

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19523

研究課題名(和文)小胞体ストレスと脂肪肝に関連する新規小胞体局在膜タンパク質ILDR2の機能解析

研究課題名(英文)The role of ILDR2 in ER stress and hepatic steatosis

研究代表者

渡邊 和寿(Watanabe, Kazuhisa)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60724416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々がQTL解析により同定したIldr2は、小胞体に局在する膜タンパク質をコードしている新規糖尿病感受性遺伝子であり、マウス肝臓におけるILDR2ノックダウンは脂肪肝を誘導する。しかし、ILDR2どのように脂肪肝発症に関与しているのかは明らかになっていない。申請者らは、ILDR2と結合するタンパク質を探索するために、免疫沈降法・MALDI-TOF/MSを用いて、複数のILDR2結合タンパク質を同定し、報告した。今後、同定したILDR2結合タンパク質の機能解明により、ILDR2とILDR2結合タンパク質がどのように脂肪肝発症に関与するのかを明らかにする。

研究成果の概要(英文)：A diabetes susceptibility gene, immunoglobulin-like domain containing receptor 2 (Ildr2), encodes a transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum membrane that is closely related to hepatic lipid metabolism. The livers of ob/ob mice in which Ildr2 is transiently overexpressed are relieved of hepatic steatosis. However, the molecular mechanisms through which ILDR2 affects these changes in hepatic lipid metabolism remain unknown. We purified ILDR2-containing protein complexes using tandem affinity purification tagging and identified several ILDR2 binding proteins. This result supports a novel link between ILDR2 and ILDR2-interacting proteins and suggest that ILDR2 is involved in a novel pathway in hepatic steatosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：脂肪肝 ERストレス

研究成果報告内容

1. 研究開始当初の背景

我々が QTL 解析により同定した *Ildr2* は、小胞体に局在する膜タンパク質をコードしている新規糖尿病感受性遺伝子であり、マウス肝臓における ILDR2 ノックダウンは脂肪肝を誘導する¹。しかし、ILDR2 がどのように脂肪肝発症に関与しているのかは明らかになっていない。

近年、小胞体ストレスが、肥満(脂肪肝)や糖尿病など、メタボリックシンドロームの病態と深く関与していることが注目されている。ILDR2 は、小胞体局在膜タンパク質であることから、小胞体ストレスによって、その機能が制御される可能性が考えられた。しかし、ILDR2 が小胞体膜でどのような機能をしているのかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪肝発症における ILDR2 の役割・意義を分子レベルで解明するために、ILDR2 と結合するタンパク質を同定し、ILDR2 の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

FLAG-tag、His-tag をタンデムの結合させた ILDR2 ベクターを 293T にトランスフェクションし、Anti-FLAG M2 Affinity gel 及び Ni-NTA agarose を用いて免疫沈降させ、ILDR2 と ILDR2 複合体タンパク質を精製した。その後、SDS-PAGE を行い、銀染色により検出したバンドを MALDI-TOF/MS を用いて、タンパク質の同定を試みた。

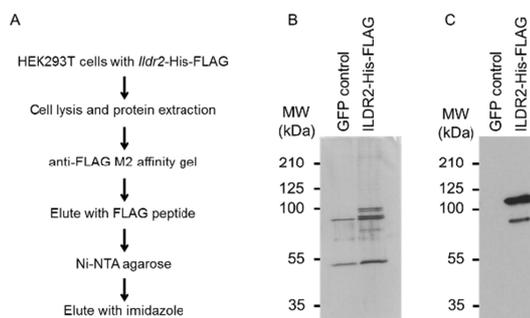


Fig. 1. ILDR2 結合タンパク質の同定

(A) ILDR2 複合体タンパク質の精製方法 (B) ILDR2 複合体タンパク質を SDS-PAGE 後、銀染色した。(C) FLAG 抗体を用いて ILDR2 複合体タンパク質をウェスタンブロットティングした。

4. 研究の成果

(1) ILDR2 結合タンパク質の同定

ILDR2 結合タンパク質を免疫沈降法及び MALDI-TOF/MS を用いて同定を行ったところ、複数のタンパク質が同定された (Table 1)。

Table 1. ILDR2 結合タンパク質

Lipid metabolism-related proteins

Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (HSD17B12)
Lysophospholipid acyltransferase 7 (MBOAT7)

Calucium binding protein

Parvalbumin alpha (PVALB)

Zinc finger proteins

Zinc finger protein 224 (ZNF224)
Zinc finger protein 70 (ZNF70)

Others

SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1 (SH3TC1)
Prelamin-A/C (LMNA)

(2) ILDR2 結合タンパク質 ZNF70 は ZFP64 と結合し、*HES1* 発現を調節する。

ZFP64 は *HES1* 転写活性を増大させる転

写因子であり、ZNF70 と結合するタンパク質であることが報告されている^{2, 3}。ZFP64 は、これまでの報告通り ZNF70 と結合した (Fig 2A)。ZFP64 と ZNF70 が *HES1* 発現調節に影響があるかどうかを検討したところ、ZFP64 と ZNF70 のコトランスフェクションにより *HES1* 転写活性が増大した (Fig 2B)。

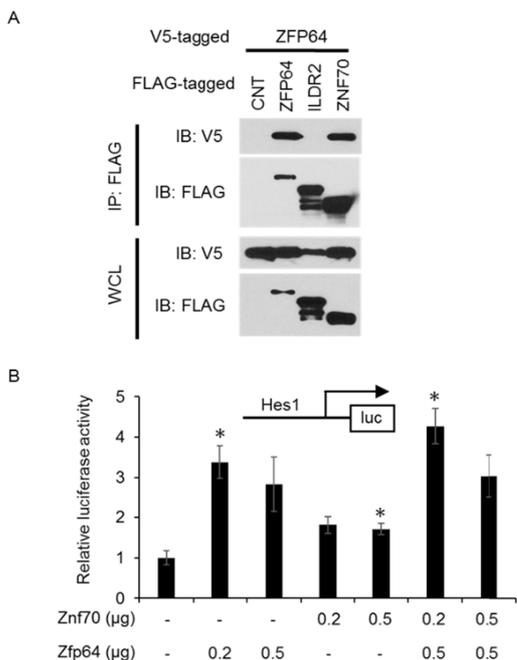


Fig. 2. ZNF70は、ZFP64と結合し*HES1*の発現調節をする。

(A) 293T細胞にV5-tag ZFP64 と FLAG-tag ZFP64, ILDR2, ZNF70 ベクターをそれぞれトランスフェクションしたサンプルを、FLAG抗体により免疫沈降し、ウエスタンブロットを行った。(B) ZFP64とZNF70における*HES1*転写活性能をレポーターアッセイにより検討した。

(3) ILDR2 は、ZNF70 の細胞内局在に関与し、*HES1* 発現を調節する。

ZNF70 は、ILDR2 の C 末端に結合し、細胞質にも局在している。ところが、ILDR2 ノックダウンにより、ZNF70 は核へ移行し

た (Fig 2A)。このことから、ILDR2 に結合していた細胞質の ZNF70 が、ILDR2 ノックダウンにより ILDR2-ZNF70 結合が減少することによって、核へ移行したことが考えられた。次に、ILDR2 の発現低下による *HES1* 発現量を検討するために、ILDR2 shRNA アデノウイルスを HepG2 に感染させた。その結果、ILDR2 ノックダウンにより *HES1* 発現が有意に増大した。以上のことから、ILDR2 の減少が ZNF70 を核へと移行させ、*HES1* 発現を増大させたことが示唆された。

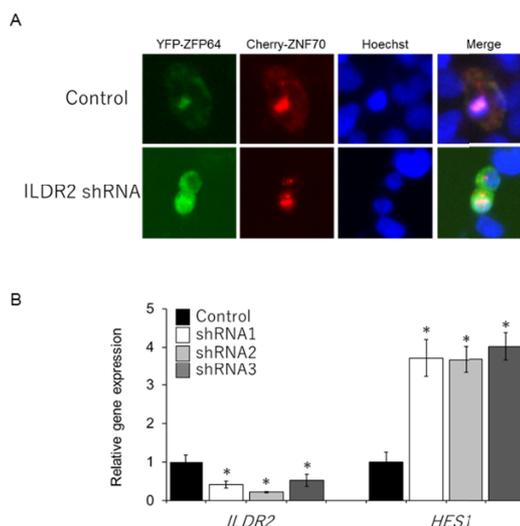


Fig. 3. *ILDR2* ノックダウンは *HES1* の発現を増大させる。

(A) *ILDR2* ノックダウンによる ZFP64 と ZNF70 の細胞内局在。

pYFP-ZFP64 と pCherry-ZNF70 ベクターを HepG2 にコトランスフェクションし、24 時間後 *ILDR2* shRNA アデノウイルスを感染させた。(B) *ILDR2* ノックダウンによる *HES1* 遺伝子発現レベル。*ILDR2* shRNA アデノウイルスを感染させた HepG2 における *HES1* 遺伝子発現レベル。

(4)考察

我々は ILDR2 と結合するタンパク質を複数同定した。ILDR2 結合タンパク質の一つである ZNF70 は、Kruppel C2H2-type zinc finger を有する転写因子であり、ZFP64 と結合することが報告されている²。ZFP64 は、ZNF70 と同様 Kruppel C2H2-type zinc finger を有する転写因子であり、Notch のターゲット遺伝子である *HES1*、*HEY1* を制御する転写因子であることが報告されている³。*HES1* の発現は、NAFLD 患者の肝臓で増大することから、*HES1* の制御は脂肪肝の病態と密接に関連していることが考えられる。今回の研究成果では、ILDR2 が、ZNF70/ZFP64 を介して *HES1* 発現を調節することで脂肪肝発症に関わっている可能性が考えられた。

< 引用文献 >

1. K. Watanabe et al. ILDR2: an endoplasmic reticulum resident molecule mediating hepatic lipid homeostasis, PLoS One 8 (2013) e67234.
2. T. Ravasi et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man, Cell 140 (2010)
3. K. Sakamoto et al. Zfp64 participates in Notch signaling and regulates differentiation in mesenchymal cells, J. Cell Sci. 121 (2008) 1613e1623.
4. L. Valenti et al. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease, Diabetes 62 (2013) 4052e4062.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Watanabe K, Nakayama K, Ohta S, Tago K, Boonvisut S, Millings EJ, Fischer SG, LeDuc CA, Leibel RL, Iwamoto S: ZNF70, a novel ILDR2-interacting protein, contributes to the regulation of HES1 gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 2;477(4):712-6.

[学会発表] (計 3 件)

渡邊和寿、Millings Elizabeth、Fischer Stuart、Leduc Charles、中山 一大、Leibel Rudolph、岩本 禎彦：新規糖尿病感受性遺伝子 *Ildr2* の機能解析. 2016 年 10 月、第 37 回 日本肥満学会、東京

渡邊和寿、Millings Elizabeth、Fischer Stuart、Leduc Charles、中山 一大、Leibel Rudolph、岩本 禎彦：新規糖尿病感受性遺伝子 *Ildr2* の機能解析. 2016 年 5 月、第 59 回 日本糖尿病学会、京都

渡邊和寿、中山 一大、Leibel Rudolph、岩本 禎彦：新規糖尿病感受性遺伝子 *Ildr2* の機能解析. 2016 年 5 月、第 70 回 日本栄養・食糧学会、兵庫

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 和寿 (WATANABE Kazuhisa)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：60724416

(2) 研究協力者

Rudolph Leibel
Columbia University
Department of Pediatrics・Professor