

アディポネクチン分泌は HSP47により制御されている

谷岡利裕, 野場悠司, 當間聡子, 大野直美, 戸部 徹, 中野泰子

昭和大学薬学部遺伝解析薬学教室

要 旨

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるタンパク質である。血中のアディポネクチンレベルは厳密にコントロールされていることから、複雑な合成・分泌経路が存在することが考えられている。しかしながら、アディポネクチン分泌に関与する重要なメディエーターについては十分に明らかにされていない。本研究で、我々は小胞体に存在するコラーゲン特異的シャペロンとして知られる HSP47がアディポネクチン構造のコラーゲンドメイン部分と相互作用することによりアディポネクチン分泌を制御していることを見出した。HSP47の過剰発現細胞では、アディポネクチン分泌はコントロール細胞と比較して減少し、一方で、siRNAにより HSP47をノックダウンした細胞ではアディポネクチン分泌が顕著に上昇した。また、脂肪細胞において HSP 阻害剤によりシャペロン活性を阻害した場合に用量依存的にアディポネクチン分泌の上昇効果が認められた。さらに、細胞内においてアディポネクチンと HSP47は結合していること、これが予想通りアディポネクチンのコラーゲン様ドメインを介した結合であることが確認できた。これらの結果は、HSP47がアディポネクチン合成、分泌において重要なメディエーターであり、アディポネクチンとの結合を介して小胞体内に保持することでアディポネクチン分泌を制御している可能性を示唆している。

Key Words : アディポネクチン, HSP47, コラーゲン, 小胞体, 脂肪細胞

緒 言

アディポネクチンは脂肪細胞から産生されるアディポカインの1つで、脂肪酸酸化促進、肝糖新生抑制、インスリン感受性亢進作用を示し、また、TNF- α などの炎症性サイトカインの作用や分泌を抑制することが知られている。さらに、抗動脈硬化作用や中枢系におけるエネルギー消費促進作用を示すとの報告も有ることから、肥満、インスリン耐性、2型糖尿病、動脈硬化治療において重要な分子として位置づけられている^{1) 2) 3)}。アディポネクチンは血中において高分子量多量体 (High molecular weight: HMW, 18ない

し12量体)、6量体 (Hexamer)、3量体 (Trimer) の3種類の分子種として存在している。Scherer のグループは糖尿病患者において、チアゾリジンジオン治療によるインスリン感受性改善効果はアディポネクチンの総量は重要ではなく、アディポネクチン総量に対する HMW 型アディポネクチンの比が重要であると報告している⁴⁾。また、2型糖尿病や冠動脈心疾患群では血中 HMW アディポネクチン濃度が低い^{5) 6)}ことより、HMW 型アディポネクチンがインスリン感受性を有する活性型の分子種であると考えられている。一方、中枢系における作用は主に Hexamer や Trimer が担っているとも報告されている^{7) 8)}。

アディポネクチンは構造的に可溶性コラーゲンスーパーファミリーに属しており、コラーゲンX、VIIIあるいは補体因子C1qと高い相同性を有し⁹⁾、図1に示すようにN末端のシグナルペプチドに続き、種間で配列の相同性が低い可変ドメイン、Gly-X-Yの繰り返し配列から成るコラーゲン様ドメインおよびそのC末端側に球状ドメインを有している。

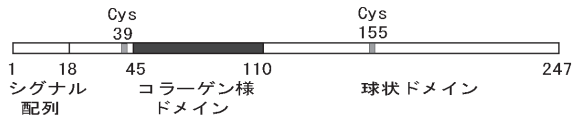


図1. アディポネクチンの1次構造

Trimer形成は、3本の球状ドメイン同士の相互作用ではじまり、次いでコラーゲン様ドメインが会合して3本鎖らせん構造の形成がおこり、Cys39（あるいはCys22；N末端のシグナルペプチドが除かれた場合）がジスルフィド結合することによりさらに安定化する。Hexamerの形成はTrimer内に残った1個のフリーのCys39同士がジスルフィド結合することで形成され、このHexamerが更に集まってブーケ構造と呼ばれるHMW型アディポネクチンとなる¹⁰⁾。また、細胞内におけるHMWアディポネクチンの会合および安定化にはコラーゲン様ドメインに存在するリジン残基の水酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾が必須であることが示されている^{11) 12) 13)}。一方、分泌機構に関してはSchererのグループがアディポネクチン分泌は小胞体(ER)シャペロンであるERp44(ER protein of 44 kDa)とEro1-L α (ER oxidoreductase 1-L α)によりコントロールされていることを報告している¹⁴⁾。すなわち、ERp44はアディポネクチンTriemrのフリーのCys39と共有結合して小胞体への貯留を促進して分泌を阻害し、これに対してEro1-L α はERp44に結合してアディポネクチンの貯留に競合的に作用し、また、HexamerやHMW形成を促進し、細胞外分泌を促進する。しかしながら、アディポネクチン分泌の制御については十分に明らかにされておらず、さらなる研究が必要である。

リボソーム上で翻訳されたプロコラーゲン分子の会合はER内腔で起こることが知られている¹⁵⁾。プロコラーゲン鎖は特徴的な構造としてGly-X-Yと

いう繰り返し配列以外にN末とC末にN末プロペプチド、C末プロペプチドを有しており、プロコラーゲンがC末端まで翻訳されると、3本のプロコラーゲンのC末プロペプチド領域が会合する¹⁶⁾。その後、C末端からN末端の方向に3本鎖らせん構造が形成され、ゴルジ体への輸送、糖鎖修飾などを経て細胞外に分泌される¹⁷⁾。現在、これら一連の過程に関与する分子の一つとしてERに局在する糖タンパク質Heat shock protein 47(HSP47)が報告されている¹⁸⁾。永田らのグループはHSP47のC末端にER保持シグナルとして知られるKDEL配列に類似したRDEL(Arg-Asp-Glu-Leu)が存在し、実際にこの配列がER保持機能を有していることを明らかにしている¹⁹⁾。また、HSP47は1本鎖の新生プロコラーゲンペプチド¹⁸⁾や成熟した3本鎖プロコラーゲンに結合することも明らかになっている^{20) 21) 22)}。このようにHSP47はコラーゲンに特異的に結合することからコラーゲン特異的シャペロンと考えられている。

アディポネクチンは既述したようにコラーゲン様ドメインを有しており、本研究では、HSP47がアディポネクチンのコラーゲン様ドメインに結合してアディポネクチン分泌を制御する可能性について検討をおこなった。

方 法

試 薬

HSP47抗体はStressGen Bioreagentsから購入し、HSP47誘導コラーゲンシャペロン活性を特異的に阻害するHSP47 inhibitorはCalbiochemから購入した。

細胞培養

マウス線維芽細胞3T3-L1細胞は10% calf serumを含むDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培地を用い、37°C、5%CO₂存在下で培養した。脂肪細胞分化には報告されている方法を用いた²³⁾。細胞をコンフルエントになるまで培養し、さらに2日培養後、0.5mM isobutylmethylxanthine、0.25 μ M dexamethasone、1 μ g/mL insulin、10% fetal calf serumを含むDMEM培地に変え2日間培養した。さらに、1 μ g/mL insulinを含む10% fetal calf serumを含むDMEM培地で2日間培養し、その後、2日毎に新たな10% fetal calf

serum を含む DMEM 培地に変え培養することにより脂肪細胞に分化させた. 本研究では分化誘導後8日目の細胞を分化脂肪細胞として使用した. また, 脂肪細胞からの分泌を評価する際には, 0.5% fetal calf serum を含む DMEM 培地を使用した. ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞は10% fetal calf serum を含む RPMI1640培地を用い, 37°C, 5%CO₂存在下で培養した.

ウエスタンブロット法

細胞 (1 x 10⁵ cells) は100mM Tris-HCl, pH8.0, 66mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 μg/mL leupeptin, 10 μg/mL aprotinin, 1% NP-40, 0.4% sodium deoxycholate 溶液100 μL に溶解し, BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いてタンパク濃度を定量した. サンプルは12%SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後に, ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) にタンパク質を転写した. メンブレンは5%スキムミルクを含む10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween20 溶液 (TTBS) にて1時間ブロッキングした. その後, アディポネクチンのC末端20アミノ酸に対するウサギ抗血清 (anti-C) を室温で2時間反応させた. メンブレンは TTBS で5分間5回洗浄後, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories)を1/20,000の希釈にて室温で2時間反応させた. TTBS で5分間5回洗浄後, ECL Plus Western blotting Detection system (Amersham Biosciences) を用いて化学発光を行い, X線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM 50NIF RX-U) を感光させ, 可視化した.

発現プラスミドの構築およびトランスフェクション

アディポネクチン発現プラスミドは PCR により全長をコードする遺伝子を増幅後, BamHI と EcoRI の制限酵素を用いて, pZeoSV2(+)-vector (Invitrogen) に挿入した. PCR に使用したプライマー (5'-3') は以下に示した.

センス鎖: 5'-CGGGATCCATGCTGTTGCTGGGAGC TGT-3', アンチセンス鎖: 5'-CGGAATTCTCAGTT GGTGTCATGGTAGA-3'. HSP47発現プラスミドは PCR により全長をコードする遺伝子を増幅後,

BamHI と NotI の制限酵素を用いて, pcDNA3 (Invitrogen) に挿入した. PCR に使用したプライマーは以下に示した.

センス鎖: 5'-CGGGATCCATGCGCTCTCTCCT TC-3', アンチセンス鎖: 5'-ATAAGAATGCGGCCG CCTACAACCTCATCTCG-3'.

また, siRNA 発現プラスミドの作製は合成オリゴを使うことにより構築した. 以下に合成オリゴの配列を示した.

センス鎖: 5'-GGATCCCGTATCTCGCACCAGGAA GATGATTGATATCCGTCATCTTCCTGGTGCGAGA TATTTTTTCCAAAAGCTT-3',

アンチセンス鎖: 5'-AAGCTTTTGGAAAAATATCT CGCACCAGGAAGATGACGGATATCAATCATCTTC CTGGTGCGAGATACGGGATCC-3'.

これらを BamHI と HindIII を用いて, pRNA-U6.1 (GeneScript) に挿入した. これらのプラスミドは Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いて細胞に遺伝子導入した. トランスフェクションには脂肪細胞への分化誘導後4日目の細胞を用い, また, HEK293細胞は培養2日後の細胞を用いた.

免疫沈降法による相互作用の検出

細胞 (5 x 10⁵ cells) は20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% Tween 20 溶液100 μL に溶解した. 細胞溶解液は15 μL のプロテインアガロース A (PIERCE) と1時間プレインキュベーションすることにより非特異的結合を除いた. その上清を15 μL のプロテインアガロース A と2 μg の normal mouse IgG あるいは anti-HSP47抗体と一晚4°C でインキュベーションした. 1,000xg で5分間遠心した後, 沈殿を TBS(10mM Tris-Hcl(pH7.4), 150mM NaCl) で洗浄し, 25 μL の SDS-PAGE 用 sample buffer に溶解した. 結合タンパク質は SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより検出した.

細胞内相互作用の検出

アディポネクチンと HSP47の細胞内における結合には CheckMate™ Mammalian Two-hybrid System (Promega) を使用した. アディポネクチンの全長およびコラーゲンドメイン領域は PCR により遺伝子

を増幅し、これらを BamHI と KpnI を用いてそれぞれ pBIND vector に挿入した。PCR に使用したプライマーは以下に示した。

センス鎖：5'-CGGGATCCATGCTACTGTTGCAA G-3'，アンチセンス鎖：5'-GGGGTACCTCAGTTGG TATCATGG-3'およびセンス鎖：5'-CGGGATCCGG CATCCCAGGACAT-3'，アンチセンス鎖：5'-GGGG TACCGGCTTCTCCAGGCTCTCC-3'。

また、PCR にて増幅した全長 HSP47は、BamHI と KpnI を用いて pACT vector に挿入した。PCR に使用したプライマーは以下に示した。

センス鎖：5'-CGGGATCCATGCGCTCTCTCC TTC -3'，アンチセンス鎖：5'-GGGGTACCCTACA ACT CATCTC GC-3'。

トランスフェクションは24 well plate に HEK 細胞を培養し、上記プラスミドと pG5 Luc vector を各 0.5 μ g 加え、Lipofectamin 2000を用いて導入した。トランスフェクション2日後にファイヤーフライルシフェラーゼ活性を測定し、また、トランスフェクション効率をレニーラルシフェラーゼ活性を測定することにより補正した。

結 果

HSP47はアディポネクチン分泌発現に影響を及ぼす。

HSP47がアディポネクチン分泌に影響を及ぼすかどうかを検討する目的で、HEK293細胞にアディポネクチンと HSP47を一過的に過剰発現させた細胞を用いて培養上清中に分泌されるアディポネクチン量を評価した。過剰発現細胞における HSP47の発現量はコントロール細胞と比べておよそ2倍に上昇した。この HSP47過剰発現細胞のアディポネクチン分泌量は、アディポネクチンを単独発現させた細胞と比較して、約50%のアディポネクチン分泌の減少が認められた(図2A)。次に、HSP47のノックダウン細胞を用いて同様に解析した。その結果、siRNA を導入した細胞では HSP47の発現がコントロールと比較して60%減少した。一方で、HSP47ノックダウン細胞における培養上清中に分泌されるアディポネクチン量は2.8倍と顕著に上昇していることが明らかになった(図2B)。

HSP47は脂肪細胞に発現し、アディポネクチン分泌を制御する。

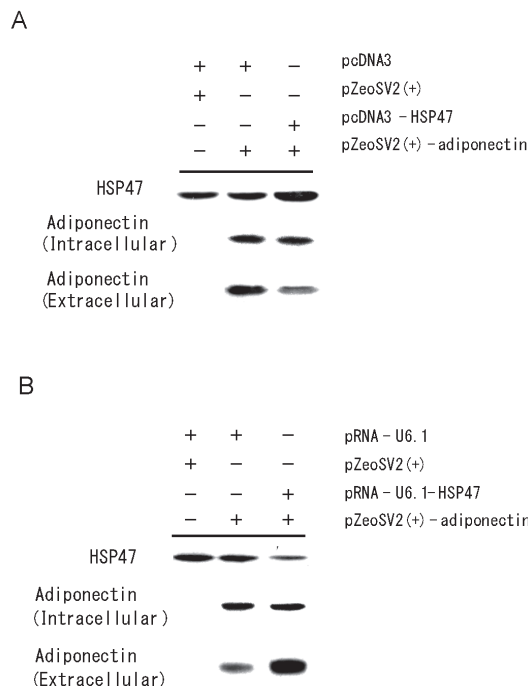


図2. HEK293細胞での HSP47過剰発現はアディポネクチン分泌を抑制し、HSP47ノックダウンは増強する。(A)HSP47 過剰発現には pZeoSV2-adiponectin と pcDNA3-HSP47 を、(B)HSP47 ノックダウンには pZeoSV2-adiponectin/pRNA-U6.1-HSP47 を、それぞれ HEK293細胞に導入し、2日目に培地を交換後、さらに24時間培養した。細胞ライゼート10 μ g および培養上清1mL 中の20 μ L をそれぞれ SDS-PAGE で分離し、HSP47およびアディポネクチン量をウエスタンブロットにて解析した。

まず、3T3-L1由来脂肪細胞で HSP47が発現しているかウエスタンブロット法により確認した。その結果、脂肪細胞への分化誘導後8日目の細胞に HSP47の発現が認められた(図3A)。そこで、HSP47がアディポネクチン分泌に関与するか否かについて HSP47阻害剤を用いて検討したところ、コントロールと比較して5 μ M の HSP47阻害剤処理によりアディポネクチン分泌は約1.8倍上昇し、さらに10 μ M の HSP47阻害剤処理において、約2.4倍の上昇が認められ用量依存的効果が認められた(図3B, C)。

次に、分化誘導後4日目の細胞を用いて HSP47の発現を siRNA 法にてノックダウンし、アディポネクチン分泌に及ぼす効果を検討した。その結果、HSP47siRNA を導入した脂肪細胞の HSP47発現量はコントロール siRNA と比較して約40%減少した。この時、細胞内のアディポネクチン発現量に変化は認

められなかったが、培養上清中に分泌されるアディポネクチンは約1.8倍上昇した(図4A, B)。これらの結果により、脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌制御におけるHSP47の重要性が示唆された。

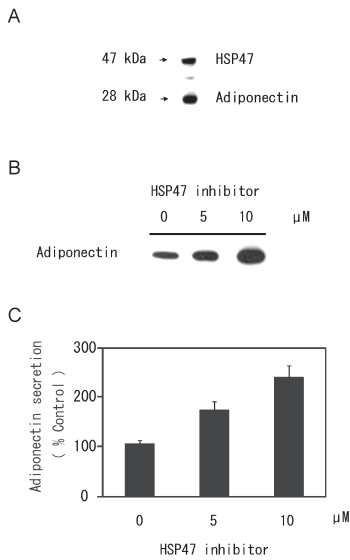


図3. HSP47は脂肪細胞に発現し、アディポネクチン分泌を制御する。

(A)分化8日目の脂肪細胞におけるアディポネクチンとHSP47の発現をウエスタンブロットにより確認した。次いで、分化8日目の脂肪細胞を5あるいは10μMのHSP47inhibitorで24時間処理し、培養上清中に分泌されたアディポネクチン量を(B)ウエスタンブロットにより解析し、その結果を(C)デンシトメトリーにより定量した。

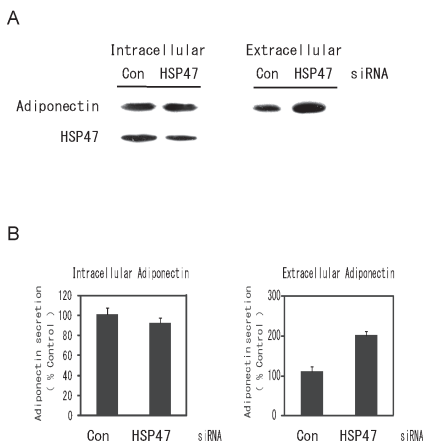


図4. 脂肪細胞でのHSP47ノックダウンはアディポネクチン分泌を増加させる。

(A),(B)分化4日目の脂肪細胞にpRNA-U6.1-HSP47を導入し、2日目に培地を交換後、さらに24時間培養した。細胞ライゼート10μgおよび培養上清1mL中の20μLをそれぞれSDS-PAGEで分離し、HSP47およびアディポネクチン量を(B)ウエスタンブロットと(C)デンシトメトリーにより解析した。

HSP47はin vitroおよびin vivoにおいてアディポネクチンと結合する。

HSP47とアディポネクチンが実際に結合しているか免疫沈降法を用いて解析した。抗HSP47抗体を用いて免疫沈降し、沈降したタンパク質を抗アディポネクチン抗体で検出した結果、分子量25kDa付近にアディポネクチンが検出された(図5A)。このことからHSP47がアディポネクチンと結合していることが確認された。そこで、Two-hybrid Systemを用いて更に確認したところ、全長アディポネクチンとHSP47の結合が確認され、その程度はコントロールのおよそ5倍であった(図5B)。また、この結合がアディポネクチンのコラーゲン様ドメインとの間で起こっているのかを確認する目的でコラーゲン様ドメインのみのコンストラクトを作製し、同様に解析した。その結果、アディポネクチンとHSP47の結合はコントロールと比較して5.5倍程度の上昇が認められた(図5B)。これらの結果より、アディポネクチンのコラーゲン様ドメインにHSP47が結合することが確認できた。

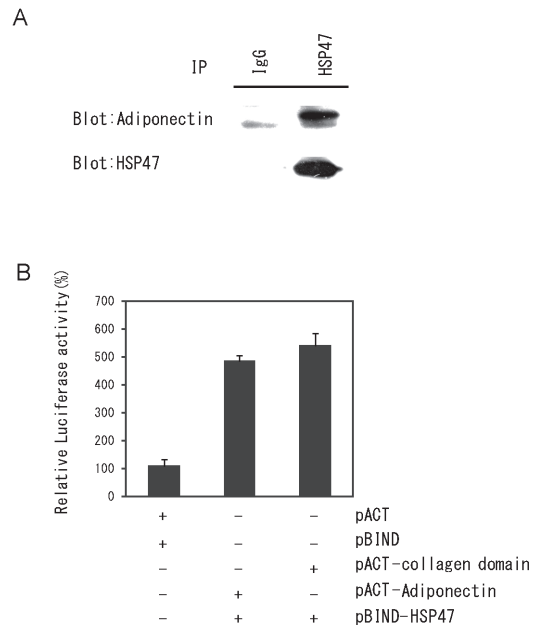


図5. HSP47はアディポネクチンと結合する。

(A)分化8日目の脂肪細胞を溶解後、抗HSP47抗体を用いて免疫沈降(IP)を行った。結合タンパク質をSDS-PAGEで分離後、ウエスタンブロットにて解析した。(B)pBIND-HSP47とpACT-adiponectinあるいはpACT-collagen domainをpG5-Luc vectorと共にHEK293細胞に導入後、2日目に細胞を溶解し、ルシフェラーゼアッセイにより結合の程度を評価した。

考 察

脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは、肥満、インスリン耐性、2型糖尿病において重要な役割を担っているという知見が集積されつつある。このことから、アディポネクチンの分泌制御あるいは多量体形成がどのようになされているかを明らかにすることは非常に重要であると考えられる。本研究で我々はアディポネクチン分泌を制御する分子として新たにコラーゲン特異的シャペロンである HSP47 が関与していることを明らかにした。

HSP47の過剰発現細胞ではアディポネクチン分泌は低下する一方で、HSP47ノックダウン細胞ではアディポネクチン分泌が顕著に上昇したことから、小胞体における HSP47の発現がアディポネクチン分泌経路において重要な役割を担っていることが予想される。興味深いことに、HSP47過剰発現あるいはノックダウン細胞における細胞内アディポネクチン濃度に変化は認められなかった。このことより、細胞内アディポネクチン量は厳密にコントロールされていると考えられ、実際、いくつかのグループにより、新規に合成されたアディポネクチンは大半が細胞内に保持され、プロテアソーム系により分解されていることが報告されている^{24) 25)}。また、アディポネクチン多量体は一度血中に分泌されるとほかの分子種に変換されず非常に安定であるといういくつかの報告もあり^{4) 26)}、これらの結果はアディポネクチン多量体形成・分泌が脂肪細胞内で厳密にコントロールされていることをさらに強く示唆している。

これまで、アディポネクチン分泌に関わる分子がいくつか同定されている。小胞体においては ERp44 がアディポネクチン Trimer を Trimer 分子中に存在するフリーの Cys と共有結合することで小胞体内に貯留させ、これに対し Ero1-L α や Protein disulfide bond isomerase (PDI) は酸化的なフォールディング機構により ERp44 と Trimer の結合を解除する^{14) 27)}。アディポネクチンはゴルジ体でさらなる修飾を受けた後、トランスゴルジネットワーク輸送に関わっている GGA1 (Golgi localizing g-adaptin ear homology domain ARF-binding protein) 小胞により細胞外へ分泌される²⁸⁾。これらの分子による制御はアディポネ

クチンが Trimer となってから分泌に至るまでの制御機構として考えられている。今回、我々は HSP47 とアディポネクチンの結合を2種類の方法により検討し、両者がアディポネクチンのコラーゲン様ドメインで相互作用することを見出した。本研究の免疫沈降法による検討では、HSP47 と共沈するタンパク質として分子量およそ 25kDa のアディポネクチンを検出した。糖鎖修飾が起らない大腸菌由来の組換えアディポネクチン、あるいはコラーゲン様ドメインのリジン残基をアルギニンに変異させたアディポネクチンの分子サイズは約 25kDa で、一方、糖鎖修飾されたアディポネクチンはおよそ 28kDa に検出される^{11) 12) 13)}。これらの結果は、HSP47 が翻訳後修飾されていない新生アディポネクチンに結合する可能性を示している。更に、3量体形成ができないことが予想される C 末球状ドメインを欠くアディポネクチンのコラーゲン様ドメインだけのコンストラクトにも結合することより、HSP47 は単量体アディポネクチンのコラーゲン様ドメインに結合して新生アディポネクチンの凝集を抑制し、また、小胞体内貯留に関与していることが示唆される。

さらに、Scherer らのグループはアディポネクチンのコラーゲン部分の Gly-X-Y の 22 繰り返し配列のうち 13 繰り返し配列を欠落させた遺伝子を過剰発現させたマウスでは、血清中のアディポネクチン濃度が上昇し、インスリン感受性を亢進することを見出している²⁴⁾。これらの報告では、*in vitro* の系では変異アディポネクチンは培養上清に分泌されないこと、また、変異タンパク質が内在性のアディポネクチンに組み込まれることにより、内在性アディポネクチンのプロテアソームによる分解を抑制し、結果としてアディポネクチン分泌を上昇させることを提唱している。しかしながら、何故コラーゲン部分の Gly-X-Y の繰り返し配列半欠損がアディポネクチン分泌を上昇させるのかは不明な点が多い。1つの可能性として、短いコラーゲン様ドメインしか持たないアディポネクチンには HSP47 が結合できず、このことにより分泌が増加するのかもしれない。興味深いことに、これらの遺伝子改変マウスの血中では HMW アディポネクチンのほか LMW (Low molecular weight) アディポネクチン濃度も顕著に上昇している。

HSP47はERで唯一のHeat shock proteinであり、また、コラーゲン特異的に結合することから、コラーゲン分泌を制御する分子として位置づけられている。実際、HSP47欠損マウスはコラーゲンに基づく組織構造が損なわれ胎生致死となる²⁹⁾。これまで脂肪細胞におけるHSP47の役割はほとんど明らかにされていなかった。今回の結果は、脂肪細胞にけるHSP47の新たな機能を示すものであると考えている。また、脂肪細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスでは、脂肪細胞でのみHSP47の発現が低下していることが報告されており、HSP47がインスリンシグナルにより制御されている可能性が考えられる³⁰⁾。

さらに、北川らのグループはHSP47が強く結合するコラーゲン3量体構造の結合モチーフTGXRGおよびPGXRGを見出した³¹⁾。同グループはアディポネクチンの構造にはこの結合モチーフが存在しないことを報告しており、これらのことはHSP47がアディポネクチンのコラーゲン様ドメインが形成した3量体構造を認識するのではなく、新生単量体アディポネクチン鎖に結合する可能性をさらに支持している。

本研究では、アディポネクチンの生合成、分泌制御機構において新たな分子としてHSP47を同定した。これらの制御機構の生理、病的分子メカニズムのさらなる解明は肥満や糖尿病における診断・治療に重要な情報を提供しうるものと考えている。

参考文献

- 1) Kadowaki, T., Yamauchi, T. and Kubota, N.: The physiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS, *FEBS Lett.*, 582, 74-80 (2008)
- 2) Bouskila, M., Pajvani, U.B. and Scherer, P.E.: Adiponectin: A relevant player in PPAR gamma-agonist-mediated improvements in hepatic insulin sensitivity?, *Int. J. Obes. (Lond)*, 29 Suppl 1, S17-S23 (2005)
- 3) Ahima, R.S., Qi, Y. and Singhal, N.S.: Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus, *Prog. Brain. Res.*, 153, 155-174 (2006)
- 4) Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., et al.: Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity, *J. Biol. Chem.*, 279, 12152-12162 (2004)
- 5) Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., et al.: Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin, *Circ. Res.*, 94, e27-e31 (2004)
- 6) Basu, R., Pajani, U.B., Rizza, R., et al.: Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects, *Diabetes*, 56, 2174-2177 (2007)
- 7) Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., et al.: Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake, *Cell Metab.*, 6, 55-68 (2007)
- 8) Ebinuma, H., Miida, T., and Yamauchi, T., et al.: Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid, *Clin. Chem.*, 53, 1541-1544 (2007)
- 9) Hu, E., Liang, P. and Spiegelman, B.M.: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.*, 271, 10697-10703 (1996)
- 10) Tsao, T.S., Tomas, E., Murrey, H., et al.: Role of disulfide bounds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity: different oligomers activate different signal transduction pathways, *J. Biol. Chem.*, 278, 50810-50817 (2003)
- 11) Wang, Y., Lam, K.S., Chan, L., et al.: Post-translational modification of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex, *J. Biol. Chem.*, 281, 16391-16400 (2006)
- 12) Richards, A.A., Stephens, T., Charlton, H., et al.: Adiponectin multimerisation is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation multimerisation by

- alterations in post-translational modifications, *Mol. Endocrinol.*, 20, 1673-1687 (2006)
- 13) Wang, Y., Xu, A., Knight, C., et al.: Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity, *J. Biol. Chem.*, 277, 19521-19529 (2002)
- 14) Wang, Z.V., Schraw, T.D., Kim, J.Y., et al.: Secretion of the adipocyte-specific secretor protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention, *Mol. Cell. Biol.*, 27, 3716-3731 (2007)
- 15) McLaughlin, S.H. and Bulleid, N.J.: Molecular recognition in procollagen chain assembly, *Matrix. Biol.*, 16, 369-377 (1998)
- 16) Bernocco, S., Finet, S., Ebel, C., et al.: Biophysical characterization of the C-propeptide trimer from human procollagen III reveals a tri-lobed structure, *J. Biol. Chem.*, 276, 48930-48936 (2001)
- 17) Bächinger, H.P., Bruckner, P., Timpl, R., et al.: Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization, *Eur. J. Biochem.*, 106, 619-632 (1980)
- 18) Nagata, K.: HSP47: a collagen-specific molecular chaperone, *Trends. Biochem. Sci.*, 21, 22-26 (1996)
- 19) Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., et al.: Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen, *J. Cell. Biol.*, 133, 469-483 (1996)
- 20) Koide, T., Asada, S. and Nagata, K.: Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47: Structural requirements and binding regulation, *J. Biol. Chem.*, 274, 34523-34526 (1999)
- 21) Koide, T., Aso, A., Torihuzi, T., et al.: Conformational requirements of collagenous peptides for recognition by the chaperone protein HSP47, *J. Biol. Chem.*, 275, 27957-27963 (2000)
- 22) Koide, T., Takahara, Y., Asada, S., et al.: Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple-helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47, *J. Biol. Chem.*, 277, 6178-6182 (2002)
- 23) Frost, S.C. and Lane, M.D.: Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 260, 2646-2652 (1985)
- 24) Combs, T.P., Pajvani, U.B., Berg, A.H., et al.: A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity, *Endocrinology*, 145, 367-383 (2004)
- 25) Clasen, R., Schupp, M., Foryst-Ludwig, A., et al.: PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin, *Hypertension*, 46, 137-143 (2005)
- 26) Taso, T.S., Murrey, H.E., Hug, C., et al.: Oligomerization state-dependent activation of NF-kappaB signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30), *J. Biol. Chem.*, 277, 4698-4707 (2007)
- 27) Qiang, L., Wang, H. and Farmer, S.R.: Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the ER oxidoreductase Ero1-L α , *Mol. Cell. Biol.*, 27, 4698-4707 (2007)
- 28) Xie, L., Boyle, D., Sanford, D., et al.: Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles, *J. Biol. Chem.*, 281, 7253-7259 (2006)
- 29) Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., et al.: Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis, *J. Cell. Biol.*, 150, 1499-506 (2000)
- 30) Blüher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., et al.: Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 279, 31902-31909 (2004)

- 31) Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., et al.: Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins, *J. Biol. Chem.*, 281, 11177–11185 (2006)

Regulation of adiponectin secretion by HSP47

Toshihiro Tanioka, Yuji Noba, Satoko Tohma,
Naomi Ohno, Takashi Tobe and Yasuko Nakano

Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacy, Showa University

Abstract

Adiponectin is a secretory protein secreted from adipocytes. Plasma adiponectin concentration is under strict control, suggesting the existence of a complicated and highly regulated secretory pathway. However, the critical mediators of adiponectin secretion have not been fully elucidated. In this study, we found that HSP47, known as collagen specific chaperone in the endoplasmic reticulum, binds to collagen domain of adiponectin and regulates adiponectin secretion. Over expression of HSP47 reduced adiponectin secretion, while suppression of HSP47 expression by siRNA markedly promoted adiponectin secretion. It was also observed that inhibition of HSP47 chaperone activity by HSP inhibitor increased adiponectin secretion dose-dependently. Moreover, we demonstrated that HSP47 interacted with the collagen-like domain of adiponectin. These results suggest that HSP47 retains newly synthesized adiponectin in the endoplasmic reticulum and in this way, works as one of the critical regulators of adiponectin biosynthesis and secretion.

Key Words : Adiponectin, HSP47, Collagen, Endoplasmic reticulum, adipocyte

Received 24 November 2009; accepted 5 January 2010.