

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292070

研究課題名(和文) 遺伝子操作と結晶構造解析による主要小胞体分子シャペロンER-60の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ER-60, an ER chaperone by gene manipulation and crystal structure analysis

研究代表者

裏出 令子 (Reiko, Urade)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90167289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞の主要な小胞体分子シャペロンであるER-60とアルツハイマー病との関係を明らかにすることを目指して、マウス海馬の神経細胞でER-60を特異的にノックアウトさせたマウスを用いてアミロイドペプチド(A β)の毒性を検討した。その結果、ER-60は神経細胞をA β ペプチドの細胞毒性から防御する作用を有すること、ER-60のb-b'ドメインに防御作用があることが明らかとなった。b-b'ドメインとA β の複合体の結晶構造解析から、結合に重要なアミノ酸残基を同定するとともに、A β との結合は固定された様式ではなくフレキシブルな様式によることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The project was performed to clarify the relationship between Alzheimer's dementia and a molecular chaperon located in the endoplasmic reticulum, ER-60. We demonstrated that ER-60 has protective effects against toxicity of amyloid beta peptides by using brain neuron-specific ER-60 knockout mice. The function is exerted through inhibition of polymerization of amyloid beta peptides by b-b' domain of ER-60. The amino acid residues essential for binding to amyloid beta peptides were identified by X-ray structural analysis of a complex of the b-b' fragment of ER-60 and amyloid beta peptide. In addition, it was suggested that amyloid beta peptides bind to b-b' domain in a flexible manners.

研究分野：食品生化学

キーワード：アミロイド ペプチド 小胞体 分子シャペロン 結晶構造解析 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の小胞体には約 20 種類の PDI ファミリータンパク質が存在し、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形成を伴う高次構造形成（フォールディング）や品質管理を担っていると考えられている。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すると予想されるが、その詳細は不明である。ER-60 は、1992 年に発見された PDI ファミリータンパク質のひとつであり、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（文献①）。その後、ER-60 は多くの研究者の注目を集め研究代表者及び他の複数のグループにより研究が行われた。その結果、ER-60 はレクチン型分子シャペロン（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、糖タンパク質のフォールディングに特に重要な役割を果たしていることが明らかにされた（文献②-④）。ER-60 の他の生理作用については、研究代表者とトロント大学及びワシントン大学との共同研究による肝臓細胞からのリポタンパク質（VLDL）の分泌量の制御（文献⑤-⑧）、他の研究グループから抗原提示における MHC class I と抗原ペプチドとの複合体形成作用（文献⑨）、及び小胞体のカルシウムホメオスタシスの調節作用（文献⑩）などが報告されている。疾病との関係では 2 型糖尿病を引き起こすインスリン抵抗性に伴う ER-60 の発現低下（文献⑪）や狂牛病の原因であるプリオンタンパク質の沈着に対する ER-60 の抑制作用が報告されている（文献⑫）。研究代表者は、ER-60 が脳では神経細胞に特異的に高発現し、アルツハイマー病（AD）モデルマウスのアミロイド斑に濃縮されていること、ER-60 がアミロイドβ（Aβ）ペプチドの重合化を抑制することにより Aβ ペプチドの毒性を緩和する作用があること（⑬）、また、レプチン及びインスリン情報伝達系に障害のあるマウスでは肝臓と脳で ER-60 の発現が減少していることを見いだした。さらに、ヒト培養細胞で ER-60 をノックダウンすると、細胞が Aβ ペプチドの毒性に対して脆弱になること、研究分担者とともに作製した *fllox* マウスを用いたコンディショナルターゲット法により脳神経細胞特異的に ER-60 をノックアウトしたマウスの脳内に Aβ ペプチドを投与すると、投与された Aβ ペプチドが脳内に沈着し、海馬及び大脳皮質の神経細胞が脱落することも明らかにした。また、研究代表者は ER-60 の b-b' ドメインが Aβ ペプチドと複合体を形成することを明らかにしてきた。しかし、ER-60 の Aβ ペプチド毒性作用抑制の作用機構は不明であった。

2. 研究の目的

(1) *IoxP/Cre* リコンビナーゼ系とアデノ随伴ウイルスベクター法を用いて臓器特異的に ER-60 をノックアウトさせたマウスを用

い、脳における ER-60 と小胞体ストレス応答との関係、及び、ER-60 によるアルツハイマー病発症の主因とされている Aβ ペプチドの毒性緩和作用と重合化の抑制作用を解明することを目的とした。

(2) ER-60 と Aβ ペプチドの複合体の構造解析がこの課題を発展させるために必須であると考え、Aβ ペプチドと b-b' ドメインの複合体の結晶化及び構造解析を行い、Aβ ペプチドの結合様式を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルスを用いた脳特異的ノックダウンマウスの作製

研究連携者は、*Cre* リコンビナーゼを導入した AAV-*Cre* ウイルスベクターを作製し、既に、*fllox* マウス脳内へのウイルス注入による局所での遺伝子ノックアウト実験に成功していた。ステレオタキシス装置とマイクロシリンジを用いて、AAV-*Cre* ウイルスを *ER-60-IoxP* ターゲティングマウスの脳に接種し、2~4 週間飼育した後、実験に供した。AAV ウイルスの感染部位は、ベクターに挿入したレポーター遺伝子 GFP の発現により確認した。一方、ER-60 のノックダウンは、研究代表者の開発した ER-60 抗体を用いて確認した。

(2) ER-60 b-b' ドメインの Aβ ペプチド結合親和性の検討

ER-60 の Aβ ペプチド結合部位である b-b' ドメインの野生型及び結合に影響を及ぼすと推定された 12 個のアミノ酸残基をアラニンに変異させたリコンビナントタンパク質を、大腸菌発現系を用いて大量発現させ純化した。各変異 b-b' の Aβ ペプチドに対する親和性は、BIACore 装置を用いてリガンドとして ER-60 を結合させたチップに対する Aβ ペプチドの結合の拮抗阻害活性を測定することで検討した。

(3) ER-60 と Aβ ペプチド複合体の結晶構造解析

リコンビナントタンパク質単独、あるいは、Aβ ペプチドの複合体の結晶化を地上あるいは国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」で行い、高分解能の X 線結晶構造を、大型放射光施設 (SPring-8) のビームラインを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) *ER-60-fllox* マウスに *Cre*-アデノ随伴ウイルス粒子を接種して、脳神経細胞特異的に内因性 *ER-60* をノックアウトし、さらにラットの *ER-60* を強制発現させたマウスの作製に成功した。*ER-60* ノックアウトマウスとこのマウスの脳室内に Aβ ペプチドを脳脊髄液に溶かして注射し、脳神経細胞への影響を検討した。ノックアウトマウスでは Aβ ペプチドを

注射して20日後に海馬で組織が脱落したが、ノックアウトと同時にラット ER-60 を強制発現させたマウスでは神経細胞死が抑制されることを明らかにした(図1)。この結果から、生体の海馬において ER-60 が A β ペプチドの毒性に対する防御作用を有することが明らかとなった。



図1 ER-60の欠損によるA β ペプチドによるマウス海馬の障害

上図左半球の海馬で部位特異的に ER-60 を欠損させた後、A β 1-42 を注入することによって ER-60 が欠損している部位で神経細胞の脱落が見られた。下図は左半球の海馬で部位特異的に ER-60 を欠損させると同時にラット ER-60 を強制発現させた場合。A β ペプチドの毒性に対する防御能が回復している。

(2) ER-60-siRNAにより ER-60 をノックダウンさせたヒト培養細胞 HEK293 に ER-60 の b-b' ドメインを強制発現させると A β ペプチドの毒性に対する抵抗性が回復するが、この作用は小胞体で発揮されていることを明らかにした。すなわち、b-b' の N 末端にシグナルペプチドを添付して小胞体に発現させた場合には A β ペプチドの毒性に対する抵抗性効果が発揮されるが、細胞質に発現させて場合には効果はみられなかった。この結果から、小胞体内腔に転送された ER-60 が A β ペプチドの毒性に対する耐性効果を発揮することが明らかとなった。

(3) 野生型 ER-60 の b-b' ドメインと A β ペ

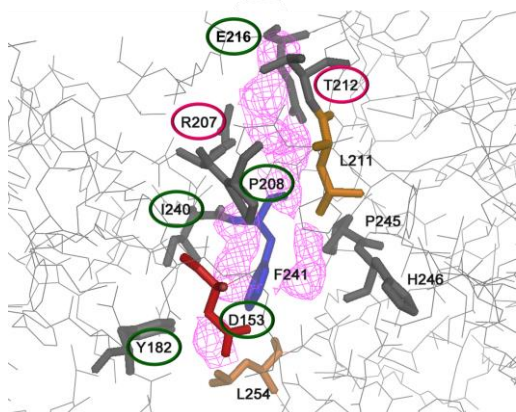


図2 野生型 ER-60 と A β ペプチドの複合体の結合領域の構造

プチドの複合体の結晶構造解析から、12 のアミノ酸残基が結合領域に近接していることが明らかとなった。そこで、これら 12 個のアミノ酸をアラニンに換えた変異タンパク質の A β ペプチド結合能を解析した。その結果、図2の赤丸で示したアミノ酸残基 (R202, T212) の置換により A β ペプチドとの結合能がほぼ完全に失われた。また、青丸で示したアミノ酸残基のアラニンへの置換により、結合能が低下した。一方、他のアミノ酸残基の置換は結合能にほとんど影響を与えなかった。

(4) (3) の解析で A β ペプチドとの結合能が著しく損なわれた D153 と T121 をアラニンに変異させたりコンビナント b-b' および A β ペプチドとの複合体の結晶を地上および国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟のタンパク質結晶生成装置にて微小重力環境下で結晶を作製した。地上に比較して微少重力環境下では大幅な分解能の改善が見られた。得られた解析データセットは最高分解能がアミノ酸残基のフィッティングに十分な分解能である 1.5Å に到達した。作製した結晶の構造解析を行い、これらの変異タンパク質の立体構造が野生型と同じであるが、A β ペプチドと推定される不明瞭な電子密度が全く観察されないことが明らかとなった。以上の結果は b-b' ドメインの D153 と T121 が A β ペプチドとの結合に必須であることを示した。他のアミノ酸残基の変異タンパク質を作製し、それらの b-b' ドメインへの結合能と複合体結晶構造解析との関係を比較検討した。その結果、A β ペプチドとの結合親和性が低い変異 b-b' の結晶では水の電子密度しか観察されず、一方結合親和性が高い変異 b-b' の結晶では再び不明瞭なペプチド由来と推定される電子密度が観察された。以上の結果から、ER-60 は b-b' 領域で A β ペプチドと 1 対 1 のモル比で結合することにより A β ペプチドのポリマー形成を妨げることでその毒性発現を抑制すること、A β ペプチドとの結合は固定された様式がなくフレキシブルな結合様式によることが示唆された。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究により、脳の海馬において ER-60 は A β ペプチドの毒性から神経細胞を防御する作用を有することが明らかとなった。また、その防御作用は、ER-60 の b-b' ドメインが A β ペプチドを結合することでその重合化を阻害することにより発揮されていることが示された。さらに、b-b' ドメインの結合領域が特定され、結合に必須のアミノ酸残基がみだされた。このことは、ER-60 の分子シャペロンとしてのペプチド鎖認識機構に重要な発展をもたらす成果であり、ER-60 の新たな生理機能を発見したことになる。さらに、アルツハイマー病の原因である A β ペプチド

の重合化抑制をターゲットとする創薬に有望な知見を提供するものであり、さらなる健康科学への応用展開が期待される。

<引用文献>

- ①Urade, R. *et al. J. Biol. Chem.* **267**, 1992, 15152.
- ②Zapun, A. *et al. J. Biol. Chem.*, **273**, 1998, 6009.
- ③Otsu, M., Urade, R. *et al. J. Biol. Chem.* **270**, 1995, 14958.
- ④Urade, R. *et al. Biochemistry* **43**, 2004, 8858.
- ⑤Okudo, H., Urade, R. *et al. J. Biochem.*, **138**, 2005, 773.
- ⑥Adeli, K., Urade, R. *et al. J. Biol. Chem.* **272**, 1997, 22489.
- ⑦ MaCormic, A.L., Urade, R. *et al. Biochemistry*, **44**, 2005, 5794.
- ⑧Qiu, W., Urade, R. *et al. Biochemistry* **43**, 2004, 4819.
- ⑨Garbi, N. *et al. Nature Immun.* **7**, 2005, 93.
- ⑩Li, Y., and Camacho, P. *J. Cell Biol.* **164**, 2004, 35.
- ⑪Morand, J.-P.F. *et al. J. Biol. Chem.*, **280**, 2005, 17626
- ⑫Hetz, C. *et al. J. Neurosci.* **25**, 2005, 2793.
- ⑬Kanekiyo, T., Okazaki, Y., Urade, Y. and Urade, R. *FEBS J.*, 2008, **275**, 197.

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5件)

- ①Identification and characterization of GmPDIL7, a soybean ER membrane-bound protein disulfide isomerase family protein. Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Urade R. *FEBS J.* **284**, 2017, 414-428, doi: 10.1111/febs.13984 (査読あり)
- ② Cooperative Protein Folding by Two Protein Thiol Disulfide Oxidoreductases and 1 in Soybean. Matsusaki M, Okuda A, Masuda T, Koishihara K, Mita R, Iwasaki K, Hara K, Naruo Y, Hirose A, Tsuchi Y, Urade R. *Plant Physiol.* **170**, 2016, 774-789, doi: 10.1104/pp.15.01781 (査読あり)
- ③ Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. (2015) Kimura S, Higashino Y, Kitao Y, Masuda T, Urade R. *BMC Plant Biol.* **15**, 2015, 73, doi: 10.1186/s12870-015-0460-2 (査読あり)
- ④ Disulfide bond formation activity of soybean quiescin sulfhydryl oxidase. Okuda A, Matsusaki M, Higashino Y, Masuda T, Urade R. *FEBS J.* **281**, 2014, 5341-5355.

- doi: 10.1111/febs.13079 (査読あり)
- ⑤Role of cysteine-protease CGHC motifs of ER-60, a protein disulfide isomerase, in hepatic apolipoprotein B100 degradation. Rutledge AC, Qiu W, Zhang R, Urade R. Adeli K. *Arch. Biochem. Biophys.* **537**, 2013, 104-112. doi: 10.1016/j.abb.2013.06.013 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- ①Effect of ER-60 against cytotoxicity of amyloid beta-peptide
第89回日本生化学会大会、2016年10月25日、仙台国際会議場
- ②ER-60のアミロイドβ細胞毒性抑制機構
第14回蛋白質化学会、2014年6月26日、ワークピア横浜
- ②第7回レドックスイノベーションシンポジウム、2014年3月7日、東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

裏出 令子 (Reiko Urade)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 90167289

(2) 研究分担者

裏出 良博 (Yoshihiro Urade)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授
研究者番号: 10201360

(3) 連携研究者

ラザルス ミハエル (Michael Lazarus)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・若手フェロー
研究者番号: 80469650

(4) 連携研究者

シェラス ヨアン (Cherasse Yoan)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員
研究者番号: 60544319

(5) 連携研究者

永田 奈々恵 (Nanae Nagata)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員
研究者番号: 80390805

(6) 研究協力者

東野 ゆうき (Yuki Higashino)
京都大学・大学院農学研究科・技術職員

(7) 研究協力者

松崎 元紀 (Motonori Natsusaki)
京都大学・大学院農学研究科・研究員

(8) 研究協力者

奥田 綾 (Aya Okuda)

京都大学・大学院農学研究科・学術振興会
特別研究員 PD