

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15685

研究課題名(和文) 滑膜細胞における小胞体ストレス応答の解明と顎関節症への応用

研究課題名(英文) identification of role of endoplasmic reticulum stress response in synoviocyte and its application to the treatment of temporomandibular disorder.

研究代表者

西頭 英起 (Nishitoh, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節症は様々な原因で発症するが、共通してみられる病理所見が滑膜細胞の過増殖と活性化である。この滑膜細胞過増殖の原因遺伝子として、小胞体品質管理に関わるE3ユビキチンリガーゼ Synoviolin/HRD1が同定されている。これまでの小胞体品質管理機構に関する研究により、HRD1がユビキチン様タンパク質NEDD8による翻訳後修飾を受け、その活性化が制御されることを示唆する知見を得た。本研究では、HRD1の翻訳後修飾NEDD化による活性制御メカニズムを明らかにし、顎関節症の新規治療法の開発に繋がる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Although temporomandibular joint disease develops with various causes, common pathological findings are the overgrowth and activation of synovial cell. The E3 ubiquitin ligase Synoviolin / HRD1 involved in endoplasmic reticulum quality control has been identified as the cause of this synovial cell overgrowth. We have studied the mechanism of the endoplasmic reticulum quality control mechanism. Our results suggest that HRD1 is post-translationally modified by the ubiquitin-like protein NEDD8 and its activation is controlled by its neddylation. In this study, we clarified the mechanism of HRD1 activation by the post-translational modification. Our knowledge may shed light on the to the development of novel treatment for temporomandibular disorder.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症は様々な原因で発症するが、共通してみられる病理所見が滑膜細胞の過増殖とそれに伴う軟骨変性、骨破壊、線維化である。同様の所見がみられる関節リュウマチの原因遺伝子として、小胞体膜局在型 E3 ユビキチンリガーゼ Synoviolin/HRD1 が同定された。そのメカニズムとして、HRD1 の過剰発現およびそれに伴う活性化が、滑膜細胞の過増殖に繋がることが明らかにされている。従って、HRD1 の活性化メカニズムを明らかにすることは、滑膜細胞の増殖制御を可能にすると考えられ、顎関節症の克服に向けた全く新たな治療法の確立に繋がると期待された。

研究開始までに申請者は、一貫して小胞体品質管理メカニズムの解明に取り組んできた (Nishitoh et al. Genes Dev 2002, 2008, Homma et al. Mol Cell 2013)。小胞体内の不良タンパク質蓄積による小胞体ストレスは、多くの疾患の病態分子メカニズムに関与する。この小胞体品質管理がどのように制御されているかについては不明な点が多く、研究対象として興味深い。小胞体内不良タンパク質の蓄積は、タンパク質の翻訳抑制、小胞体特異的シャペロンの発現誘導による refolding、小胞体からの不良タンパク質分解 (ER-associated degradation: ERAD) により緩和される。しかしこれらの小胞体品質管理メカニズムが破綻すると、過度な小胞体ストレスとなり様々な疾患の発症原因となる。従って、小胞体品質管理メカニズムの理解は、顎関節症や関節リュウマチなどの炎症性疾患をはじめ、多くの小胞体ストレスが関与する疾患克服のためにも重要であった。

## 2. 研究の目的

顎関節症は様々な原因で発症するが、共通してみられる病理所見が滑膜細胞の過増殖と活性化である。この滑膜細胞過増殖の原因遺伝子として、小胞体品質管理に関わる E3 ユビキチンリガーゼ Synoviolin/HRD1 が同定されている。一方、申請者はこれまで小胞体品質管理機構に関する研究に取り組んでおり、その過程で HRD1 がユビキチン様タンパク質 NEDD8 による翻訳後修飾を受け、その活性化が制御されることを示唆する知見を得ている。そこで本研究では、HRD1 の翻訳後修飾 NEDD 化による活性制御メカニズムを明らかにすることで、顎関節症の新規治療法の開発に繋げることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、「小胞体ストレスにおける HRD1 の NEDD 化と Ub 化のメカニズムと意義」「個体レベルでの Derlin-1-CSN-HRD1 経路の生理的意義」を明らかにするとともに、滑膜細胞での病態生理学的意義を解明することを目指し、下記項目に従い研究を推進した。

(1) HRD1 の Ub 化・NEDD 化部位と Ub 鎖の

同定: 生化学的に Ub 化・NEDD 化様式を検証した。

(2) HRD1-Ub 化の ER 品質管理における役割解明: HRD1-/-MEF 細胞への各変異型 HRD1 発現系、ミクロソームを用いた in vitro ERAD アッセイ系により、Ub 化・NEDD 化の E3 活性への役割を検証した。

(3) HRD1 の Ub 化と NEDD 化 E3 スクリーニング: HeLa 細胞に GFP-Ub または GFP-NEDD8 と HRD1 を発現させ、抗体を用いて plate に HRD1 を固定化し GFP 蛍光を測定することで、HRD1Ub と HRD1NEDD を定量化することを試みた。その後、E3-siRNA ライブラリースクリーニングを進めた。

(4) 関節腔炎症惹起による顎関節症モデルマウスによる解析: 関節リュウマチと肝硬変において、滑膜細胞と線維芽細胞における HRD1 活性亢進の関与が報告されている。従って、両細胞における HRD1 の Ub 化と NEDD 化を標的とした活性制御を可能にすることは、疾患克服の分子標的の発見に繋がる。そこで、結合障害ペプチドを滑膜細胞または線維芽細胞特異的に発現するマウスを作製し、関節腔への炎症惹起モデル実験により HRD1 の関与を検討することとした。

## 4. 研究成果

(1) HRD1 の Ub 化と NEDD 化部位の決定: HRD1 は 6 回貫通タンパク質で、N 末端と C 末端が細胞質側を向き、E3 活性中心である Ring 領域は C 末端に位置する。この領域を含め、Ub 化、NEDD 化されうるリジン(K)残基はわずか 5ヶ所である。そこで、これらのアミノ酸変異を全ての組み合わせで作製し、HEK293 細胞を用いた過剰発現系で Ub 化と NEDD 化を検証した結果、2ヶ所は NEDD 化されていることが明らかとなった。

(2) Ub 鎖の同定: K6, K11, K29, K48, K63, 直鎖型等の HRD1-Ub 化様式を生化学的に明らかにした。

(3) HRD1-Ub 化の ER 品質管理における役割解明: HRD1-/-MEF 細胞に、上記各変異型 HRD1 をレトロウィルスで遺伝子導入し、ERAD 基質の分解速度を [35S]-Met パルスラベルにより測定し、ERAD における Ub 化と NEDD 化の役割を明らかにした。また、小胞体ストレス負荷時の細胞生存率を測定し、小胞体品質管理を介した細胞機能恒常性の獲得能を検証した。その結果、HRD1 の Ub 化は、ERAD に対して抑制的に機能し、HRD1 の安定性に寄与することが明らかとなった。

(4) HRD1 のタンパク質安定化と E3 活性への Ub 化の関与の検討: Ub 化が HRD1 のタンパク質安定性 (あるいは分解) に関与している可能性を [35S]-Met パルスラベルにより検討し、実際に Ub によって不安定化されることが示唆された。また、E3 活性への影響については、イヌ脾臓由来ミクロソームを用いた系で、in vitro で HRD1 の E3 活性を測定する実験系の構築を試みた。具体的には、in vitro

translationによりHRD1をミクロソーム膜上に、ERAD 基質をミクロソーム内腔に合成した。その後、リコンビナント E1・E2、さらに ATP と p97 複合体を加えることで、ERAD 基質の逆輸送 Ub 化を検証した。

(5) HRD1 の Ub 化と NEDD 化 E3 スクリーニング系の構築：我々は、以前ストレス MAP キナーゼ ASK1 の分解に関与する分子の siRNA スクリーニング系の立ち上げに成功している。これを応用し、HeLa 細胞に GFP-Ub または GFP-NEDD8 と HRD1 を発現させ、抗体を用いて plate に HRD1 を固定化し、その GFP 蛍光を測定することで、HRD1Ub と HRD1NEDD を定量化する系を構築した。

(6) Derlin-1 と CSN3 結合領域のマッピング：HEK293 細胞を用いた過剰発現系で、Derlin-1-C 末端と CSN3 のそれぞれの結合最小領域を同定した。さらに、マッピングされた領域ペプチドを発現させ、Derlin-1-CSN3 結合の競合的阻害による、脱 NEDD 化阻害による HRD1Ub への影響を確認した。

(7) Derlin-1-CSN3 結合ペプチドの cTg マウス作製：CSN は多様な役割を担っており、そのコンポーネントの欠失は、酵母からマウスに至るまで致死性である。そこで、CSN の ERAD-E3 への機能だけを阻害するために、上記マッピングペプチドを Cre-loxP により組織特異的に発現させる cTg マウスの作製を開始している。

(8) HRD1 の Ub 化と NEDD 化 E3 スクリーニング：HRD1Ub と HRD1NEDD を定量化する系を用いて、HRD1 の Ub 化と NEDD 化に関与する E3 を同定し、その機能解析を行っている。さらに、同定された分子について、上記の関節腔炎症惹起モデルマウスに関節腔への shRNA ウィルス直接投与方法を確立し、疾患モデルおける評価を可能にした。

## 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9件)

Fujisawa T, Takahashi M, Tsukamoto Y, Yamaguchi N, Nakoji M, Endo M, Kodaira H, Hayashi Y, Nishitoh H, Naguro I, Homma K, Ichijo H: The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 25:245-253 (2016) 査読有り

Satrimafitrah P, Barman HK, Ahmad A, Nishitoh H, Nakayama T, Fukagawa T, Takami Y: RbAp48 is essential for viability of vertebrate cells and plays a role in chromosome stability. *Chromosome Res.* 24:161-173 (2016) 査読有り

Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T,

Takami Y, Satrimafitrah P, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, Nishitoh H: Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP. *Cell Rep.* 13:944-956 (2015) 査読有り  
Fujisawa T, Yamaguchi N, Kadowaki H, Tsukamoto T, Tsuburaya N, Tsubota A, Takahashi H, Naguro I, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H: A systematic immunoprecipitation approach reinforces the concept of common conformational alterations in amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Neurobiol. Dis.* 82:478-486 (2015) 査読有り

Kato H, Nishitoh H: Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. *Front. Oncol.* (review article) 5:93 eCollection (2015) 査読有り

Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Nakayama T: Histone acetyltransferase PCAF is involved in transactivation of Bcl-6 and Pax5 genes in immature B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467:509-513 (2015) 査読有り

Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: Paired box gene 5 isoforms A and B have different functions in transcriptional regulation of B cell development-related genes in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:426-431 (2015) 査読有り

Kikuchi H, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nakayama M, Takami Y, Nishitoh H, Nakayama T: Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463:870-875 (2015) 査読有り

Kikuchi H, Nakayama M, Kawai C, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: The histone acetyltransferase p300/CBP-associated factor acts as an effective suppressor of secretory immunoglobulin synthesis in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:243-247 (2015) 査読有り

### [学会発表](計15件)

西頭英起、小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の分解機構、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016.6.15-17、京都国際会議場（京都府・京都市）

Hideki Nishitoh、Structural and mechanistic basis of the protein disulfide bond formation networks in mammalian cells、新生鎖の生物学国際会議、2016/9/1-3、富士レークホテル（山梨県・南都留郡）

Hisae Kadowaki、Hideki Nishitoh、Molecular mechanism of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced preemptive quality control、新生鎖の生物学国際会議、2016/9/1-3、富士レークホテル（山梨県・南都留郡）

西頭英起、Derlin family proteins-mediated novel ER quality control system、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25-27、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

門脇寿枝、西頭英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 11 回小胞体ストレス研究会、2016/10/10-11、岐阜大学サテライトキャンパス（岐阜県・岐阜市）

Hisae Kadowaki、Hideki Nishitoh、Molecular mechanism of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced preemptive quality control、EMBO conference、2016/10/23-27、PGA Catalunya hotel（スペイン・ジローナ）

門脇寿枝、西頭英起、小胞体の予防的品質管理における新規合成タンパク質の分解機構、第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30-12/2 パソフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

西頭英起、小胞体品質管理の破綻による神経変性疾患の分子メカニズムと創薬標的、第 90 回日本薬理学会年会、2017/3/15-17、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）

門脇寿枝、西頭英起、小胞体ストレス誘導性翻訳時分解の分子機、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015/6/29-7/2、タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

西頭英起、門脇寿枝、Molecular mechanism of novel ER quality control system、Gordon Research Conferences、

2015/7/5-10、Renaissance Tuscany II Ciocco in Lucca（Italy・Barga）

西頭英起、小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の分解機構、第 10 回小胞体ストレス研究会、2015/11/29-30、ウエスティンホテル淡路（兵庫県・淡路市）

Pasjan SatrimaFitrah、Hisae Kadowaki、Hideki Nishitoh、Characterization of the stability of Derlin family proteins、第 10 回小胞体ストレス研究会、2015/11/29-30、ウエスティンホテル淡路（兵庫県・淡路市）

Kandel Munal Babu、Hisae Kadowaki、Hideki Nishitoh、Identification of novel ER pQC-related molecules、第 10 回小胞体ストレス研究会、2015/11/29-30、ウエスティンホテル淡路（兵庫県・淡路市）

加藤裕紀、西頭英起、小胞体ストレス受容体タンパク質はミトコンドリア機能障害時に統合的ストレス応答の発動に関与する、BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回生化学会大会 合同大会、2015/12/1-4、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）

門脇寿枝、西頭英起、小胞体ストレス誘導性翻訳時分解の分子機構、BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回生化学会大会 合同大会、2015/12/1-4、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西頭 英起（NISHITOH Hideki）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

(4)研究協力者  
該当なし