

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460100

研究課題名(和文)カルシウム放出調節機構に焦点をあてた小胞体ストレス誘導分子Herpの機能解析

研究課題名(英文)Function analysis of endoplasmic reticulum stress inducible protein Herp focused on a calcium release in endoplasmic reticulum

研究代表者

前田 智司(MAEDA, Tomoji)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60303294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレスで誘導されるHomocysteine-induced ER protein (Herp)は機能が不明な小胞体局在タンパク質で、細胞内量が厳密に制御されていることが報告されており、小胞体関連分解に関与すると考えられている。本申請では、Herpが小胞体でのカルシウム放出機構に関連していること、およびHerpの分解がユビキチンプロテアソーム分解系と非ユビキチンプロテアソームによって制御されていることを明らかにした。これらの結果からも、Herpがカルシウム放出などの生体内にとって重要な役割を果たしているために、細胞内量が厳密に制御されている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Homocysteine-inducible endoplasmic reticulum protein (Herp) is an endoplasmic reticulum stress-inducible membrane protein that is involved in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). Herp expression is maintained at low levels through a strict regulatory mechanism. However, the mechanisms through which Herp is maintained at low levels remain unclear. Here, we showed that Herp degradation was also regulated through ubiquitination mechanisms or a ubiquitin-independent pathway. In addition, we found that Herp is involved in calcium release in endoplasmic reticulum via inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) receptor. These results suggested that Herp is involved in several important functions, such as ERAD and calcium release, its levels may be strictly regulated by degradation through multiple pathways in response to various physiological conditions.

研究分野：医療薬学

キーワード：Herp 小胞体 小胞体関連分解 カルシウム放出 ユビキチン プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

小胞体のタンパク質品質管理機構の破綻は小胞体ストレスとして、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患を始め、脳虚血、うつ病、糖尿病、動脈硬化、がん等の、多くの疾患の発症や病態形成に関与する可能性が示唆されている。これらのうち、神経変性疾患は高齢化社会を迎え多発することが危惧されるが、発症機構に関しては未解明な点が多く、有効な根本的治療薬はまだ見出されていない。その一方で、神経変性疾患に共通する特徴として変性タンパク質の蓄積が認められ、小胞体ストレスとの関連性が報告されており、小胞体ストレスの抑制が根本的治療薬開発の鍵として期待される。また、小胞体は、膜たんぱく質や分泌タンパク質の成熟、ジスルフィド結合の形成などに働くだけでなく、細胞内の情報伝達物質として働くカルシウムの貯蔵庫となっている。通常、細胞内のカルシウム濃度は、きわめて低く抑えられており、細胞内カルシウム濃度上昇に関しては代表的な機構が2つあり、1つが細胞膜上にあるカルシウムイオンチャンネルを通じた細胞外からの流入で、2つが小胞体からのカルシウム動員である。小胞体からの動員は小胞体に局在するカルシウム放出チャンネルであるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP₃)受容体を介して行われ、IP₃受容体の制御に小胞体局在タンパク質が関与していることが報告されている。

Homocysteine-induced ER protein (Herp) は小胞体ストレスにより誘導される。Herp は小胞体のミスフォールドタンパク質を細胞質へと輸送し、26S プロテアソームへの引き渡し役と考えられている小胞体局在タンパク質で小胞体関連分解(ERAD)に関与していると言われている。また、Herp はそれ自身もユビキチン-プロテアソーム系により迅速に分解されることが知られている。Herp 欠損マウスにおいては、肝臓の ERAD 基質の分解が低下しているとともに、耐糖能の障害、脳虚血に対する抵抗性の低下を示すが、ホモ Herp 欠損マウスは致死にはならず、表現系は野生型と差異がないことが報告されている。これまでに、我々は Herp がアルツハイマー病の発症原因の1つであるアミロイドベーター (Aβ) の産生制御に関わっていること、Aβ産生に関わるプロテアーゼであるプレセニン複合体(ガンマーセクレターゼ)の構成因子の1つであるプレセニンに結合すること、さらに、プレセニン複合体の構成因子であるニカストリンの分解に関与していることを明らかにしてきた。また、Herp 自身の分解および Herp のカルシウム放出における影響についても研究を進めており、非常に興味深い結果が得られている。これまでに得られている結果は、一般的にユビキチン-プロテアソーム分解における目印となるユビキチンが付加されるアミノ酸残基はリジン残基であることが知られている

が、Herp 変異体においてすべてのリジン残基を変異および欠失させても Herp 分解の阻害はおこらず、その分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 によっても阻害された。リジン残基以外のアミノ酸がユビキチン化されている可能性と、ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の関与が考えられた。ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の関与についての詳細な検討により、ユビキチン非依存性プロテアソーム分解系として報告されている NADH quinone oxidoreductase-1 (NQO1) が関与する分解系で Herp が分解されることを明らかにした。しかしながら、なぜ Herp の細胞内量が厳密に制御されているかは現時点で不明である。がん抑制因子として機能しており細胞増殖に重要な役割を担っている p53 もユビキチン依存・ユビキチン非依存の分解制御を受けていることから、小胞体で重要な役割を担っている Herp も細胞内量が厳密に制御されている可能性が考えられる。そこで、細胞内のカルシウム濃度をきわめて低く抑えられている機構に Herp が関与している可能性が十分に考えられ、カルシウム放出調節機構に焦点をあてて Herp の小胞体で機能解析を行うことを計画した。

2. 研究の目的

小胞体のタンパク質品質管理機構の破綻は小胞体ストレスとして多くの疾患の発症や病態形成に関与する可能性が示唆されている。小胞体ストレスで誘導される Herp は機能が不明な小胞体局在タンパク質である。したがって、Herp の小胞体における機能を明らかにすることは、小胞体ストレスによって引き起こされる疾患の発症原因や治療法開発に繋がる可能性が考えられる。そこで、本申請においては、特にカルシウム放出調節機構に焦点をあて小胞体での Herp の機能解析を計画した。

3. 研究の方法

Herp による細胞内カルシウム(Ca²⁺)濃度制御機構の解明：近年小胞体カルシウムチャンネルである IP₃受容体の制御に小胞体局在タンパク質 Erp44 や分子シャペロン GRP78 が関与していることが報告された。また、予備的な研究より Herp 欠損細胞において小胞体からのカルシウム動員が抑制されることを確認している。そこで、本申請では、空間的および時間的解像度に優れた高速共焦点レーザー顕微鏡(Nikon RCM/Ab)を用いて、Herp 欠損細胞内のカルシウム動態を明らかにする。

(1) Herp 欠損細胞における細胞内カルシウム濃度測定条件の確立 Herp 欠損細胞をカバーグラス上に播種し 80%程度のコンフエント状態まで培養を行う。その後、カルシウム感

受性の蛍光色素 (Indo-1/AM) を負荷し、小胞体からのカルシウム動員機構に關与するムスカリン受容体刺激物質等を添加し、細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響について高速共焦点レーザー顕微鏡 (RCM/Ab) を用いて検討する。条件検討はほぼ確立しつつあり、予備実験においては Herp 欠損細胞においては著しくカルシウム動員が抑制されている結果を得ている。さらに、Herp siRNA を用いて Herp をノックダウンし、細胞内カルシウム濃度の測定を行う。

(2) Herp 欠損細胞における細胞内カルシウム濃度制御機構の解明: Herp は細胞内カルシウム濃度制御に關与していると考えられるので(1)の実験条件をもとに Herp 欠損細胞における細胞内カルシウム動態を経時的に調べる。Herp カバーグラスに付着させ、カルシウム感受性の蛍光色素 (Indo-1/AM) を負荷し灌流チェンバー装着後周囲を Hepes バッファーで灌流する。灌流液にムスカリン受容体刺激物質等を添加し、細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響について高速共焦点レーザー顕微鏡 (RCM/Ab) を用いて検討する。経時的变化の解析により、小胞体依存のカルシウム動員異常か、小胞体依存性細胞外カルシウム流入機構 (store operated calcium channel : SOC) の異常によるか判断することが可能である。さらに、各細胞群における細胞内カルシウム濃度変動の伝播 (細胞間のカルシウム波) の特性の検討も行える。

Herp の分解機構の解明: Herp の半減期は約 2 時間であり、その細胞内量は厳密に制御されていることが考えられるが、制御機構を含め詳細はほとんど解明されていない。そこで、シノビオリンを中心に Herp 分解機構の解明を行う。

(1) ユビキチン-プロテアソーム系を介した Herp 分解機構: シノビオリンを欠損した細胞では、Herp の細胞内量は著しく上昇している。さらに、プロテアーゼ阻害剤である MG132 処理を行った場合 Herp の分解が阻害されることより、プロテアソームの關与が考えられる。そこで、ユビキチン-プロテアソーム系を介した Herp 分解機構の解析を行う。

Herp 分解にシノビオリンが關与しているか解析を行う。シノビオリン以外のユビキチンリガーゼの存在が Herp の分解抑制に影響を与えることが考えられるのでシノビオ

リン以外のユビキチンリガーゼの同定を行う。具体的には、ERAD に關与しているユビキチンリガーゼを中心にシノビオリン以外のユビキチンリガーゼの同定を行う。さらに、Herp 分解に關与するユビキチンリガーゼが AB 産生を促進するか検討を行う。**(2) ユビキチン-プロテアソーム系以外の Herp の分解機構:** 予備的な実験結果より、ユビキチン付加に關係するすべてのリジン残基を変異および欠失させた Herp 変異体においても Herp 分解の阻害はおこらず、その分解は MG132 により阻害されることを確認した。したがって、リジン残基以外のアミノ酸がユビキチン化されている可能性と、ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の關与が考えられる。そこで、リジン残基を介さない Herp のプロテアソーム分解機構の解析を行う。具体的には、

Herp は 391 アミノ酸からなるタンパク質であるが、ユビキチン化されることが報告されているアミノ酸としてセリンが 32 残基、スレオニンが 14 残基、システインを 2 残基含んでいる。したがって、変異体を作成してユビキチン残基を同定することは困難なので、LC-MS/MS を駆使して解析を行う。ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の關与についての検討をすでに行っており、分解系としては、NQ01 が關与するユビキチン非依存性プロテアソーム分解系が Herp の分解に關与する結果が得られている。今後この分解機構の解析を詳細に行っていく。さらに NQ01 が AB 産生を促進するか検討を行う。

Herp 欠損マウスの臓器 (肝臓・脳) におけるカルシウム放出変動の解析: Herp 欠損マウスにおいては、肝臓の ERAD 基質の分解が低下しているとともに、耐糖能の障害、脳虚血に対する抵抗性の低下を示すことが報告されている。そこで、Herp の欠損が個体または、組織のカルシウム動態にどのような影響を与えているか実際の組織を用いて (代表的に肝臓および脳) 検討を行う。**(1) カルシウム濃度測定が可能な組織標本系の確立と、画像解析:**

Herp 欠損マウスの肝臓または脳を用いて標本作製する。上記と同様の実験系で試薬付加による灌流実験を行う。細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響について画像解析装置 (RCM/Ab) を用いて検討する。当該標本を組織化学的・電子顕微鏡学的に観察し、変化を認めた細胞の種類を同定する。

Herp 欠損組織におけるカルシウム動態の異常が肝臓の ERAD 基質の分解が低下、耐糖能の障害を含め病態発症等に関与しているか検討を行う。

Herp の小胞体での機能説明: Herp の細胞内量が厳密に制御されている機構の 1 つとして、数種類のユビキチンリガーゼやユビキチン非依存性プロテアソーム分解系が、Herp の分解に関与している可能性がある。そこで、どのような使い分けがされているか解析を行うことで、Herp の機能説明につながると考えている。

4. 研究成果

Herp による細胞内カルシウム(Ca^{2+})濃度制御

機構の説明: Herp 欠損細胞において小胞体からのカルシウム動員が抑制されてことを空間的および時間的解像度に優れた高速共焦点レーザー顕微鏡(Nikon RCM/Ab)を用いて確認を行った。さらに、Herp siRNA を用いて Herp をノックダウンし、小胞体からのカルシウム動員が抑制されることも観察した。以上のことより、Herp が小胞体からのカルシウム動員に関与していることが示唆された。Herp 機能欠損によりどのような機構でカルシウム放出が抑制されているか検討を行った。予備的な検討より小胞体からのカルシウム放出に関わるイノシトール三リン酸(IP3)受容体の発現が Herp をノックダウンすることにより減少する結果が得られているので、再現性および、Herp 欠損細胞に IP3 受容体を過剰発現させた場合に小胞体からのカルシウム放出が相補されるか検討を行うため、IP3 受容体の cDNA をサブクローニングした発現ベクター系の構築を行った。

Herp の分解機構の説明: Herp の半減期は約 2 時間であり、その細胞内量は厳密に制御されていることが考えられるが、制御機構を含め詳細はほとんど解明されていない。そこで、Herp と相互作用することが報告されているユビキチンリガーゼであるシノビオリンを中心に Herp 分解機構の解明を行った。シノビオリンを欠損した細胞では、Herp の細胞内量は著しく上昇しており、さらに、プロテアーゼ阻害剤である MG132 処理を行った場合 Herp の分解が阻害されることより、シノビオリンを介したユビキチン-プロテアソームの関与が考えられた。一般的にユビキチン-

プロテアソーム分解における目印となるユビキチンが付加されるアミノ酸残基はリジン残基であることが知られているが、Herp 変異体においてすべてのリジン残基を変異および欠失させても Herp 分解の阻害はおこらず、その分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 によっても阻害された。リジン残基以外のアミノ酸がユビキチン化されている可能性と、ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の関与が考えられた。そこで、リジン残基以外のアミノ酸がユビキチン化されている可能性があるか検討を行うために、Herp 内のリジン残基をすべてアルギニン残基に置換した変異体を用いて、ユビキチン化の程度等の検討を行った。その結果、野生型と比べて、ユビキチン化の程度は減少していることが示された。さらに、どの残基がユビキチン化されているかを同定するために、Herp 内のすべてのリジン残基をアルギニン残基に置換した Herp 変異体グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合発現プラスミドを大腸菌に形質転換し発現させ、HiTrapQ HP カラムを用いて Herp 変異体タンパク質を精製した。精製した Herp 変異タンパク質を invitro でユビキチン化反応を行い、モノ(mono)、ジ(di)、トリ(tri)-ユビキチン化 Herp 変異体を精製し、LC/MS/MS を用いて解析を行った。しかしながら、明瞭な結果が得られず、研究を継続中である。また、ユビキチン非依存のプロテアソーム分解の関与についての詳細な検討により、ユビキチン非依存性プロテアソーム分解系として報告されている NADH quinone oxidoreductase-1 (NQO1) が関与する分解系で Herp が分解されることを明らかにした。これらの結果をまとめて論文として発表した。

Herp 欠損マウスの臓器(肝臓・脳)におけるカルシウム放出変動の解析:

カルシウム濃度測定が可能な組織標本系の確立を現在行っており、今後も研究を継続する予定である。

Herp の小胞体での機能説明: Herp の細胞内量が厳密に制御されている機構の 1 つとして、数種類のユビキチンリガーゼやユビキチン非依存性プロテアソーム分解系が、Herp の分解に関与している可能性がある。そこで、シノビオリン以外のユビキチンリガーゼが Herp の分解に関与しているか検討を行った。その結果、Herp のユビキチン-プロテアソ-

ムの分解に関与することが報告されているユビキチンリガーゼである gp78 および RNF5 の発現がシノビオリンに制御されていることをシノビオリン欠損細胞を用いて明らかにした。しかしながら、Herp が小胞体関連分解(ERAD)にどのような関連をしているか研究を継続中である。

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 2 件)

1. Maeda T, Tanabe-Fujimura C, Fujita Y Abe C, Nanakida Y, Zou K, Liu J, Liu S, Nakajima T, Komano H. (2016) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of homocysteine-inducible endoplasmic reticulum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 473, 1276-1280
Corresponding author 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.057.

2. Moriguchi-Mori K, Higashio H, Isobe K, Kumagai M, Sasaki K, Satoh Y, Kuji A, Saino T. (2016) P2Y purinoceptors mediate ATP-induced changes in intracellular calcium and amylase release in acinar cells of mouse parotid glands. *Biomedical Research* 37, 37-4 査読有
doi: 10.2220/biomedres.37.37.

[学会発表](計 2 件)

1. 阿部ちひろ、鄒鶴、藤田融、劉俊俊、劉姝余、前田智司、駒野宏人: 小胞体ストレス誘導タンパク質 Herp のユビキチン非依存プロテアソーム分解機構解析、日本生化学会東北支部第 80 回例会・シンポジウム、2014 年 5 月(秋田)

2. 七木田理乃、鄒鶴、藤田融、劉俊俊、劉姝余、前田智司、駒野宏人: 小胞体ストレス誘導タンパク質 Herp の分解機構の解析、日本生化学会東北支部第 80 回例会・シンポジウム、2014 年 5 月(秋田)

[その他]

著書

前田智司 はさみ(プロテアーゼ活性)を上

手に使ったアルツハイマー病治療法開発の試み 埼玉県薬剤師会雑誌, 41(7), 14-16 (2015)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 智司 (MAEDA Tomoji)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 60303294

(2)研究分担者

松浦 誠 (MATSUURA Makoto)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00405846

(3)研究分担者

齋野 朝幸 (SAINO Tomoyuki)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40305991