

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23790188
 研究課題名（和文） Derlin1 または HRD1 による疾患関連 ABC トランスポーターの翻訳後発現調節
 研究課題名（英文） Post-translational Regulation of Disease-associated ABC Transporters by Derlin1 and HRD1
 研究代表者
 首藤 剛（SHUTO TSUYOSHI）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
 研究者番号：80333524

研究成果の概要（和文）：本研究では、疾患関連 ABC トランスポーター BCRP および ABCG5/ABCG8 の翻訳後発現調節機構を明らかにすることを目的とした。その結果、Derlin-1 が、野生型 BCRP の小胞体からゴルジ体への輸送経路を抑制し、一方、脱 N 型糖鎖型 BCRP を分解させる因子であることが明らかになった。さらに、HRD1 は、ABCG8 タンパク質の翻訳後 N 型糖鎖修飾を負に調節し、ABCG5/8 の発現を低下させる因子であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to determine molecular mechanisms responsible for post-translational regulation of BCRP and ABCG5/8, disease-associated ABC transporter family proteins. Here, we showed that Derlin-1 is a negative regulator for both glycosylated and non-glycosylated BCRP expression. Moreover, we demonstrated HRD1 as a regulator of post-translational N-glycosylation of ABCG8 that affects protein stability. Overall, we clearly indicate the molecular basis of Derlin-1- and HRD1-dependent negative regulation of BCRP and ABCG5/ABCG8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ABC トランスポーター，翻訳後調節，ABCG5/8，BCRP，N 型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターは、ATP の加水分解によって得られるエネルギーを駆動力として多様な物質を輸送する膜タンパク質である。ABC トランスポーターの異常（発現・機能の低下または上昇，異常な細胞内局在など）は種々の疾患の発症や抗癌剤耐性の要因となる。例えば、cAMP 依存性の Cl⁻ イオンチャネルである CFTR の変異は、白色人種間で最も頻度が高い致死性の遺伝性疾患、嚢胞性

線維症（CF）の発症を惹起する。本申請者らは、最もよく研究がなされている CFTR について、これまで約 8 年に渡り、研究を進め、正常型 CFTR および変異型 CFTR ($\Delta F508$ -CFTR) のそれぞれの細胞内翻訳後の折りたたみや品質管理における種々の分子の役割を明らかにしてきた。その結果、小胞体シャペロンである calnexin (CNX) を標的にすると $\Delta F508$ -CFTR の小胞体滞留を解除する可能性があることが明らかになり (*FEBS Lett.*

2002), また, calreticulin (CRT) は, 形質膜上の正常型および変異型 CFTR の安定性を低下させる因子であり, CRT を低下させるクルクミンが, CFTR 機能を回復させる治療薬シーズとなりうることを明らかにした (JBC. 2006; BBRC. 2007). 一方, CFTR 機能が欠損する ($\Delta F508$ -CFTR を発現する) と, 細胞内において, 種々の遺伝子発現変化が引き起こされ, 細胞の形質を炎症促進的に変化させ, 疾患誘発に関与することを明らかにしてきた. 例えば, クルクミンは, $\Delta F508$ -CFTR 発現により上昇した toll-like receptor-2 (TLR2) の発現を抑制することで気道炎症を緩和させ (Shuto T., et al., BBRC. 2010), また, 皮膚組織において上昇した nerve growth factor (NGF) の発現を抑制すると, 皮膚搔痒感やそれに伴う皮膚炎症を抑制することを明らかにした. これらの結果は, CFTR の細胞内局在やその発現調節の分子基盤を理解することにより, 新たな創薬標的を提示できることを強く示唆している.

ところで, ステロールトランスポーターである ABCG5 および ABCG8 の変異または機能低下は, 遺伝性疾患シトステロール血症の誘発及び動脈硬化の発症に関与する. さらに, 生体内異物の細胞外排出を行う BCRP の過剰発現は, 種々の抗癌剤を細胞外に排出し, 癌細胞が抗癌剤耐性を獲得するのに寄与し, 一方, BCRP の機能低下は, 痛風の発症に深く関与する報告が最近報告され注目を浴びている. これらの事実は, これらの ABC トランスポーターの細胞内局在やその発現調節の分子基盤を理解すれば, 細胞の恒常性維持の観点のみならず種々の病態発症機構の理解に繋がることを意味している.

2. 研究の目的

ABC トランスポーターの異常 (発現・機能の低下または上昇, 異常な細胞内局在など) は種々の疾患の発症や抗癌剤耐性の要因となる. したがって, ABC トランスポーターの細胞内局在やその発現調節の分子基盤を理解することは, 細胞の恒常性維持の観点のみならず種々の病態発症機構の理解のためにも重要である. 本研究では, 申請者が精力的に取り組んで来た CFTR (ABCC7) に関する研究を契機に, 同じく疾患関連 ABC トランスポーターである ABCG5/ABCG8, BCRP (ABCG2) に着目し, これらの ABC トランスポーターの翻訳後発現調節機構における小胞体関連分

解制御分子 Derlin1 および HRD1 のユニークな役割を明らかにすることを主目的とする.

3. 研究の方法

これまでの予備検討により, Derlin1 は, 正常型 BCRP の成熟化を抑制し, 小胞体に滞留させる働きを有することが明らかとなってきた. 一方, HRD1 は, 正常型 ABCG5/ABCG8 の発現制御の際, ABCG8 にのみ特異的に作用し, 脱糖鎖型 ABCG8 の発現量を増加させることが明らかとなった. そこで, 本研究では, 下記の2点に関しての検討を実施する.

(1) Derlin1 がどのように正常型 BCRP の成熟化を抑制しているのか, また, これまで報告のある変異型 BCRP に対して Derlin1 はどのような作用を有するのかの詳細を明らかにする.

(2) HRD1 が正常型 ABCG8 の脱糖鎖型をどのように増加させるのか, また, これまで報告のある変異型 ABCG5/8 に対して HRD1 はどのような作用を有するのかの詳細を明らかにする.

4. 研究成果

(1) 正常型及び変異型BCRPの翻訳後発現調節におけるDerlin-1の役割の解明

BCRP (ABCG2) は, 種々の細胞において, 内因性および外因性有害物質の排泄を担う ABC transporter であり, その適切な発現制御は, 生体の恒常性維持の観点から重要である. これまで, BCRP は, 小胞体内で N 型糖鎖修飾を受け, ホモダイマーを形成し, 形質膜上で機能することは明らかであったが, これらのステップを制御する分子は不明である. そこで, 本研究では, まず第1に, 小胞体の品質管理関連分子の screening の結果得られた Derlin-1 による BCRP の翻訳後発現制御機構の解明を行った.

その結果, Derlin-1 の過剰発現は, 野生型 BCRP との相互作用を介して, 野生型 BCRP の小胞体からゴルジ体への輸送経路を抑制することが明らかになった. 一方, Derlin-1 は, N596Q BCRP に対しては, その小胞体関連分解を促進し, BCRP タンパク質の安定性を低下させることが明らかになった. また, Derlin-1 の knockdown は, tunicamycin により生じた脱 N 型糖鎖型の野生型 BCRP の分解も抑制したことから, Derlin-1 は, 脱 N 型糖鎖型の BCRP を分解させる因子であることが明らかになった (図 1).

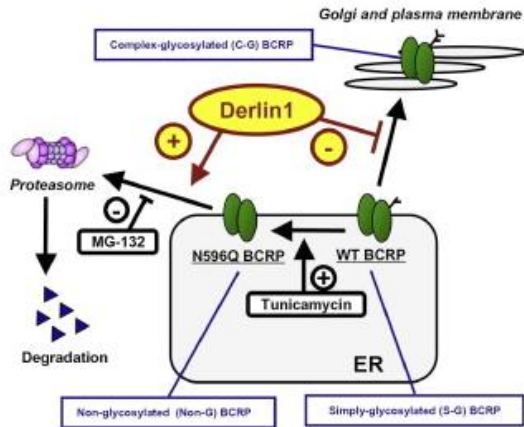


図 1. Derlin-1 による糖鎖型及び脱糖鎖型 BCRP の翻訳後発現調節

(2) ABCG5/8 の翻訳後発現調節における HRD1 の役割の解明

一方、ステロールトランスポーターである ABCG5 および ABCG8 の変異または機能低下は、遺伝性疾患シトステロール血症の誘発及び動脈硬化の発症に関与する。そこで、本研究では、ステロールトランスポーターである ABCG5/8 に着目し、E3 ユビキチンリガーゼによる翻訳後発現調節について、詳細な検討を実施した。

まず、ABCG5 (G5) および ABCG8 (G8) タンパク質の発現および N 型糖鎖修飾の調節に E3 ユビキチンリガーゼ (GP78, HRD1, RMA1, CHIP) が関与するか否かを検討した。それぞれ正常型または E3 活性欠損変異型の E3 ユビキチンリガーゼを細胞に過剰発現させ、G5 および G8 タンパク質の発現またはその N 型糖鎖修飾状態を解析した。その結果、HRD1 が G5 タンパク質に対して、また、RMA1 は G5 および G8 タンパク質のそれぞれに対して、E3 活性依存的に ER 関連分解 (ERAD) を促進した (図 2)。

一方、HRD1 は、G8 タンパク質の翻訳後 N 型糖鎖修飾を阻害することで、G8 タンパク質の安定性を低下させることを明らかにした。興味深いことに HRD1 による G8 タンパク質の N 型糖鎖修飾阻害は、E3 活性非依存的であるにもかかわらず、その阻害には、HRD1 の RING-finger domain が重要であることが示された。

最後に、G5/G8 タンパク質共発現状態においても、HRD1 は、その E3 活性非依存的に G8 タンパク質の N 型糖鎖修飾阻害を介して、G8 タンパ

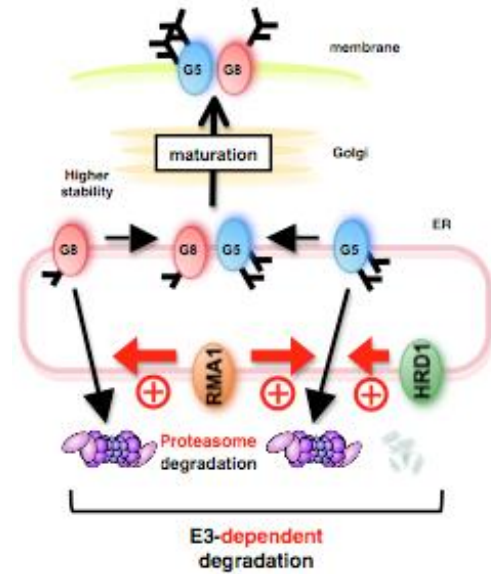


図 2. RMA1 及び HRD1 による E3 リガーゼ活性依存的な ABCG5/8 の翻訳後発現調節

ク質の発現量を低下させ、結果として、G5/G8 タンパク質複合体の形質膜上発現を負に調節することが明らかになった (図 3)。

以上、本研究は、G5 および G8 タンパク質における一部の N 型糖鎖修飾が、翻訳後に引き起こされることを初めて同定し、これらの N 型糖鎖修飾が、G5 および G8 タンパク質の細胞内安定性を規定する重要な因子であることを明らかにした。また、E3 ユビキチンリガーゼである HRD1 が、E3 活性非依存的に G8 タンパク質の翻訳後 N 型糖鎖修飾を負に調節するというユニークな機構を明らかにした興味深い知見である。

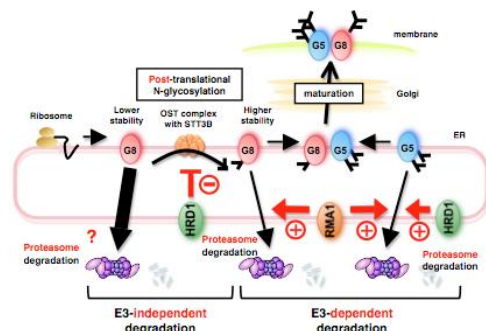


図 3. RMA1 及び HRD1 による E3 リガーゼ活性依存的／非依存的な ABCG5/8 の翻訳後発現調節

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6件)

① Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Nishitoh H, Okiyoneda T, Kokame K, Kaneko M, Taura M, Miyata M, Chosa K, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H, STT3B-Dependent Posttranslational N-Glycosylation as a Surveillance System for Secretory Protein., *Mol Cell.*, 47(1), 2012, 99-110, 査読有

10.1016/j.molcel.2012.04.015.

② Mizunoe S, Shuto T, Suzuki S, Matsumoto C, Watanabe K, Ueno-Shuto K, Suico MA, Onuki K, Gruenert DC, Kai H., Synergism Between Interleukin (IL)-17 and Toll-like Receptor 2 and 4 Signals to Induce IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells., *J Pharmacol Sci.*, 118(4), 2012, 512-520, 査読有

③ Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Characterization of hepatic cellular uptake of α 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: involvement of hemoglobin β -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells., *J. Pharm. Sci.*, 101(4), 2012, 1607-1615, 査読有

10.1002/jps.23015.

④ Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, Otagiri M, Maruyama T., α 1-acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress., *J. Biol. Chem.* 287(36), 2012, 30688-30700, 査読有

10.1074/jbc.M112.353771.

⑤ 首藤 剛, 新規ダニ誘発性搔痒自然発症モデルマウスの病態解析. *生化学*, 84(5), 2012, 241-355, 査読有

⑥ Sugiyama, T., T. Shuto, S. Suzuki, T. Sato, T. Koga, M. A. Suico, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, D. M. Cyr, and H. Kai. 2011. Posttranslational negative regulation of glycosylated and non-glycosylated BCRP expression by Derlin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 404:853-858. 査読有

10.1016/j.bbrc.2010.12.074.

[学会発表] (計11件)

① 首藤 剛, 鈴木 伸悟, 佐藤 卓史, 金子 雅幸, 高田 龍平, スイコ メリーアン, 鈴木 洋史, 甲斐 広文, (HRD1・RMA1 ユビキチンリガーゼファミリーによる E3 活性依存的・非依存的なヒト ABCG5/ABCG8 蛋白質の負の制御), 日本薬学会第133年会, 2013.3.27-30, パシフィコ横浜(横浜)

② 首藤 剛, 松本 千鶴, 坂口 由起, 亀井 竣輔, 小野 智美, スイコ メリーアン, 甲斐 広文, (セリンプロテアーゼ阻害剤は、粘液貯留と肺気腫を呈する B-ENaC 過剰発現マウスの肺病態を改善する), 第86回日本薬理学会年会, 2013.3.21-23, 福岡国際会議場(福岡)

③ 亀井 竣輔, 首藤 剛, 松本 千鶴, 坂口 由起, 野原 寛文, スイコ メリーアン, 甲斐 広文, (ENaC 過剰発現気道上皮細胞における亜鉛トランスポーターZIP2 の新規スプライシングアイソフォーム発現上昇), 第86回日本薬理学会年会, 2013.3.21-23, 福岡国際会議場(福岡)

④ 首藤 剛, 鈴木 伸悟, 佐藤 卓史, 金子 雅幸, 高田 龍平, メリーアン スイコ, 鈴木 洋史, 甲斐 広文, (HRD1・RMA1 ユビキチンリガーゼファミリーによる E3 活性依存的・非依存的なヒト ABCG5/ABCG8 蛋白質の負の制御), 第85回日本生化学会大会, 2012.12.14-16, 福岡国際会議場(福岡)

⑤ 渡邊 健司, 首藤 剛, 沖田 剛, 小貫 耕平, スイコ メリーアン, 太田 訓正, 甲斐 広文, (SLRP family 蛋白質 tsukushi による LPS シグナル抑制作用), 第29回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8-9, 熊本大学(熊本)

⑥ 首藤 剛, (感染時の自然免疫受容体 TLR2 の発現・機能調節とその炎症応答に関する研究), 第29回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8-9, 熊本大学(熊本)

⑦ 首藤 剛, 松本 千鶴, 坂口 由起, 亀井 竣輔, 小野 智美, Mary Ann Suico, 甲斐 広文, (粘液貯留を呈する閉塞性肺疾患モデルマウスの創出とその肺病態へのヘルシプロテアーゼ阻害剤の効果), 第65回日本薬理学会西南部会, 2012.11.23, 熊本大学, (熊本)

⑧ 亀井 竣輔, 首藤 剛, 松本 千鶴, 坂口 由起, 野原 寛文, Mary Ann Suico, 甲斐 広文(閉塞性肺疾患モデルマウス肺組織およびヒト気道上皮細胞のマイクロレイ解析と亜鉛トランスポーターZIP2 の新規スプライシングアイソフォームの発現について), 第65回日本薬理学会西南部会, 2012.11.23, 熊本大学, (熊本)

⑨ 首藤 剛, 鈴木 伸悟, 金子 雅幸,

佐藤 卓史, 高田 龍平, Mary Ann Suico, 鈴木 洋史, 甲斐 広文(HRD1・RMA1 ユビキチンリガーゼファミリーによる E3 活性依存的・非依存的なヒト ABCG5/ABCG8 蛋白質の負の制御), 第 6 回トランスポーター研究会九州部会 JTRAQ2012, 2012. 9. 1, 福岡医師会会館(福岡)

⑩ 首藤 剛, 甲斐 広文(粘液貯留を呈する閉塞性肺疾患モデルマウスの創出とその薬効評価), 生体機能と創薬シンポジウム 2012, 2012. 8. 30-31, 神戸大学(神戸)

⑪ 首藤 剛(上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の意義と役割 ―気道上皮特異的 ENaC 過剰発現マウスの解析―), Kidney International Conference, 2012. 5. 29, 熊本大学(熊本)

[その他]

ホームページ等

<http://molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 剛 (SHUTO TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80333524