少することが明らかになった。一方、FKBP 阻害剤である FK506 の効果は弱かったため、MDTCs の分泌は PPIase 群の中でも cyclophilin 群に特異的であると考えられた。次に、CypB に対する siRNA で同細胞を処理した結果、CypB の細胞内発現量の減少とともに、MDTCs の分泌量も減少した。細胞質の代表的 PPIase である CypA に対する siRNA 処理では、CypA の発現量は減少したも

の、MDTCS の分泌量はほとんど影響を受けなかった。したがって、MDTCS の正常な分泌にはプロリン残基のシス化が必要であり、その反応は主に CypB が担うことが明らかになった。

MDTCS 発現細胞に CypB および不活性型 CypB (R95A 変異体) を過剰発現させても、MDTCS 分泌量は変化しなかった。小胞体に内在する CypB 量は十分であり、不活性型 CypB は正常 CypB の働きを阻害しないらしい。CypB の siRNA 存在下、あるいはシクロスポリン A 存在下で培養した MDTCS 発現細胞では、MDTCS の分泌量は減少するものの、細胞内には蓄積しておらず、ERAD 阻害処理でも細胞内の量は変化しなかった。つまり、CypB 機能低下に伴う MDTCS 分泌量の減少に ERAD は強く関わっていない可能性が考えられた。

マウス個体に対するシクロスポリン A 投与の効果、血中 ADAMTS13 活性を指標にして調べたが、非投与群に比べて有意な差は見られなかった。

マウス肝臓の ERAD 関連タンパク質複合体を分析した結果、少なくとも一部の CypB は小胞体で複数種の ERAD 複合体と結合していることが明確になった。つまり、ERAD を構成する機能的段階のいずれかに CypB が関与することが示唆された。

小胞体 CypB の活性を阻害するシクロスポリンは、免疫抑制剤として使用されている。ADAMTS13 遺伝子異常を伴わない TTP 関連疾患として臓器移植後血栓性微小血管症が問題になっているが、発症機序は不明であり、免疫抑制剤が関与する可能性もある。また、TTP 発症原因の多くを占める抗 ADAMTS13 自己抗体の産生に ADAMTS13 のシス型プロリン残基が関与する可能性もある。将来、本研究の成果が医学分野に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1) Deletion of Herpud1 enhances heme oxygenase-1 expression in a mouse model of Parkinson's disease: Le TM, Hashida K, Ta HM, Takarada-Iemata M, Kokame K, Kitao Y, Hori O. Parkinsons Dis 2016, 6163934 (2016) 査読有
DOI: 10.1155/2016/6163934.

2) Ndr1 is a T cell clonal anergy factor negatively regulated by CD28-costimulation and interleukin-2: Oh YM, Park HB, Shin JH, Lee JE, Park HY, Kho DH, Lee JS, Choi H, Okuda T, Kokame K, Miyata T, Kim IH, Lee SH, Schwartz R, Choi K. Nat Commun 6, 8698 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/ncomms9698.

3) Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients

with Upshaw-Schulman syndrome: Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Mol Genet Genomic Med 2, 240-244 (2014) 査読有
DOI: 10.1002/mgg3.64.

4) NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury: Larkin J, Chen B, Shi XH, Mishima T, Kokame K, Barak Y, Sadovsky Y. Endocrinology 155, 1099-1106 (2014) 査読有
DOI: 10.1210/en.2013-1425.

5) A deficiency of Herp, an endoplasmic reticulum stress protein, suppresses atherosclerosis in apoE knockout mice by attenuating inflammatory responses: Shinozaki S, Chiba T, Kokame K, Miyata T, Kaneko E, Shimokado K. PLOS ONE 8, e75249 (2013) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0075249.

6) The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages: Satoh Y, Yokota T, Sudo T, Kondo M, Lai A, Kincade PW, Kouro T, Iida R, Kokame K, Miyata T, Habuchi Y, Matsui K, Tanaka H, Matsumura I, Oritani K, Kohwi-Shigematsu T, Kanakura Y. Immunity 38, 1105-1115 (2013) 査読有
DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.014.

7) Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism: Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. J Thromb Haemost 11, 1399-1406 (2013) 査読有
DOI: 10.1111/jth.12279.

[学会発表](計 33 件)

1) ADAMTS13 assays, the need for multicenter studies: Kokame K, Kremer Hovinga JA. The 61th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.

2) 先天性 TTP (USS) の分子診断: 小亀浩市. 第 9 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2015 年 2 月 28 日.

3) ダイレクトシーケンシング, 定量 PCR, 次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析: 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日.

4) VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識: 小亀浩市. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日-17 日.

5) 日本における先天性 ADAMTS13 欠損症の遺伝子解析: 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 11-13 日.

6) Quantitative PCR assay demonstrated exon deletions of ADAMTS13 in two unrelated patients with Upshaw-Schulman syndrome. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, The Netherlands, June 29-July 4, 2013.

7) ADAMTS13 の正常な分泌にはシクロフィリン B によるプロリン残基異性化が必要である: 小亀浩市, 秋山正志, 宮田敏行. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 山形, 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日.

〔その他〕

ホームページ

www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小亀 浩市 (KOKAME KOICHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号: 40270730

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

樋口 由佳 (HIGUCHI YUKA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号: 30443477