

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380079
 研究課題名（和文）小胞体タンパク質フォールディング酵素 ER-60 のジーンターゲティング解析
 研究課題名（英文）Gene targeting analysis of the endoplasmic reticulum foldase ER-60

研究代表者
 裏出 令子 (URADE REIKO)
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：90167289

研究成果の概要：ER-60 の各臓器での生理的役割を明らかにするために、標的臓器特異的に ER-60 を欠損するノックアウトマウス作製の loxP ターゲティングマウスを作製した。このマウスを用いて肝臓特異的に ER-60 を欠損したマウスの作出に成功し、肝臓のみでのノックダウンではマウスの発生・成長・体重・運動能力に影響はないことを明らかにした。また、ER-60 にはアルツハイマー病の原因の一つとされるアミロイドβペプチドの害作用を抑制する効果があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：小胞体、ER-60、フォールディング、分子シャペロン、ノックアウトマウス、ジスルフィド結合、プロテインジスルフィドイソメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の小胞体に局在し、粗面小胞体で生合成された新生タンパク質のジスルフィド結合を伴う高次構造形成（フォールディング）及び品質管理を担う一群のタンパク質としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）ファミリーが存在する。複雑な構造を持つ分泌タンパク質及び膜タンパク質の高次構造形成においては正確なジスルフィド結合の形成が必須であり、その形成機構の解明及びその破綻と疾病との関

係の解明がタンパク質フォールディング研究における最重要課題の一つとされている。小胞体には、多様な分子構造を持つ PDI ファミリータンパク質が共存することから、個々の PDI ファミリータンパク質が特異的な生理的役割を分担していると予想されているがその詳細は不明である。ER-60 は、研究代表者が 1992 年に世界に先駆けて発見した PDI ファミリータンパク質の一つであり、哺乳動物ではタンパク質生合成の盛んな臓器に広く発現している。1998 年に

ER-60 の持つ foldase 活性が、糖鎖に特異的に結合する分子シャペロンであるカルネキシン及びカルレチキュリンとの複合体形成を介して活性化されることが見いだされ、糖タンパク質のフォールディングに重要な役割を果たしていることが示された。研究代表者はこの報告後 ER-60 と分子シャペロンの相互作用に関する研究を行い、ER-60 のドメイン構造及び calnexin との相互作用部位の同定を行うとともに、他の分子シャペロン BiP とも共同作業しうることを明らかにした。ER-60 は foldase 活性以外にエンドプロテアーゼ活性及びトランスグルタミナーゼ活性などを有す多機能性タンパク質であることが明らかにされており、様々な生理機能において多面的な役割を果たしていることが明らかにされつつある。研究代表者は、トロント大学 Adeli 教授及びワシントン大学医学部 Bu 教授との共同研究により、肝細胞からのリポタンパク質(VLDL)の分泌量の制御などに ER-60 が関わっていることを肝培養細胞を用いて明らかにしてきた。また、MHC class I による抗原提示複合体の形成に ER-60 が必須の役割を果たしていることも明らかにされている。しかし、個体レベルで ER-60 が高発現している各臓器での役割について深く踏み込んだ研究は殆ど行われていない。

2. 研究の目的

- (1) 個体レベルでの ER-60 の欠損により、その必須性あるいは他の PDI ファミリーとの重複性(redundancy)の有無及び生理的役割を解明することを目指して研究を行うこととした。特に、脂質代謝の要となる臓器である肝臓及び ER-60 の発現量が高い脳における ER-60 の役割を解明するための研究を展開することとした。
- (2) ER-60 の肝臓における生理的役割の分子機構を探索するために、肝臓培養細胞を用いて、脂質代謝と ER-60 の関係を探索することとした。すなわち、血清脂質濃度の制御に ER-60 の関与が報告されていることから、肝実質細胞のモデルである HepG2 細胞を用いて、血清脂質濃度を上昇を引き起こす飽和脂肪酸や血清脂質異常症改善効果を有する食品成分である大豆β-コングリシニンと ER-60 の発現量との関係を明らかにすることとした。
- (3) エネルギー代謝の制御ホルモンであるレプチン及びインスリンによる ER-60 の発現調節について明らかにすることとした。
- (4) アルツハイマー病の原因タンパク質の一つであるアミロイドβペプチドの害作用と、ER-60 との関係について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

- (1) *loxP/Cre* リコンビナーゼ系を用いたコンディショナルターゲティング法により、ER-60 の臓器特異的ノックアウトマウスを作製する。最初に ER-60 のゲノム上で遺伝子発現に必要な領域を loxP 配列で組み換えた ES 細胞を用いて、キメラマウスを作製する。キメラマウスの交配によりヘテロマウスを作出した後、さらにヘテロマウス同士の交配でホモマウスを作製する。ホモマウスと臓器特異的プロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを交配し、臓器特異的に ER-60 をノックアウトしたマウスを作製する。肝臓特異的ノックアウトではアルブミンプロモーター連結 Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスと loxP/loxP マウスを掛け合わせ、生まれた仔マウスの尾からゲノム DNA を採取し、サザンブロットティング法により loxP/loxP ホモマウスを同定する。同定したマウスの肝臓を取り出し、ウエスタンブロットティングにより ER-60 の欠損を確認する。
- (2) HepG2 細胞にインスリン、レプチン、パルミチン酸及びβ-コングリシニン由来ペプチドを添加し、アポリポロタン B-100 の分泌量、ER-60 mRNA の量をリアルタイム RT-PCR 法により行う。
- (3) 野生型マウス、レプチン欠損及びレプチン受容体欠損マウスを用いて、肝臓及び脳における ER-60mRNA 量をリアルタイム RT-PCR で、タンパク質量をウエスタンブロットティング法で定量する。また、レプチン欠損マウスでは腹腔内にレプチンを投与し同様の分析を行う。飢餓状態にしたマウスを用いて、同様の分析を行う。以上のマウスの分析で ER-60 量がコントロールマウスと差があったものについて、レプチンあるいはインスリンを腹腔内投与して ER-60 の発現が正常化されるか検討する。
- (4) ヒト細胞 HEK293 を用いて、細胞の生死判定を指標にアミロイドβに対する感受性を検証する。siRNA により ER-60 のノックダウンを、哺乳動物発現用ベクターのトランスフェクションにより ER-60 の強制発現を行い、アミロイドβに対する感受性と ER-60 との関係を解析する。アミロイドβプラーク形成の原因となるアミロイドβ線維化に対する ER-60 の抑制効果を、in vitro 反応系を用いて解析する。

4. 研究成果

- (1) 臓器特異的ノックアウトマウスを作製するために、マウスゲノムライブラリーを用いて ER-60 遺伝子領域を polymerase chain reaction でクローニングした。遺伝子領域のうち、エキソン 1 を含んだ 5'

homology armはターゲティングベクターの5'側 LoxPの上流に、2, 3, 4はLoxPとPGK neoの間に、3'側 LoxPの下流に3' homology armをサブクローニングした。ターゲティングベクターをES細胞にトランスフェクトし、相同組み換えを起こさせ、ネオマイシン耐性により組み換え体となった細胞を選別した。得られたESクローンをC57BL/6Gマウス初期胚へ導入後、偽妊娠雌マウスへインジェクションした。帝王切開により出産させたマウスの中からキメラマウスをコートカラーにより選択した。キメラマウスをwild C57BL/6Gマウスと交配し、生まれたヘテロマウスをコートカラーにより選別するとともに、尾より抽出したDNAについてLoxPリコンビナントに特異的な9.2kbのバンドの検出をPCR法で行いヘテロマウス(Lox/wt)であることを確認した

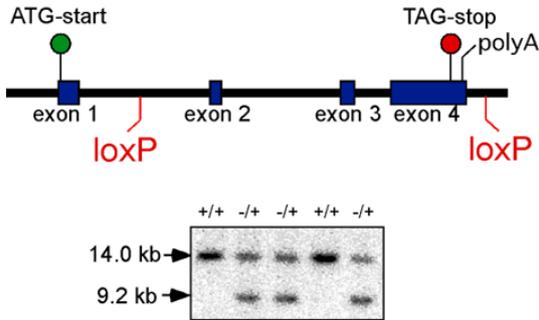


図1. loxP部位のゲノムデザインと野生型(+/+)及びloxP/creコンディショナルER-60ノックアウトヘテロマウス(+/-)のゲノムDNA解析。loxPが挿入されたゲノムからは制限酵素消化により9.2kb断片が生じる。14kb断片は野生型ゲノム由来の断片。

(図2)。これらのヘテロマウスからホモマウス

(loxP/loxP)を作製し、アルブミンプロモーターを有するCre recombinase 遺伝子トランスジェニックマウスと交配することにより、肝臓特異的にER-60を欠損したマウスの作出に成功した。ゲノム解析及びタンパク質レベルでER-60が欠損していることを確認した。ノックアウトマウスの出生率は野生型と同等であり、外観・成長・体重・運動性なども野生型との差が認められなかった。従って、今後ノックアウトマウスを用いて肝臓関連の代謝や小胞体機能及びこれらの機能に対する食餌の影響とER-60との関係を解析することが可能となった。

(2) 食事に含まれる代表的な飽和脂肪酸で肝細胞や膵臓β細胞に対する脂肪酸毒性が強いことが明らかにされているパルミチン酸によりER-60 mRNAが誘導され、この誘導がエネルギー代謝に関わる情報伝達系の阻害剤で抑制されることを明らかにした。また、インスリンの添加により、肝細胞でER-60 mRNA量が增加することを見出した。一方、ヒトで血清中性脂肪低下作用があるβコングリシニン由来ペプチドの添加によ

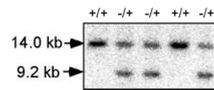
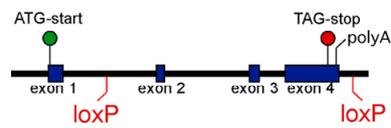


図1. loxP部位のゲノムデザインと野生型(+/+)及びloxP/creコンディショナルER-60ノックアウトヘテロマウス(+/-)のゲノムDNA解析。loxPが挿入されたゲノムからは制限酵素消化により9.2kb断片が生じる。14kb断片は野生型ゲノム由来の断片。

リタンパク
ポリプロテ
ER-60の発

(3) 個体レベルでも、βコングリシニン摂取により肝臓でのER-60 mRNA量が低下することを見出した。また、レプチン欠損及びレプチン受容体欠損マウスの両方で、肝臓及び脳のER-60の発現量が低下することを明らかにした。さらに、飢餓で肝臓のER-60が激減することを明らかにした。レプチン欠損マウスへのレプチン投与により肝臓及び脳でのER-60発現量が回復したことから、ER-60の両臓器での発現調節にレプチン情報伝達系が関与していることが明らかとなった。一方、飢餓マウスへのレプチン及びインスリンの投与によるER-60発現量の回復はなかった。従って、エネルギー代謝に関わる複数の因子がER-60の発現を制御していることが明らかとなった。病的肥満ではレプチン抵抗性が生じることから、そのような状況でER-60の発現が慢性的に低下し、小胞体機能が低下する可能性が考えられる。従って食餌性肥満マウス及びレプチン欠損マウスで見出された肝臓での小胞体ストレス応答はER-60の発現低下による小胞体機能低下による可能性が考えられる。さらには、小胞体ストレス応答情報伝達系の活性化により憎悪することが明らかとなっているインスリン抵抗性に、ER-60の発現量に関わる可能性が示唆された。

(4) ER-60は、アルツハイマー病において神経変性の原因とされるアミロイドβ(Aβ)を生成する神経細胞に高発現しており、強力なAβ線維化阻害効果及び線維化Aβ解離活性を有することをin vitroで明らかにした。このAβ線維化阻害効果はER-60のbb'ドメインが担っていることを示した。培養細胞を用いたsiRNAによるER-60のノックダウンがAβの毒性に対して細胞を脆弱化させること、さらにER-60ノックダウン細胞へのER-60の強制発現がAβ毒性への抵抗力を付与することを明らかにした。

本研究により作製に成功したノックアウトマウスと培養細胞を用いて得られた知見は、小胞体機能と食餌に起因する肝臓及び脳での代謝異常との関係解明への研究発展を可能にする成果であり、その科学的意義は大きいと考えられる。

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 3 件)

- ① Mochizuki, Y., Maebuchi, M., Khono, M., Hirotsuka, M., Wadahana, H., Kawada, T. & Urade, R. Changes in lipid metabolism by soy beta-conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1473-1480 (2009), 査読有り
- ② Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z.L., Qu, W.M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, Y. & Urade, Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 6412-6417 (2007), 査読有り
- ③ Kondoh, Y., Kawada, T. & Urade, R. Activation of caspase 3 in HepG2 cells by elaidic acid (t-18:1). *Biochim. Biophys. Acta*, 1771, 500-505 (2007), 査読有り

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 裏出令子、柏木香保里、三田村エリザベス、兼清貴久、裏出良博：アミロイドβの細胞毒性に対する小胞体 ER-60 の抑制作用、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009. 3. 28、福岡市・福岡国際会議場
- ② 和田濱裕之、有竹浩介、永田奈々恵、裏出良博、河田照雄、裏出令子：レプチンによる肝臓小胞体分子シャペロンの発現調節、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009. 3. 28、福岡市・福岡国際会議場
- ③ Kanekiyo T, Okazaki I, Urade Y, Urade R: Human ER-60 prevents fibril formation of amyloid beta, 33th FEBS Congress & 11th IUBMB Congress, 2008. 6. 30, Athene, Greece
- ④ 和田濱裕之、有竹浩介、永田奈々恵、裏出良博、河田照雄、裏出令子：レプチン欠損マウスの肝臓及び脳における小胞体分子シャペロンの発現、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008. 12. 10、神戸市・神戸国際展示場
- ⑤ 裏出令子、三田村エリザベス、柏木香保里、兼清貴久、裏出良博：小胞体分子シャペロン ER-60 によるアミロイドβの細胞毒性の抑制、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、2008. 12. 10、神戸市・神戸国際展示場
- ⑥ 裏出令子、兼清貴久、岡崎一生、裏出良博：ヒト ER-60 によるアミロイドβペプチド線維形成の抑制、農芸化学会大会 2008 年度大会、2008. 3. 27、名古屋市・名城大学
- ⑦ 和田濱裕之、河田照雄、裏出令子：レプチン欠損肥満マウスにおける肝臓小胞体分子シャペロンの発現、農芸化学会大会 2008 年度大会、2008. 3. 28、名古屋市・名城大学
- ⑧ 兼清貴久、岡崎一生、裏出良博、裏出令子：ER-60 によるアミロイドβペプチド凝集抑制作用、第 80 回日本生化学会・第 30 回日本分子生物学会合同大会、2007. 12. 14、横浜市・パシフィコ横浜

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kamiya, Y., Kamiya, D., Urade, R., Suzuki, T. & Kato, K., Nova Science Publishers, Sophisticated modes of sugar recognition by the intracellular lectins involved in quality control of glycoproteins in *Glycobiol. Res. Trends*, (2009) 未定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

裏出 令子 (URADE REIKO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90177289

(2) 研究分担者

裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)

(財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・部長

研究者番号：10201360