

肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの作出と
小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する
応答の検討

2023

中嶋 将久

目次

要約	-----	1
序論	-----	4
結果	-----	9
考察	-----	21
実験方法	-----	25
参考文献	-----	30
論文目録	-----	38
謝辞	-----	39

要約

Coiled-coil domain containing 47 (CCDC47) は 1 回膜貫通型の小胞体膜タンパク質であり、小胞体内腔側領域に Ca^{2+} 結合活性を有している。*Ccdc47* 欠損マウス胎児線維芽細胞を用いた解析で、小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の減少と小胞体ストレスに対する感受性の亢進が認められたことから、CCDC47 が小胞体 Ca^{2+} 恒常性の維持を担っていることが想定される。また、複数回膜貫通型タンパク質の生合成において、CCDC47 が膜内シャペロン複合体の構成分子の 1 つとして複数回膜貫通型タンパク質のフォールディングに寄与することが報告されている。

ヒト *CCDC47* 遺伝子変異が肝機能障害、骨形成異常、全般的成長遅延など多系統疾患を引き起こすことから、CCDC47 が正常な発生や組織生理機能において重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、*Ccdc47* 欠損マウスは胎生 10.5 日前後で致死となるため、機能欠損変異による病態やその分子機序に関する解析はほとんど行われておらず、生体内における CCDC47 の機能的な重要性は検討されていない。本研究では、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスを作成し、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンにより誘導される小胞体ストレスへの応答を検討した。また、初代培養肝細胞を用いた Ca^{2+} イメージングを行い、*Ccdc47* 欠損による Ca^{2+} ハンドリング異常を検討した。

本研究では、Cre/loxP システムを用いて肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウス (cKO マウス) を作出した。cKO マウスは正常に発育し、明瞭な形態的異常は観察されなかった。

マウス胎児線維芽細胞において、*Ccdc47* 欠損が小胞体ストレス誘導剤による細胞死を亢進させることが報告されている。小胞体ストレスに対する感受

性の亢進が生体内組織においても認められるか検討するために、cKOマウスにツニカマイシンを腹腔内投与し、その応答を観察した。cKOマウスでは、ツニカマイシン投与により誘導される肝臓への脂肪蓄積が対象群と比較して有意に亢進していた。また、C/EBP homologous protein (CHOP) タンパク質の発現が有意に高かった。CHOPはC/EBP α と二量体を形成することでその転写活性を阻害し、代謝関連遺伝子の発現を抑制することが知られている。Real-time PCR法により代謝関連遺伝子のmRNA発現レベルを検討したところ、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の発現を制御する核内受容体PPAR α のmRNA発現レベルが有意に低下していた。この結果から、*Ccdc47*欠損マウス肝臓におけるツニカマイシン誘導性脂肪蓄積の亢進に、PPAR α の減少による脂肪酸 β 酸化の抑制が寄与することが示唆された。

次に*Ccdc47*欠損マウス胎児線維芽細胞で認められた小胞体Ca²⁺ハンドリング異常が、*Ccdc47*欠損肝細胞でも認められるか検討するために、初代培養肝細胞を用いたCa²⁺イメージングを行なった。*Ccdc47*欠損肝細胞の静止状態のCa²⁺レベルは対照群肝細胞と比較して有意に低下していた。また、Ca²⁺-free溶液中でイオノマイシン、及び、Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 阻害剤タプシガルギン処置により誘導されるCa²⁺トランジェントも有意に低下しており、肝細胞における*Ccdc47*欠損が小胞体Ca²⁺貯蔵量を減少させることが示唆された。

以上の結果から、肝細胞における*Ccdc47*欠損がツニカマイシン誘導性小胞体ストレスへの適応を抑制すること、及び、小胞体Ca²⁺貯蔵量を減少させることが明らかになった。小胞体Ca²⁺貯蔵量の減少はCa²⁺依存性分子シャペロンの活性低下を引き起こし、小胞体ストレスへの抵抗性を低下させると考えられる。*Ccdc47*欠損による分子シャペロンの機能不全がツニカマイシン誘導

性小胞体ストレスへの適応を抑制し、CHOP の発現レベルが高く維持される
ことで肝臓への脂肪蓄積が亢進したと予想される。

序論

Ca^{2+} は細胞内セカンドメッセンジャーとして機能する極めて重要なシグナル分子であり、神経伝達物質の分泌や筋収縮、遺伝子発現など広範な細胞生理機能の制御に関与している [1, 2]。細胞外 Ca^{2+} 濃度が 1~2 mM であるのに対して、定常状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度は数十 nM と非常に低く保たれており、細胞に様々な刺激が加わると細胞内 Ca^{2+} 濃度は数百 nM~数十 μM に上昇する [3]。その細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は刺激に応じて異なる時空間的なパターンを示し、パターン特異的な下流のシグナル応答が誘導されることで、 Ca^{2+} が多岐にわたる細胞生理機能を制御することが可能になっている [3]。細胞内 Ca^{2+} は、主に細胞外からの流入と細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体からの放出の2つの経路で供給される [1, 2]。細胞外からの流入は、細胞膜の脱分極や物理的圧力、アゴニスト、細胞内メッセンジャーなどの刺激に応答する多様な Ca^{2+} チャンネルを介して引き起こされる [2]。また、小胞体 Ca^{2+} ストアからは、小胞体膜に発現する Ca^{2+} 放出チャンネル、 IP_3 受容体やリアノジン受容体を介して Ca^{2+} が放出される [4, 5]。一旦上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度は、plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) や $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) による細胞外への排出と、Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) による小胞体への取り込みにより定常状態まで低下する [1, 2]。

小胞体 Ca^{2+} ストアは、上述した IP_3 受容体やリアノジン受容体、SERCA ポンプに加えて、小胞体に発現する Ca^{2+} 結合タンパク質など多様な分子によりその恒常性が維持されている [6-8]。小胞体に貯蔵された Ca^{2+} は、細胞質への放出を介して Ca^{2+} シグナリングに寄与するだけでなく、分子シャペロンなど小胞体に多数発現する Ca^{2+} 依存性タンパク質が正常に機能し、タンパク質合成やフォ

ールディング、翻訳後修飾などの小胞体機能を維持することにおいても重要な役割を担っている [6-8]。Calreticulin や glucose regulated protein 94 (GRP94)、binding immunoglobulin protein (BiP) などの分子シャペロンは Ca^{2+} 結合活性を有しており、そのシャペロン活性を発揮するためには小胞体 Ca^{2+} 濃度が高く維持されている必要がある [8, 9]。一方で、小胞体内の Ca^{2+} のほとんどがこれら分子シャペロンに結合しており、 Ca^{2+} 緩衝タンパク質として働くことで小胞体 Ca^{2+} 濃度を維持していることも知られている [8, 9]。例えば、Calreticulin の C 末端領域は酸性アミノ酸残基に富んでおり、1 分子の Calreticulin に最大 25 個の Ca^{2+} が結合する [9]。Calreticulin の欠損により小胞体 Ca^{2+} ストア量が減少することや、Calreticulin の発現量増加により小胞体 Ca^{2+} ストア量が増加することから、Calreticulin が小胞体の Ca^{2+} 貯蔵を担っていることが示されている [10]。BiP は Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand を有しており、分子シャペロンとしてタンパク質のフォールディングに寄与するだけでなく、 Ca^{2+} 貯蔵機能も担っている [11]。これら分子の機能異常による小胞体 Ca^{2+} 恒常性の破綻は、 Ca^{2+} シグナリング異常や Ca^{2+} 依存性タンパク質の活性低下を介した小胞体機能不全を引き起こし、小胞体ストレスを誘導することで、様々な疾患の原因となることが報告されている [12-14]。タプシガルギンによる SERCA ポンプの阻害は、小胞体 Ca^{2+} ストア量を減少させ、 Ca^{2+} 依存性分子シャペロンの活性低下を引き起こす。その結果、小胞体に不良タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスが誘導される [13]。細胞株における Calreticulin 遺伝子のノックダウンはタプシガルギン誘導性の小胞体ストレスを亢進し、Calreticulin の過剰発現はタプシガルギン誘導性の小胞体ストレスを軽減する [15]。また、Calreticulin 遺伝子欠損マウスは、心臓の発生不全により胎生 12.5-16.5 日齢で致死となることから、Calreticulin による小胞体 Ca^{2+} ストアの恒常性維持が生理的に重要であることが示されている

[16]。肝臓への脂肪蓄積による SERCA ポンプの活性低下と小胞体ストレスの誘導が肥満や 2 型糖尿病の要因となることが報告されているほか [17-19]、肝臓特異的 1 型 IP₃ 受容体欠損マウスにおいて、高脂肪食誘導性脂肪肝の形成が抑制されることが報告されており [19,20]、小胞体 Ca²⁺恒常性と代謝機能の関連性が示唆されている。このように、小胞体 Ca²⁺恒常性の維持に関与する様々な分子の生理的重要性が検討されている一方で、Ca²⁺制御への関与が見込まれるものの機能解析が進んでいない機能未知分子が小胞体に多数発現しており、それら分子の機能解析は小胞体 Ca²⁺制御やその生理的役割の理解に不可欠である。

当研究室は独自の手法により、Ca²⁺制御に関わる小胞体膜タンパク質を複数同定してきた [21]。ジャンクトフィリンは、興奮性細胞において、細胞膜と小胞体膜が近接した結合膜構造を形成するために必要な分子として我々が同定したタンパク質である [22]。結合膜構造は、細胞膜 Ca²⁺チャネルと小胞体リアノジン受容体が機能共役するために必要であり、ジャンクトフィリン欠損マウスは骨格筋収縮不良や心筋収縮不全、中枢機能障害による致死性を示す [23-25]。TRIC チャネルは、IP₃ 受容体やリアノジン受容体から Ca²⁺が放出される際に小胞体内腔に発生する負電荷を中和するカウンターイオンチャネルとして同定された [26]。TRIC チャネルには、興奮性細胞で高発現する TRIC-A と組織普遍的に発現する TRIC-B の 2 種類のサブタイプが存在する [26]。TRIC チャネルを欠損した細胞は小胞体からの Ca²⁺放出障害を示し、その生理機能解析の結果、*Tric-a* 欠損マウスが血管平滑筋収縮亢進による高血圧を示すことや [27]、*Tric-b* 欠損マウスが II 型肺胞上皮細胞のサーファクタント合成分泌不全により呼吸不全になること [28]、骨芽細胞のコラーゲン分泌不全により骨形成不全を引き起こすことを報告している [29]。

本研究の標的分子である Coiled-coil domain containing 47 (CCDC47) も当研究

室が同定した 1 回膜貫通型の小胞体膜タンパク質であり、Calumin と命名した [30]。CCDC47 は生物種を超えて保存されており、生体マウスでは組織普遍的に発現することから、細胞の基本的な機能を担っていることが想定される [30]。CCDC47 は、小胞体内腔側の N 末端にシグナルペプチドを、細胞質側の C 末端に Coiled-coil domain を有する [30]。CCDC47 の小胞体内腔側ドメインの 116 アミノ酸残基のうち、46 アミノ酸残基が酸性アミノ酸であるグルタミン酸とアスパラギン酸で構成されている [30]。この小胞体内腔側ドメインは Ca^{2+} 結合活性を有しており、1 分子の CCDC47 に最大 15 個の Ca^{2+} が結合する [30]。マウス胎児線維芽細胞では、*Ccdc47* 欠損により小胞体 Ca^{2+} ストア量が減少すること、及び、ストア作動性 Ca^{2+} 流入が減弱することが報告されており、CCDC47 が Ca^{2+} 恒常性の維持を担っていることが考えられる [30]。また、*Ccdc47* 欠損マウス胎児線維芽細胞において、SERCA 阻害薬タプシガルギンや N 型糖鎖修飾酵素阻害薬ツニカマイシン誘導性小胞体ストレスによるアポトーシスの亢進が認められたことから、CCDC47 が正常な小胞体ストレス応答に寄与することが示唆されている [30]。

最近では、CCDC47 が複数回膜貫通型タンパク質の生合成に関与することが報告されている [31-34]。複数回膜貫通型タンパク質の生合成において、膜貫通ドメイン (transmembrane domains : TMDs) は翻訳と共役して小胞体膜に挿入される [31]。TMDs に含まれる親水性アミノ酸残基は、疎水的環境の小胞体膜内で他の膜貫通ドメインと非特異的に結合し得る [31]。Chitwood らは、*in vitro* タンパク質発現系において、TMDs の親水性アミノ酸残基に結合する分子、protein associated with the ER translocon of 10 kDa (PAT10) を同定した [31]。さらに、CCDC47 が PAT10 と複合体 PAT complex を形成し、TMDs の親水性部分を疎水的環境から保護する膜内シャペロン複合体として機能することを明らかにした

[31]。細胞株を用いた解析では、*CCDC47* 遺伝子ノックダウンにより複数回膜貫通型タンパク質の分解が促進することが示されており [31]、*Ccdc47* 欠損マウス胎児線維芽細胞における小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少やストア作動性 Ca^{2+} 流入の減弱は、 Ca^{2+} 制御に関与する複数回膜貫通型タンパク質の発現量低下により引き起こされている可能性が考えられる。

上述したように、*CCDC47* の分子機能に関する解析が複数行われている一方で、生理機能に関する解析はほとんど行われていない。その理由として、*Ccdc47* 欠損マウスが発生遅延や心血管系の形成不全により胎生 10.5 日齢前後で致死となるため、出生後の個体を用いた生理学的解析が困難であることが挙げられる [30, 35]。現在、*CCDC47* 遺伝子の両アレルに変異を持つ患者が 4 名報告されており、肝機能障害や骨形成不全、成長遅延などの全身性の症状を呈していることから、*CCDC47* が生物種を超えて、正常な生理機能において必須の役割を担っていることが示唆される [36]。神経系や筋骨格系では患者ごとに異なる症状が報告されているのに対して、肝機能障害や胆汁鬱滞、血中胆汁酸濃度上昇など、肝臓に関連した症状は複数の患者が共通して発症していることから、*CCDC47* が肝臓において比較的重要な生理機能を担っていることが考えられる [36]。

そこで本研究では、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスを作出し、生体マウス肝臓における表現型を解析することで、*CCDC47* の肝臓における生理的意義を明らかにすることを試みた。

結果

1. 肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの作出

本研究では、Cre/loxP システムを用いて肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの作出を試みた。*Ccdc47* の第 1 エクソンの一部を挟むように *loxP* を挿入した *Ccdc47* Floxed マウスと、*Albumin* エンハンサー/プロモーターの制御下で Cre recombinase を発現する Albumin-Cre (Alb-Cre) マウスを交配し、*Ccdc47^{fl/fl}*, *Alb-Cre^{+/-}* マウスを得た (Fig. 1A)。まず、PCR 法で欠損部分を含む DNA 断片を増幅させたところ、肝臓でのみ欠損アレル由来の PCR 産物が検出された (Fig. 1B)。また、Real-time PCR 法および Western blotting 法により、それぞれ *Ccdc47* mRNA と CCDC47 タンパク質の発現量を検討したところ、肝臓特異的なシグナルの減弱が認められた (Fig. 1C, D)。以上の結果より、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウス (*Ccdc47* cKO マウス) が作出できたと判断した。

Ccdc47 cKO マウスは通常飼育条件下で正常に発育し、明瞭な形態的異常は観察されなかった (Fig. 2A)。12 週齢において、Control および *Ccdc47* cKO マウスの自由摂食時と絶食時の血糖値に有意な差はなかった (Fig. 2B)。同様に、体重あたりの肝重量にも有意な差はなかった (Fig. 2C)。肝臓パラフィン切片を作製し、HE 染色像を光学顕微鏡下で観察したところ、自由摂食時の肝臓組織像に異常は観察されなかった (Fig. 2D)。

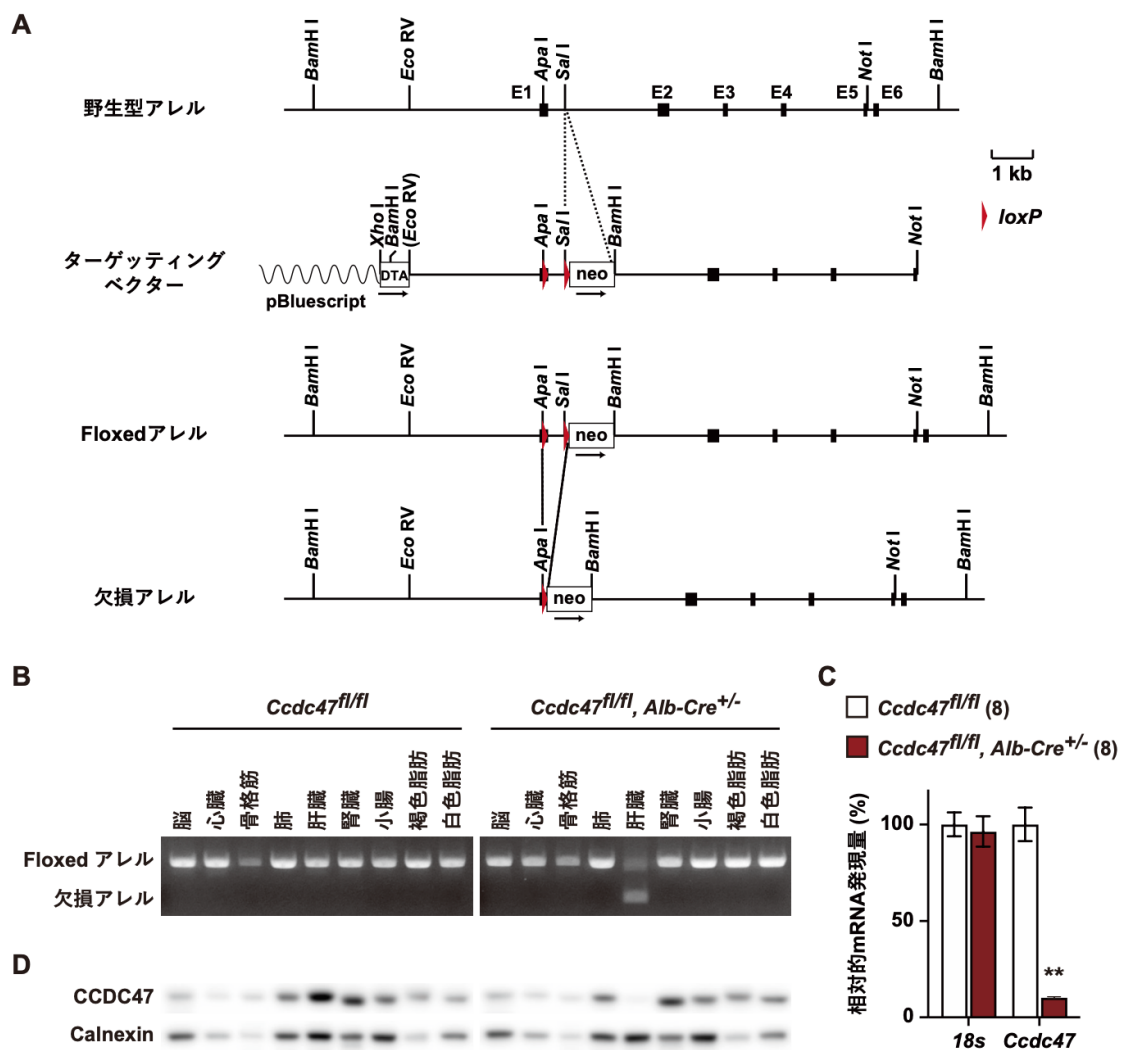


Figure 1 | 肝臓特異的 *Cdc47* 欠損マウスの作出

(A) *Cdc47* Floxed マウス作製における遺伝子ターゲティング方法。黒四角は *Cdc47* のエクソン、赤三角は *loxP* 配列を表す。(B) 12 週齢マウス組織における Floxed アレル、及び、欠損アレルの PCR 法による検出。各アレルに由来する PCR 産物はそれぞれ 849 bp、380 bp である。(C) 12 週齢マウス肝臓における *18s*、及び、*Cdc47* mRNA の Real-time PCR 法による検出。データは平均値±SEM で示した。解析したマウスの数を括弧内に示した。統計的な有意差をアスタリスクマークで示した (** $p < 0.01$, *t*-test)。(D) 12 週齢マウス組織における CCDC47、及び、Calnexin タンパク質の Western blotting 法による検出。

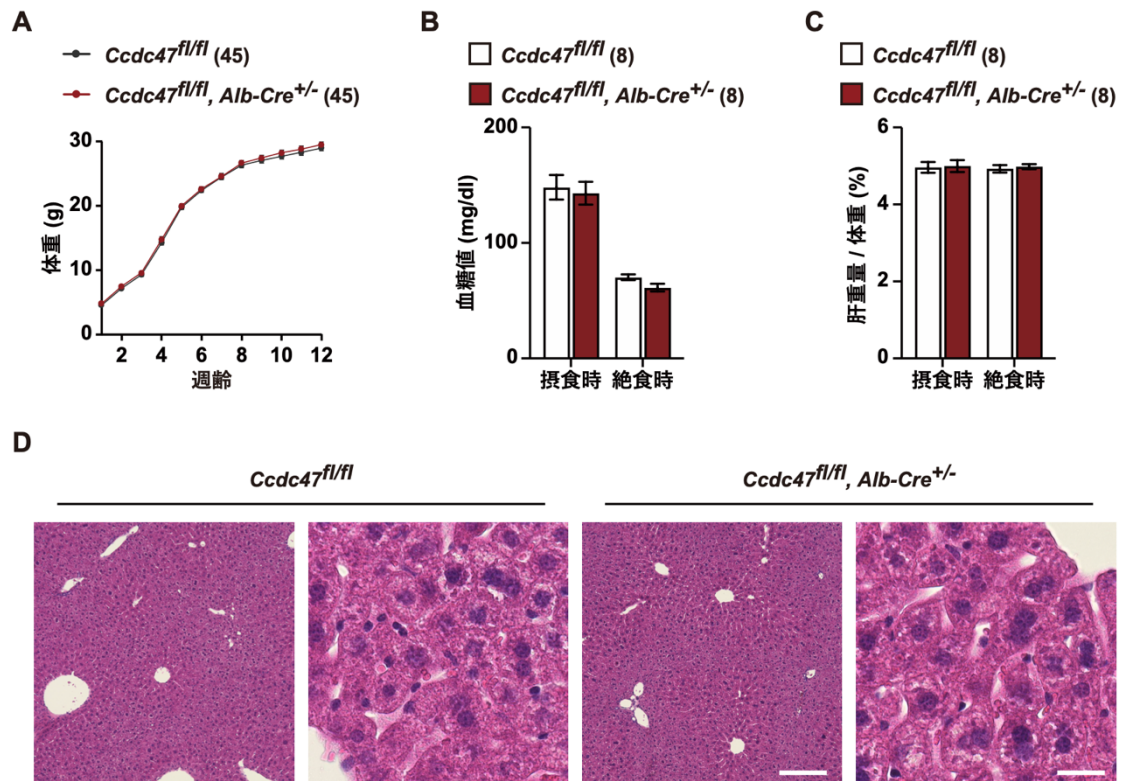


Figure 2 | 肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの通常飼育条件における表現型解析

(A) Control マウス、及び、*Ccdc47* cKO マウスの通常飼育条件における体重変化。(B) 12 週齢における自由摂食時、及び、16 時間絶食時の血糖値。(C) 12 週齢における自由摂食時、及び、16 時間絶食時の体重あたりの肝重量。A-C のデータは全て平均値±SEM で示した。解析したマウスの数を括弧内に示した。(D) 12 週齢マウスの肝臓パラフィン切片 (厚さ 6 μm) の HE 染色像。スケールバー、200 μm (左パネル)、25 μm (右パネル)。

2. ツニカマイシン誘導性小胞体ストレスへの応答の検討

通常飼育条件において、*Ccdc47* cKO マウスに顕著な異常は観察されなかった (Fig. 2)。当研究室の先行研究において、*Ccdc47* 欠損マウス胎児線維芽細胞の形態や増殖に異常は認められないものの、*Ccdc47* 欠損により小胞体ストレス誘導性アポトーシスが亢進することが報告されており [30]、CCDC47 が正常な小胞体ストレス応答に寄与していることが予想される。そこで、*in vivo* 小胞体ストレス負荷モデルを用いて、*Ccdc47* cKO マウスの小胞体ストレスに対する応答を検討した。ツニカマイシンをマウス腹腔内に投与すると、肝臓特異的に小胞体ストレスが誘導され、肝臓への脂肪蓄積が亢進することが知られている [37-39]。このツニカマイシン投与モデルは、ATF6 α や eIF2 α 、IRE1 α などの小胞体ストレス応答関連分子の肝臓における生理的な役割を検討する解析で利用されており、これら分子の機能欠損は肝臓の代謝調節不全を引き起こすことが報告されている [37, 38]。

Ccdc47 cKO マウスにツニカマイシンを投与し、24 時間後に肝臓を採取して解析を行った。肝臓凍結切片を作製し、Oil-Red-O 染色像を観察したところ、*Ccdc47* cKO マウス肝臓の染色が Control マウスの肝臓と比較して強い傾向にあった (Fig. 3A)。肝臓から総脂質を抽出し、トリグリセリド定量を行ったところ、Control マウスと比較して *Ccdc47* cKO マウスの肝トリグリセリド量が有意に高かった (Fig. 3B)。

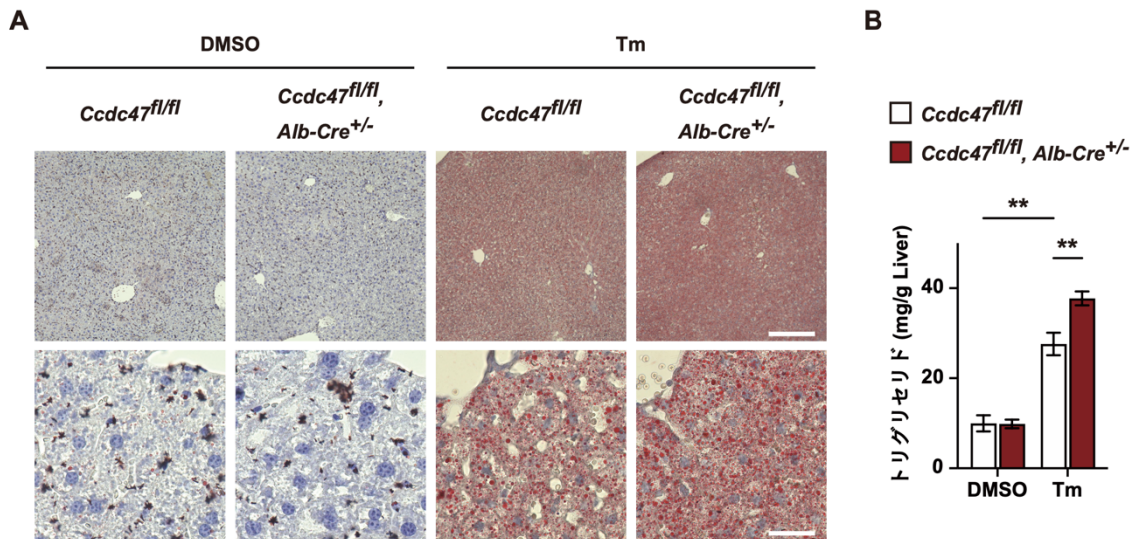


Figure 3 | ツニカマイシン誘導性の肝臓脂肪蓄積の検討

(A) 8週齢マウスの肝臓凍結切片 (厚さ 10 μm) の Oil-Red-O 染色像。スケールバー、200 μm (上パネル)、25 μm (下パネル)。(B) DMSO、及び、ツニカマイシン (Tm) 投与後 24 時間におけるマウス肝臓の肝重量あたりのトリグリセリド量。データは平均値 \pm SEM で示した。解析したマウスの数、 $n=4$ (DMSO 群)、 $n=6$ (Tm 群)。統計的な有意差をアスタリスクマークで示した (** $p < 0.01$, two-way ANOVA with Bonferroni test)。

3. *Ccdc47* 欠損による小胞体ストレス応答関連分子発現量への影響

ツニカマイシン投与モデルにおける肝臓脂肪蓄積のメカニズムとして、小胞体ストレスにより発現が誘導された C/EBP homologous protein (CHOP) タンパク質が、代謝関連遺伝子の発現を制御する転写因子 C/EBP α と二量体を形成し、その転写活性をドミナントネガティブに抑制することが知られている [40]。ツニカマイシン投与モデルにおける小胞体ストレス応答の機能不全は、CHOP の持続的な発現を介して肝臓への過剰な脂肪蓄積を誘導する [37, 38]。

Ccdc47 cKO マウス肝臓における脂肪蓄積亢進のメカニズムを明らかにするために、小胞体ストレス応答関連分子の発現を Western blotting 法により検討した。ツニカマイシン投与による CHOP タンパク質発現レベルの増加が、*Ccdc47* cKO マウスで有意に亢進していた (Fig. 4A)。また、ツニカマイシン投与により誘導される分子シャペロン Bip や小胞体ストレスセンサー ATF6 の発現が、*Ccdc47* cKO マウスでは有意に抑制されていた (Fig. 4A)。

Ccdc47 cKO マウス肝臓における CHOP タンパク質発現レベルの増加が認められたため、C/EBP α の転写標的となる代謝関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法により検討した。ツニカマイシン投与群の *Ccdc47* cKO マウスにおいて、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の発現を制御する核内受容体 PPAR α の mRNA 発現レベルが有意に低下していた (Fig. 4B)。

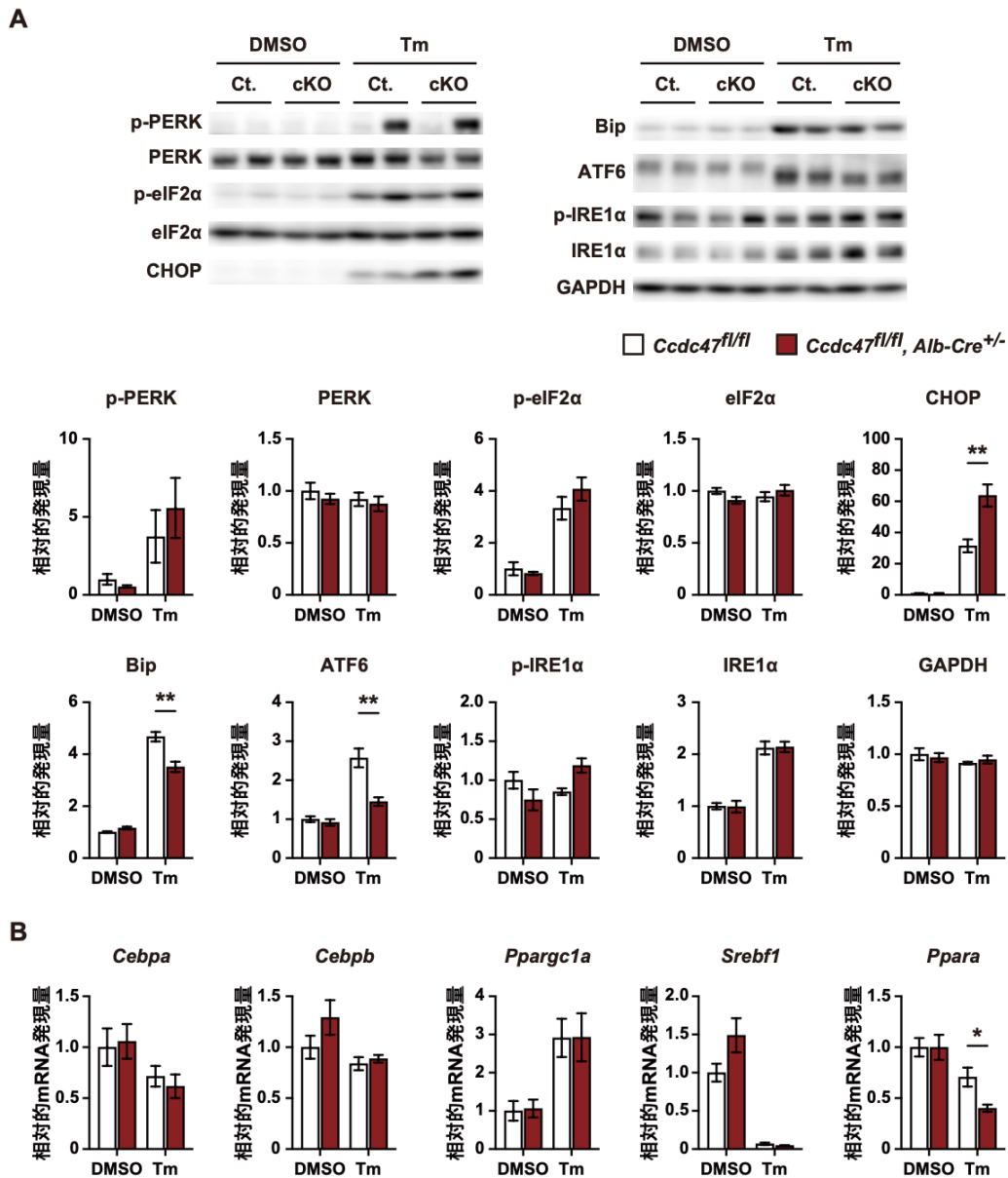


Figure 4 | 小胞体ストレス応答関連分子の発現検討

(A) DMSO、及び、ツニカマイシン (Tm) 投与後 24 時間のマウス肝臓における小胞体ストレス応答関連分子の Western blotting 法による検出。(B) DMSO、及び、Tm 投与後 24 時間のマウス肝臓における代謝関連遺伝子 mRNA の Real-time PCR 法による検出。データは全て平均値±SEM で示した。解析したマウスの数、n=4 (DMSO 群)、n=6 (Tm 群)。統計的な有意差をアスタリスクマークで示した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、two-way ANOVA with Bonferroni test)。

4. 初代培養肝細胞における小胞体 Ca^{2+} ストア量の検討

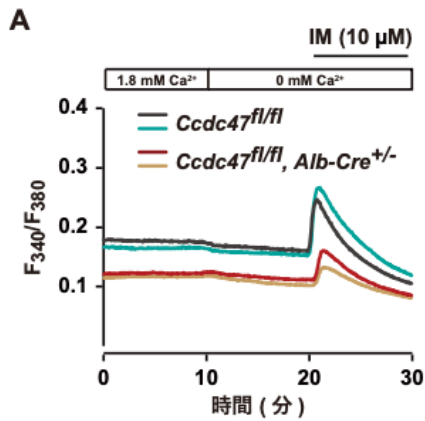
先行研究のマウス胎児線維芽細胞を用いた Ca^{2+} イメージングで、*Ccdc47* 欠損が小胞体 Ca^{2+} ストア量を減少させることが示されている [30]。Bip や GRP94 などの分子シャペロンは Ca^{2+} 依存的にシャペロン活性を示す [41,42]。小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少は、これら分子シャペロンの活性低下を引き起こし、小胞体ストレスに対する抵抗性を低下させることが報告されている [7-9]。そこで、肝細胞においても、*Ccdc47* 欠損により小胞体 Ca^{2+} ストア量が減少し、 Ca^{2+} 依存性分子シャペロンの活性低下が引き起こされることで、ツニカマイシン誘導性小胞体ストレスへの抵抗性が低下していることが考えられた。この仮説を検証するため、初代培養肝細胞を用いた Ca^{2+} イメージングを行い、肝細胞の小胞体 Ca^{2+} ストア量を検討した。

1.8 mM Ca^{2+} 溶液灌流中において、*Ccdc47* 欠損肝細胞の静止状態細胞内 Ca^{2+} 濃度は、Control 肝細胞と比較して有意に低かった (Fig. 5A)。次に、 Ca^{2+} -free 溶液灌流中に Ca^{2+} イオノフォア、イオノマイシンで細胞を刺激したところ、*Ccdc47* 欠損肝細胞の Ca^{2+} トランジェントが Control 肝細胞の 40%程度に減弱しており、*Ccdc47* 欠損により細胞内 Ca^{2+} ストア量が減少する可能性が示唆された (Fig. 5A)。 Ca^{2+} トランジェントを検出した後、1.8 mM Ca^{2+} 溶液を灌流することでストア作動性 Ca^{2+} 流入を検討したところ、Control 肝細胞と *Ccdc47* 欠損肝細胞で顕著な差は認められなかった (Fig. 5B)。

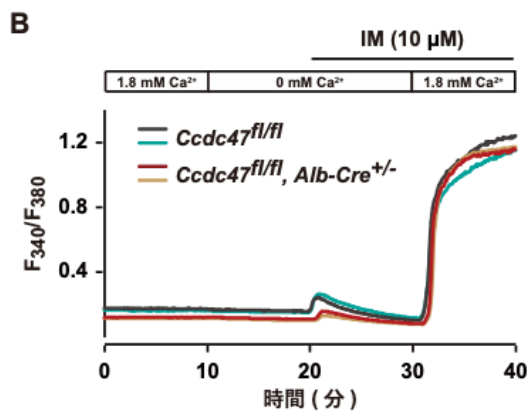
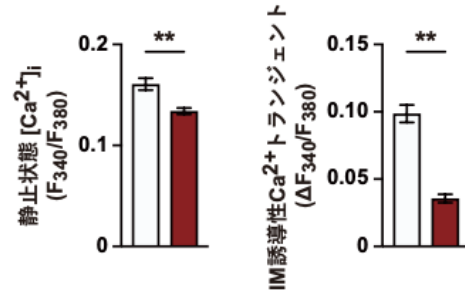
次に、イオノマイシン刺激による Ca^{2+} トランジェントの減弱が、小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少に起因するか明らかにするために、小胞体 Ca^{2+} ポンプ SRECA 阻害薬タプシガルギンによる小胞体からの Ca^{2+} 流出を検討した。イオノマイシンと同様に、*Ccdc47* 欠損肝細胞における Ca^{2+} -free 溶液灌流中の Ca^{2+} トランジェントが Control 肝細胞の 40%程度に減弱していた (Fig. 5C)。この結果から、*Ccdc47*

欠損により肝細胞の小胞体 Ca^{2+} ストア量が減少することが示唆された。

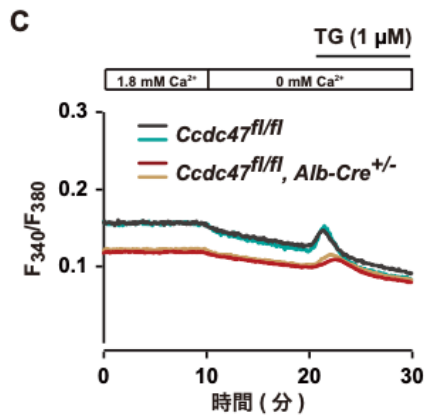
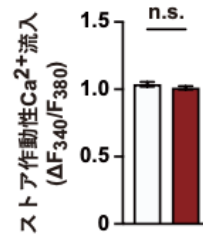
Ccdc47 欠損による小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少が、肝細胞の生理的な Ca^{2+} シグナリングに与える影響を検討するために、ATP 刺激を行い IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を測定した。*Ccdc47* 欠損肝細胞の Ca^{2+} -free 溶液灌流中の ATP 誘導性 Ca^{2+} トランジェントが Control 肝細胞の 40%程度に減弱していた (Fig. 5D)。したがって、*Ccdc47* 欠損が生理的な Ca^{2+} 応答を抑制し、肝細胞の Ca^{2+} 依存的な生理機能に影響を与える可能性が考えられる。



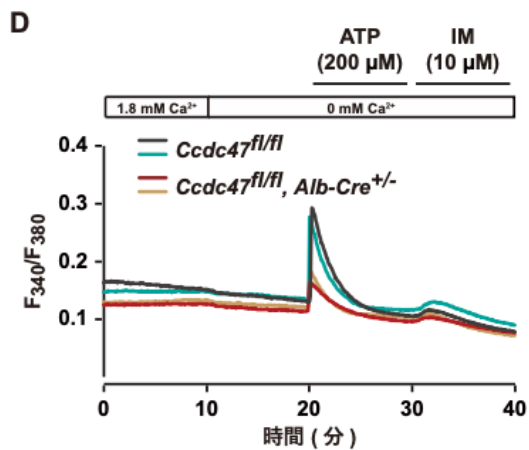
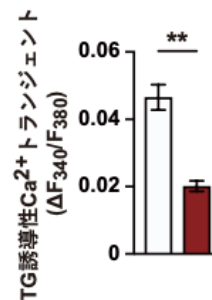
□ *Ccdc47^{fl/fl}* (3 匹, 各 10 細胞)
■ *Ccdc47^{fl/fl}, Alb-Cre^{+/-}* (3 匹, 各 10 細胞)



□ *Ccdc47^{fl/fl}* (3 匹, 各 10 細胞)
■ *Ccdc47^{fl/fl}, Alb-Cre^{+/-}* (3 匹, 各 10 細胞)



□ *Ccdc47^{fl/fl}* (4 匹, 各 10 細胞)
■ *Ccdc47^{fl/fl}, Alb-Cre^{+/-}* (4 匹, 各 10 細胞)



□ *Ccdc47^{fl/fl}* (3 匹, 各 10 細胞)
■ *Ccdc47^{fl/fl}, Alb-Cre^{+/-}* (3 匹, 各 10 細胞)

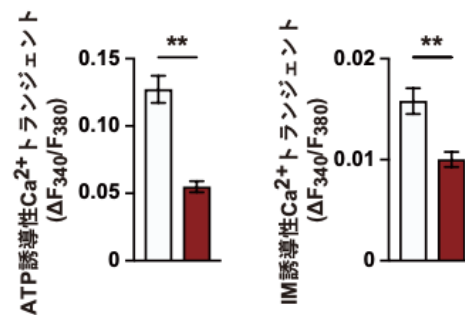


Figure 5 | 初代培養肝細胞における小胞体 Ca^{2+} ストア量の検討

(A) 初代培養肝細胞における静止状態細胞内 Ca^{2+} 濃度とイオノマイシン (IM) 誘導性 Ca^{2+} トランジェント。イオノマイシンは Ca^{2+} の膜透過性を亢進させるため、 Ca^{2+} -free 溶液中で使用すると、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を評価することができる。(B) 初代培養肝細胞におけるストア作動性 Ca^{2+} 流入。(C) 初代培養肝細胞におけるタプシガルギン (TG) 誘導性 Ca^{2+} トランジェント。タプシガルギンは小胞体に Ca^{2+} を取り込む Ca^{2+} ポンプ SERCA を阻害するため、 Ca^{2+} -free 溶液中で使用すると、小胞体膜に発現する Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流出を評価することができる。(D) 初代培養肝細胞における ATP 誘導性 Ca^{2+} トランジェント。それぞれの群の代表的な細胞 2 つのトレースを示した。A-C のデータは全て平均値 \pm SEM で示した。1 細胞 1 サンプルとし、解析したマウス、及び、細胞の数を括弧内に示した。統計的な有意差をアスタリスクマークで示した (** $p < 0.01$, t -test)。

6. *Ccdc47* 欠損による複数回膜貫通型タンパク質発現量への影響

CCDC47 の複数回膜貫通型タンパク質の生合成への関与が報告されていることから [9-11]、*Ccdc47* 欠損による Ca^{2+} ハンドリング異常は、 Ca^{2+} 放出チャンネルや Ca^{2+} ポンプなど Ca^{2+} 制御に関わる複数回膜貫通型タンパク質の発現量低下によって引き起こされている可能性がある。そこで肝細胞に発現する IP₃R1 [43] や SERCA2 [44] のタンパク質発現レベルを Western blotting 法により検討した。Control マウスと *Ccdc47* cKO マウスで有意な差は認められなかった (Fig. 6)。同様に、複数回膜貫通型タンパク質の脂肪酸トランスポーター CD36 [45] や FATP2 [46] のタンパク質発現レベルにも有意な差は認められなかった (Fig. 6)。

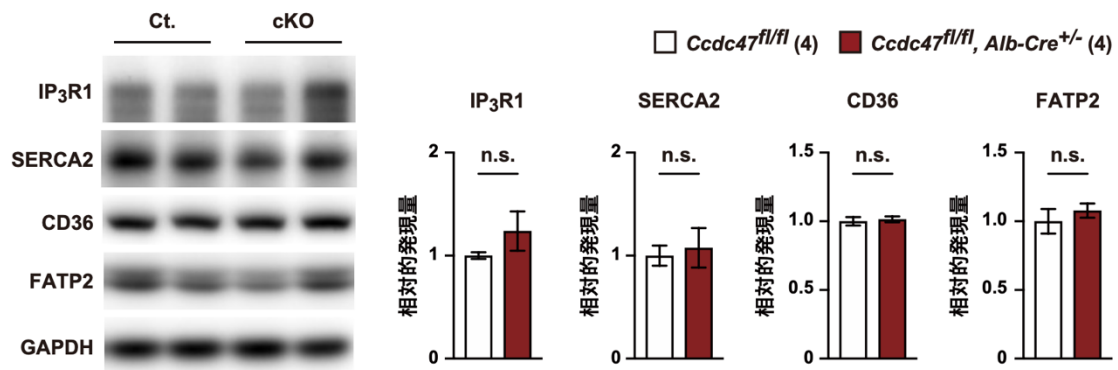


Figure 6 | *Ccdc47* 欠損による複数回膜貫通型タンパク質発現量への影響

12 週齢マウス肝臓における複数回膜貫通型タンパク質の Western blotting 法による検出。IP₃R1 と SERCA2 は小胞体膜に発現し、それぞれ 6 個、11 個の膜貫通ドメインを持つ。CD36 と FATP2 は細胞膜に発現し、それぞれ 2 個、3 個の膜貫通ドメインを持つ。データは全て平均値 ± SEM で示した。解析したマウスの数を括弧内に示した。

考察

本研究では、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスを作出し、胎生致死を回避することで、生体マウス肝臓における CCDC47 の生理機能解析を可能にした (Fig. 1)。CCDC47 変異体保有者が肝機能障害を共通して呈しているのに対して、通常飼育条件における肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスに顕著な異常は認められなかった (Fig. 2)。肝臓は肝実質細胞の他に、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞、中皮細胞など肝非実質細胞と呼ばれる多種の細胞群から構成される [47, 48]。本研究で使用した Alb-Cre マウスは肝実質細胞特異的に Cre recombinase を発現するため、*Ccdc47^{fl/fl}*, *Alb-Cre^{+/-}* マウスは肝実質細胞でのみ *Ccdc47* を欠損していると推測される [49]。CCDC47 が肝臓を構成するどの細胞種に発現しているかは明らかにされておらず、肝実質細胞以外の細胞種において CCDC47 が重要な生理機能を担っている可能性がある。例えば、胆管上皮細胞における胆汁分泌は Ca^{2+} シグナリングにより制御されているため、変異体保有者において CCDC47 欠損による胆汁分泌不全が胆汁鬱滞を引き起こし、肝機能障害の成因となっている可能性が考えられる [50-52]。従って、現状の解析モデルではヒトの病態を模倣できていない可能性があるため、CCDC47 を発現する肝臓の細胞種を同定し、より適切な病態モデルを構築することが重要である。また、ヒトの病態では、複数の臓器や細胞における CCDC47 欠損の影響が複合的に引き起こされていることが考えられるため、肝臓における CCDC47 の生理機能を解明するとともに、肝臓以外の臓器における生理機能を合わせて検討する必要がある。

先行研究のマウス胎児線維芽細胞を用いた解析では、*Ccdc47* 欠損による細胞の形態や増殖に異常は認められなかったものの、小胞体ストレス誘導性アポト

ーシスが亢進していたことから [30]、CCDC47 が小胞体ストレス条件下において生理的意義を持つことが考えられた。小胞体ストレス誘導薬ツニカマイシン投与モデルを用いて、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの小胞体ストレスに対する応答を検討したところ、ツニカマイシン投与による肝臓への脂肪蓄積が *Ccdc47* 欠損により亢進していた (Fig. 3)。また、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの肝臓では、ツニカマイシン投与時の CHOP タンパク質レベルが Control マウスと比較して有意に高かった (Fig. 4A)。ツニカマイシン投与時の野生型マウス肝臓において、CHOP は一過性の発現上昇を示し、8~12 時間のピーク以降は発現が減少していく [37]。一方で、ATF6 α 欠損マウスや変異 eIF2 α (S51A) ノックインマウスでは小胞体ストレスへの応答と解消が抑制されるため、CHOP の発現が高いまま維持される [37, 38]。その結果、C/EBP α の転写活性抑制を介した代謝関連遺伝子の調節不全により、肝臓への脂肪蓄積が亢進することが報告されている [37, 38]。したがって、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの肝臓も小胞体ストレスへの抵抗性が低下していることが想定された。肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの肝臓では、ツニカマイシン投与時の分子シャペロン Bip や小胞体ストレスセンサー ATF6 タンパク質レベルが Control マウスと比較して有意に低く (Fig. 4A)、小胞体ストレスへの抵抗性低下に寄与している可能性がある。

マウス胎児線維芽細胞では、*Ccdc47* 欠損により小胞体 Ca²⁺ストア量が減少することが報告されている [30]。本研究で、肝細胞においても *Ccdc47* の欠損が小胞体 Ca²⁺ストア量を減少させることが示された (Fig. 5A, C)。この結果から、CCDC47 が細胞種によらず普遍的に小胞体の Ca²⁺貯蔵に寄与することが考えられる。一方で、*Ccdc47* 欠損による静止状態の細胞内 Ca²⁺濃度の低下や、ストア作動性 Ca²⁺流入の減弱は細胞種によって異なる結果が得られており、CCDC47 の分子機能との関連を明らかにするためには更なる検討が必要である。

小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少は、 Ca^{2+} 依存性分子シャペロンの活性低下を引き起こし、小胞体ストレスへの抵抗性を低下させる [7-9]。*Ccdc47* 欠損による小胞体ストレスへの抵抗性の低下がマウス胎児線維芽細胞とマウス肝臓において共通して認められたことから、CCDC47 が小胞体 Ca^{2+} ストア量維持機能を介して、正常な小胞体ストレス応答に寄与していることが想定される。

肝細胞の糖代謝や胆汁分泌などの細胞生理機能は、 Ca^{2+} オシレーション (細胞質 Ca^{2+} 濃度の周期的な変動現象) により制御されている [31]。 Ca^{2+} オシレーションは IP_3 受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出と、SERCA を介した小胞体への Ca^{2+} 再取り込みにより形成される [53-55]。初代培養肝細胞を用いた Ca^{2+} イメージングにおいて、ATP 誘導性 Ca^{2+} トランジェントの減弱が認められたことから (Fig. 5D)、*Ccdc47* 欠損が肝細胞 Ca^{2+} オシレーションの減弱を引き起こし、下流の生理的応答を抑制する可能性が考えられる。今後、糖代謝や胆汁分泌など Ca^{2+} 依存的な細胞生理機能に注目して解析を行うことで、CCDC47 の生理機能の解明に繋がることが期待される。

本研究では、*Ccdc47* 欠損による小胞体 Ca^{2+} ストア量の減少や Ca^{2+} トランジェントの減弱に、CCDC47 の膜内シャペロン機能が関連しているか検討するために、肝細胞の小胞体膜に発現する複数回膜貫通型タンパク質 $\text{IP}_3\text{R1}$ と SERCA2 のタンパク質発現量を Western blotting 法により検討した。どちらのタンパク質も Control マウス肝臓と肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの肝臓で発現量に差は認められなかった (Fig. 6)。また、肝細胞の細胞膜に発現し脂肪酸トランスポーターとして機能する複数回膜貫通型タンパク質 CD36 と FATP2 も同様に差は認められず (Fig. 6)、*Ccdc47* 欠損があらゆる複数回膜貫通型タンパク質の発現量を普遍的に減少させるわけではないことが示された。*Ccdc47* 欠損により、複数回膜貫通型タンパク質発現量は変化しないものの、フォールディングの異常により分子

的機能が低下している可能性がある。しかしながら、肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスが通常飼育条件下で顕著な異常を呈さないことや (Fig. 2)、初代培養肝細胞において複数回膜貫通型タンパク質の *Orai* チャンネルを介したストア作動性 Ca^{2+} 流入が *Ccdc47* 欠損の影響を受けていないことから (Fig. 5B)、*Ccdc47* 欠損により複数回膜貫通型タンパク質の機能が普遍的に低下しているとは考えがたい。したがって、小胞体 Ca^{2+} ストア量維持機能の方がより生理的に重要であると考えられる。

本研究では、薬理的な小胞体ストレス負荷モデルを用いて、肝臓における *CCDC47* の生理的意義を検討し、*CCDC47* が正常な小胞体ストレス応答やストレス状態の解消に必要であることを明らかにした。今後は、生体内で生理的に誘導される小胞体ストレスにおいて *CCDC47* の重要性を検討していくことが求められる。

実験方法

肝臓特異的 *Ccdc47* 欠損マウスの作出と Genotyping PCR

Ccdc47 の第 1 エクソンを挟むように *loxP* を挿入した *Ccdc47* Floxed マウスと、*Albumin* エンハンサー/プロモーター制御下で Cre recombinase を発現する Albumin-Cre (Alb-Cre) マウスを交配し、*Ccdc47^{fl/fl}*, *Alb-Cre^{+/-}* マウスを得た。アルカリ熱抽出法により組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法で欠損部分を含む DNA 断片を増幅した。Floxed アレル、欠損アレルに由来する PCR 産物はそれぞれ 849 bp、380 bp である。Genotyping PCR に用いた Primer を Table 1 に示した。

動物実験

本研究の動物実験は、動物実験委員会の了承を得た上で、京都大学動物実験規則に従って遂行した。Control 群には *Ccdc47^{fl/fl}* マウスを用いた。欠損確認と生育観察、複数回膜貫通型タンパク質の発現量解析には 12 週齢の雄マウスを、ツニカマイシン投与実験には 8 週齢の雄マウスを生化学的解析に供した。自由摂食時、及び、絶食時血糖値は、尾静脈から血液を採取し、血中グルコース濃度測定装置 (ForeCare) を用いて測定した。採取した肝臓は、タンパク質、RNA、トリグリセリドの抽出、パラフィン、凍結切片の作製に供した。

Real-time PCR

ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて、肝臓から全 RNA を抽出した。ReverTra ACE qPCR-RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて、全 RNA を逆転写し、cDNA を合成した。FastStart Essential DNA Green Master (Roche) を用いて Real-time PCR 反応溶液を作製し、LightCycler 480 System II (Roche) で解析を行っ

た。18s を内在性コントロールとして標準化を行った。Real-time PCR に用いた Primer を Table2 に示した。

Western blotting

肝臓に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mg/l Pepstatin, 1 mg/l Antipain, 0.1 mM PMSF, 2 μM Leupeptin, pH 8.0) を 20 μl/mg Liver の割合で加えて、ホモジナイザーで組織を破碎した。超音波処理によりゲノム DNA を剪断した後、4°C、15,000 × g で 15 分間遠心分離して上清を回収した。上清に等量の 2 × SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, pH 6.8) を加えて 100°C で 5 分間煮沸した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、PVDF 膜 (Merck Millipore) に転写した。種々のタンパク質を以下の一次抗体を用いて認識させた。CCDC47 (ウサギに免疫して作製, aa 86-117, 1:2,000)、Calnexin (Santa Cruz, sc-11397, 1:1,000)、p-PERK (CST, 3179, 1:1,000)、PERK (CST, 3192, 1:1,000)、p-eIF2α (CST, 9721, 1:1,000)、eIF2α (Santa Cruz, sc-11386, 1:1,000)、CHOP (CST, 5554, 1:1,000)、Bip (BD biosciences, 610979, 1:5,000)、ATF6 (proteintech, 24169-1-AP, 1:1,000)、p-IRE1α (Novus biologicals, NB100-2323, 1:1,000)、IRE1α (Novus biologicals, NB100-2324, 1:1,000)、IP₃R1 (Santa Cruz, sc-271197, 1:1,000)、SERCA2 (Santa Cruz, sc-8095, 1:1,000)、CD36 (proteintech, 18836-1-AP, 1:1,000)、FATP2 (proteintech, 14048-1-AP, 1:1,000)、GAPDH (Sigma, G9545, 1:5,000)。HRP 標識二次抗体と ECL Western blotting reagents (GE Healthcare) を用いてブロットを検出した。

肝臓組織像の観察

10%中性緩衝ホルマリンで固定した肝臓を、脱水、脱アルコール、パラフィン浸透処理してパラフィンブロックを作製した。マイクロトームで厚さ 6 μm の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。BZ-X710 (KEYENCE) を用いて組織学的観察を行った。脂肪滴を検出するために、固定した肝臓を SCEM (SECTION LAB) で凍結包埋し、クライオスタットで厚さ 10 μm の切片を作製して、Oil-Red-O 染色を行った。

ツニカマイシン腹腔内投与実験

ツニカマイシン (富士フイルム和光純薬) は DMSO を用いて 5 mg/ml に調製し、 -20°C で保存した。150 mM スクロースを用いて 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した溶液を、マウス腹腔内に体重 1 g あたり 20 μl 投与した。投与 24 時間後に肝臓を採取した。

肝臓トリグリセリド定量

肝臓 50 mg に 0.1 M KCl を 1 ml 加えてホモジナイズした。3.75 ml のメタノール : クロロホルム (2 : 1, v/v) を加えてボルテックスした後、室温で 10 分間静置した。1.25 ml のクロロホルムを加えてボルテックスした後、さらに 1.25 ml の蒸留水を加えてボルテックスした。1,500 $\times g$ で 10 分間遠心分離して、下層の有機層を回収した。ドラフト内で乾燥した後、残った脂質を 10% Triton X-100 in Isopropanol に溶解し、ラボアッセイ™ トリグリセライド (Fujifilm) を用いてトリグリセリド濃度を測定した。

初代培養肝細胞単離培養

マウスをイソフルラン麻酔下で開腹し、Hank's 平衡塩溶液 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free) を下大静脈から門脈方向に灌流して肝臓から血液を除いた。その後、1 mg/ml

Collagenase type IV (Worthington) 含有 Hank's 平衡塩溶液を 35 ml 程度灌流し、肝臓を消化した。マウスから肝臓を採取し、氷冷した Hank's 平衡塩溶液に移した。クリーンベンチ内でピンセットとセルスクレーパーを用いて肝臓から肝細胞を分離し、セルストレーナー (メッシュサイズ, 100 μm) で細胞懸濁液を濾過して細胞凝集塊や夾雑物を取り除いた。Percoll (Cytiva) を用いた遠心分離により生細胞を分離した。マトリゲル (Corning) で薄層コーティングしたガラスボトムディッシュに肝細胞を播種し、CO₂ インキュベーターで 3 時間培養した。

初代培養肝細胞 Ca²⁺イメージング

3 時間培養した肝細胞を 4 μM Fura 2-AM (Dojindo) 含有ウィリアム培地 (Gibco) で 1 時間インキュベートした。Ca²⁺イメージングでは、340 nm と 380 nm の励起光を照射し、>510 nm の蛍光を顕微鏡 (DMI4000B, Leica) に取り付けた CMOS カメラ (Molecular Devices) で検出した。Leica Application Suite X を用いて記録トレースから Fura 2 蛍光強度比 (F₃₄₀/F₃₈₀) を取得し、統計解析を行った。細胞外液には 1.8 mM Ca²⁺溶液 (20 mM HEPES, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 0.96 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 1g/l glucose, pH 7.4) を用いた。Ca²⁺-free 溶液は、1.8 mM Ca²⁺溶液から CaCl₂ を除き、4 mM EGTA を加えたものを調製した。

Table 1 | Genotyping PCR に使用した Primer

<i>Ccdc47</i>	For	GACATCGCGGCCCGCAGATTATC	<i>Cre</i>	For	CCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGC
	Rev	GCCACACGCGTCACCTTAATATGCG		Rev	AGCGCCGTAATCAATCGATGAGTTGCTTC
			Internal Control	For	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
				Rev	GTAGGTGGAAATCTAGCATCATCC

Table 2 | Real-time PCR に使用した Primer

<i>Ccdc47</i>	For	ACGGCTGAAGCTACGTGAAG	<i>Ppargc1a</i>	For	CCCTGCCATTGTTAAGACC
	Rev	TGCACCCGAGGCTGCAAC		Rev	TGCTGCTGTCTCTGTTTTTC
18s	For	CTCAACACGGGAAACCTCAC	<i>Srebf1</i>	For	CCTATGCTGGGGTGAGACA
	Rev	AGACAAATCGCTCCACCAAC		Rev	GGACACGGACGGGTACATCT
<i>Cebpa</i>	For	GAACAGCAACGAGTACCGGGTA	<i>Ppara</i>	For	ACTGTCCTGGTGCCATCCTC
	Rev	GCCATGGCCTTGACCAAGGAG		Rev	GCCCTGTATCCACAACAAGCTG
<i>Cebpb</i>	For	GCAAGAGCCCGACAAG			
	Rev	GGCTCGGGCAGCTGCTT			

参考文献

1. M J Berridge, P Lipp, M D Bootman. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2000) 1, 11-21.
2. M J Berridge, M D Bootman, H L Roderick. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2003) 4, 517-529.
3. R Bagur, G Hajnoczky. Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell.* (2017) 66, 780-788.
4. M J Berridge. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev.* (2016) 96, 1261-1296.
5. G Santulli, D Lewis, A des Georges, A R Marks, J Frank. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem.* (2018) 87, 329-352.
6. J Groenendyk, L B Agellon, M Michalak. Calcium signaling and endoplasmic reticulum stress. *Int Rev Cell Mol Biol.* (2021) 363, 1-20.
7. J Krebs, L Agellon, M Michalak. Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* (2015) 460, 114-121.
8. M Michalak, J M R Parker, M Opas. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* (2002) 32, 269-278.
9. H Coe, M Michalak. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys.* (2009) 28, F96-F103.
10. K Nakamura, A Zuppini, S Arnaudeau, J Lynch, I Ahsan, R Krause, S Papp, H De Smedt, J B Parys, W Muller-Esterl, D P Lew, K H Krause, N Demaurex, M Opas, M Michalak. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol.* (2001) 154,

961-972.

11. J P Lièvremon, R Rizzuto, L Hendershot, J Meldolesi. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} . *J Biol Chem.* (1997) 272, 30873-30879.
12. J H. Lin, P Walter, T.S. B Yen. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* (2013) 3, 399-425.
13. D Mekahli, G Bultynck, J B. Parys, H De Smedt, L Missiaen. Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2011) 3, a004317.
14. S J Marciniak, J E Chambers, D Ron. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov.* (2022) 21, 115-140.
15. Y Yang, F Ma, Z Liu, Q Su, YLiu, Z Liu, Y Li. The ER-localized Ca^{2+} -binding protein calreticulin couples ER stress to autophagy by associating with microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3. *J Biol Chem.* (2019) 294, 772-782.
16. N Mesaeli, K Nakamura, E Zvaritch, P Dickie, E Dziak, K H Krause, M Opas, D H MacLennan, M Michalak. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* (1999) 144, 857-868.
17. S Fu, L Yang, P Li, O Hofmann, L Dicker, W Hide, X Lin, S M Watkins, A R Ivanov, G S Hotamisligil. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* (2011) 473, 528-531.
18. S W Park, Y Zhou, J Lee, J Lee, U Ozcan. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2010) 107, 19320-19325.

19. C-C Chen, L-W Hsu, K-D Chen, K-W Chiu, C-L Chen, K-T Huang. Emerging Roles of Calcium Signaling in the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* (2021) 23, 256.
20. C N Feriod, A G Oliveira, M T Guerra, L Nguyen, K M Richards, M J Jurczak, H-B Ruan, J P Camporez, X Yan, G I Shulma, A M Bennett, M H Nathanson, B E Ehrlich. Hepatic Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptor Type 1 Mediates Fatty Liver. *Hepatol Commun.* (2017) 1, 23-35.
21. N Weisleder, H Takeshima, J Ma. Immuno-proteomic approach to excitation–contraction coupling in skeletal and cardiac muscle: Molecular insights revealed by the mitsugumins. *Cell Calcium.* (2008) 43, 1-8.
22. H Takeshima, S Komazaki, M Nishi, M Iino, K Kangawa. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell.* (2000) 6, 11-22.
23. K Ito, S Komazaki, K Sasamoto, M Yoshida, M Nishi, K Kitamura, H Takeshima. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol.* (2001) 154, 1059-1067.
24. S Moriguchi, M Nishi, S Komazaki, H Sakagami, T Miyazaki, H Masumiya, S Saito, M Watanabe, H Kondo, H Yawo, K Fukunaga, H Takeshima. Functional uncoupling between Ca²⁺ release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103, 10811-10816.
25. S Kakizawa, Y Kishimoto, K Hashimoto, T Miyazaki, K Furutani, H Shimizu, M Fukaya, M Nishi, H Sakagami, A Ikeda, H Kondo, M Kano, M Watanabe, M Iino, H Takeshima. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* (2007) 26, 1924-1933.
26. M Yazawa, C Ferrante, J Feng, K Mio, T Ogura, M Zhang, P-H Lin, Z Pan, S

- Komazaki, K Kato, M Nishi, X Zhao, N Weisleder, C Sato, J Ma, H Takeshima. TRIC channels are essential for Ca²⁺ handling in intracellular stores. *Nature*. (2007) 448, 78-82.
27. D Yamazaki, Y Tabara, S Kita, H Hanada, S Komazaki, D Naitou, A Mishima, M Nishi, H Yamamura, S Yamamoto, S Kakizawa, H Miyachi, S Yamamoto, T Miyata, Y Kawano, K Kamide, T Ogihara, A Hata, S Umemura, M Soma, N Takahashi, Y Imaizumi, T Miki, T Iwamoto, H Takeshima. TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. *Cell Metab*. (2011) 14, 231-241.
28. D Yamazaki, S Komazaki, H Nakanishi, A Mishima, M Nishi, M Yazawa, T Yamazaki, R Taguchi, H Takeshima. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development*. (2009) 136, 2355-2361.
29. C Zhao, A Ichimura, N Qian, T Iida, D Yamazaki, N Noma, M Asagiri, K Yamamoto, S Komazaki, C Sato, F Aoyama, A Sawaguchi, S Kakizawa, M Nishi, H Takeshima. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci Signal*. (2016) 9, ra49.
30. M Zhang, T Yamazaki, M Yazawa, S Treves, M Nishi, M Murai, E Shibata, F Zorzato, H Takeshima. Calumin, a novel Ca²⁺-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. (2007) 42, 83-90.
31. P J. Chitwood, R S. Hedge. An intramembrane chaperone complex facilitates membrane protein biogenesis. *Nature*. (2020) 584, 630-634.
32. A Sundaram, M Yamsek, Frank Zhong, Y Hooda, R S. Hedge, R J. Keenan. Substrate-driven assembly of a translocon for multipass membrane proteins. *Nature*. (2022) 611, 167-172.

33. L Smalinskaite, M K. Kim, A J. O. Lewis, R J. Keenan, R S. Hedge. Mechanism of an intramembrane chaperone for multipass membrane proteins. *Nature*. (2022) 611, 161-166.
34. L Smalinskaite, R S. Hedge. The Biogenesis of Multipass Membrane Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. (2023) 15.
35. S Yamamoto, T Yamazaki, S Komazaki, T Yamashita, M Osaki, M Matsubayashi, H Kidoya, N Takakura, D Yamazaki, S Kakizawa. Contribution of calumin to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. *Dev Biol*. (2014) 393, 33-43.
36. M Morimoto, H W Evans, Z Ammous, X Song, K A. Strauss, D Pehlivan, C G Jauregui, E G. Puffenberger, C R. Holst, E Karaca, K W. Brigatti, E Maguire, Z H. C Akdemir, A Amagata, C. C Lau, X C Lotrea, E Macnamara, T Tos, S Isikay, M Nehrebecky, J D. Overton, M Klein, T C. Markello, J E. Posey, D R. Adams, E L Evans, J R. Lupski, W A. Gahl, M C V. Malicdan. Bi-allelic CCDC47 Variants Cause a Disorder Characterized by Woolly Hair, Liver Dysfunction, Dysmorphic Features, and Global Developmental Delay. *Am J Hum Genet*. (2018) 103, 794-807.
37. D T Rutkowski, J Wu, S-H Back, M U Callaghan, S P Ferris, J Iqbal, R Clark, H Miao, J R Hassler, J Fornek, M G Katze, M M Hussain, B Song, J Swathirajan, J Wang, G D-Y Yau, R J Kaufman. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev cell*. (2008) 15, 829-840.
38. K Yamamoto, K Takahara, S Oyadomari, T Okada, T Sato, A Harada, K Mori. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. (2010)

- 21, 2975-2986.
39. B Feng, X Huang, D Jiang, L Hua, Y Zhuo, D Wu. Endoplasmic Reticulum Stress Inducer Tunicamycin Alters Hepatic Energy Homeostasis in Mice. *Int J Mol Sci.* (2017) 18, 1710.
 40. M R Chikka, D D McCabe, H M Tyra, D T Rutkowski. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to suppression of metabolic genes during endoplasmic reticulum stress in the liver. *J Biol Chem.* (2013) 288, 4405-4415.
 41. J P Lièvremon, R Rizzuto, L Hendershot, J Meldolesi. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} . *J Biol Chem.* (1997) 272, 30873-30879.
 42. C Biswas, O Ostrovsky, C A Makarewich, S Wanderling, T Gidalevitz, Y Argon. The peptide-binding activity of GRP94 is regulated by calcium. *Biochem J.* (2007) 405, 233-241.
 43. I Bosanac, T Michikawa, K Mikoshiba, M Ikura. Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta.* (2004) 1742, 89-102.
 44. M Inoue, N Sakuta, S Watanabe, Y Zhang, K Yoshikaie, Y Tanaka, R Ushioda, Y Kato, J Takagi, T Tsukazaki, K Nagata, K Inaba. Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep.* (2019) 27, 1221-1230.
 45. R Yang, Q Liu, M Zhang. The Past and Present Lives of the Intraocular Transmembrane Protein CD36. *Cells.* (2023) 12, 171.
 46. S Khan, P D Cabral, W P Schilling, Z W Schmidt, A N Uddin, A Gingras, S M Madhavan, J L Garvin, J R Schelling. Kidney Proximal Tubule Lipoptosis Is

- Regulated by Fatty Acid Transporter-2 (FATP2). *J Am Soc Nephrol.* (2018) 29, 81-91.
47. R Malik, C Selden, H Hodgson. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol.* The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol.* (2002) 13, 425-431.
48. N Aizarani, A Saviano, Sagar, L Mailly, S Durand, J S Herman, P Pessaux, T F Baumert, D Grün. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature.* (2019) 572, 199-204.
49. C M Weisend, J A Kundert, E S Suvorova, J R Prigge, E E Schmidt. Cre activity in fetal albCre mouse hepatocytes: Utility for developmental studies. *Genesis.* (2009) 47, 789-792.
50. D C Trampert, M H Nathanson. Regulation of bile secretion by calcium signaling in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* (2018) 1865, 1761-1770.
51. K Shibao, K Hirata, M E Robert, M H Nathanson. Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis. *Gastroenterology.* (2003) 125, 1175-1187.
52. J Martin, J F Dufour. Cholestasis shuts down calcium signaling in cholangiocytes. *Hepatology.* (2004) 39, 48-249.
53. I Cloete, P J Bartlett, V Kirk, A P Thomas, J Sneyd. Dual mechanisms of Ca²⁺ oscillations in hepatocytes. *J Theor Biol.* (2020) 503, 110390.
54. T A Rooney, E J Sass, A P Thomas. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J Biol Chem.* (1989) 264, 17131-17141.
55. A P Thomas, D C Renard, T A Rooney. Spatial and temporal organization of calcium

signalling in hepatocytes. *Cell Calcium*. (1991) 12, 111-126.

論文目録

Atypical cell death and insufficient matrix organization in long-bone growth plates from *Tric-b*-knockout mice

Atsuhiko Ichimura, Yuu Miyazaki, Hiroki Nagatomo, Takaaki Kawabe, Nobuhisa Nakajima, Ga Eun Kim, Masato Tomizawa, Naoki Okamoto, Shinji Komazaki, Sho Kakizawa, Miyuki Nishi and Hiroshi Takeshima

Cell Death & Disease (2023) 14, Article number: 848 に掲載

Generation of liver specific *Ccdc47*-deficient mice and their response to tunicamycin-induced ER stress

未発表

謝辞

本研究に際し、熱心なご鞭撻を賜り、素晴らしい研究環境を提供してくださいました京都大学大学院薬学研究科 竹島 浩 教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、直接の御指導とご鞭撻を頂きました京都大学大学院薬学研究科 市村 敦彦 助教に深く感謝いたします。

本研究に当たり、有益な御助言を頂きました国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部 望月 直樹 部長、中嶋 洋行 室長に深く感謝の意を表します。

日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂きました京都大学大学院薬学研究科 柿澤 昌 准教授、竹島 美幸 研究員に心から感謝の意を表します。

さらに、実験のご協力を頂き、研究を通じて議論を交わして頂いた、京都大学大学院薬学研究科 生体分子認識学分野の皆様には深く感謝いたします。

研究生生活を過ごすに当たり、藤多仁生奨学金の給付により経済的支援を下された故藤多哲朗名誉教授、ご遺族並びにご関係者の皆様には深く感謝申し上げます。

本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業 JPMJFS2123 の支援を受けたものです。

最後に、これまで見守って頂いた家族、精神的に支えて頂いた友人たちに深く感謝申し上げます。