

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14510

研究課題名(和文) 蛍光共鳴エネルギー移動システムを利用した小胞体ストレス応答バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of high sensitivity biosensor for detecting of endoplasmic reticulum stress

研究代表者

小池 雅昭 (Koike, Masaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号：10598402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体はタンパク質合成やレドックス制御、そしてカルシウム濃度制御に重要な働きを果たし、これらの制御に異常が生じると小胞体ストレス応答が誘導される。本研究では小胞体ストレス応答を可視化できる新しい小胞体ストレスバイオセンサーの開発を行った。今後、作製したバイオセンサーを用いることで、これまで明らかにされていない新規小胞体ストレス応答シグナル機構の解析を検討することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) has important roles, such as protein synthesis, redox regulation, and calcium concentration regulation. It is known that abnormalities of these regulation occur ER stress response. In this study, we developed a new ER stress biosensor which can visualize ER stress response. By using biosensor prepared in the future, it is expected to study analysis of novel ER stress signal mechanism which has not been clarified so far.

研究分野：細胞生物学

キーワード：バイオセンサー 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1)小胞体ストレス応答

細胞は常に細胞内外から刺激を受けており、ある閾値以上の刺激に対しては細胞内ストレス応答機構が誘導される。なかでも小胞体ストレス応答「Unfolded Protein Response:以下UPR」の分子機構については研究が進んでおり、UPRの破綻が神経変性疾患や糖尿病など様々な疾患の原因となることが知られている。UPRに関わる因子の機能調節が治療薬のターゲットとなる可能性もあり、UPR機構の解明は非常に重要な研究課題である。

小胞体はタンパク質合成やレドックス制御、そしてカルシウム濃度の調節を担う細胞内小器官であり、これらの調節機構に異常が生じるとUPRが誘導される。UPRは小胞体ストレスを軽減するためのシャペロン分子やタンパク質分解に関わる因子の誘導、または細胞死シグナルを誘導する。この応答機構には複数の経路が存在するが、我々の研究室では、進化的に最も保存されているIRE1 $\alpha$ -XBP1経路に注目し研究を進めてきた。小胞体膜タンパク質であるIRE1 $\alpha$ は通常時BiP/GRP78タンパク質(以下:BiP)と結合している。BiPが小胞体内の異常を感知するとIRE1 $\alpha$ から解離し、IRE1 $\alpha$ は自己集合体を形成することで活性化する(図1)。活性化したIRE1 $\alpha$ はXBP1 mRNAをスプライシングし、スプライシングを受けたXBP1 mRNAは翻訳後、小胞体内シャペロン等を誘導する転写因子として作用する。

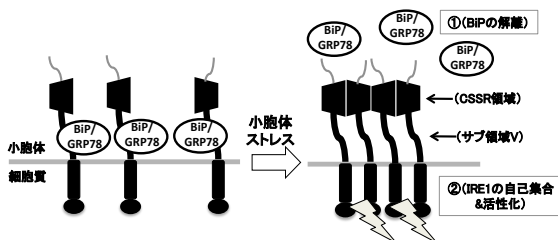


図1 IRE1 $\alpha$ 活性化のメカニズム

(2) 小胞体ストレスバイオセンサーの現状

我々は、このIRE1 $\alpha$ -XBP1経路と蛍光タンパク質を利用した小胞体ストレスバイオセンサー(ER stress Activator Indicator:以下ERAI法)を開発した。このERAI法を用いることで培養細胞のみならず、マウスの個体内においても小胞体ストレスを可視化することに成功している。非常に画期的なシステムであるERAI法であるが、いくつかの問題点がある。1つ目は時間分解能が低いという点である。ERAI法では「IRE1 $\alpha$ によるXBP1のスプライシング反応を介した蛍光タンパク質の発現」を検出系として用いている。つまり小胞体ストレスを可視化できるまでに、IRE1 $\alpha$ の活性化、XBP1のスプライシング、そして蛍光タンパク質の発現というステップを経るため、ストレス発生から検出までに比較的長い時間を要する。これは結果として、スト

レスのON-OFFの切り替えといった、速い経時的変化を検出することができないという時間分解能の低さにもつながる。2つ目は空間分解能の低さである。ERAI法では、細胞全体に発現する蛍光タンパク質を検出系として用いているため、個々の細胞間でのストレスの有無を比較することは可能であるが、1細胞レベルでストレスの発生部位を詳細に検討することは不可能である。これらのことから、時間分解能、空間分解能の高い小胞体ストレスバイオセンサーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

小胞体は細胞全体に網目状に広がっており、ストレスや細胞内環境によって細胞内の小胞体全体ではなく、小胞体のある特定部位が特異的にストレスに反応している可能性も十分に考えられる。これらの可能性を検討するためにも、時間分解能、そして空間分解能が高い新規プローブの開発が望まれる。そこで本研究では、「FRETシステムを用いた新規小胞体ストレスバイオセンサーの開発」を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1)FRETバイオセンサー

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)とは励起された、ある蛍光物質(ドナー)のエネルギーが、近傍に位置する他の蛍光物質(アクセプター)に無放射遷移する現象を指す。FRETの原理に基づくバイオセンサーはCa<sup>2+</sup>などの低分子や細胞内シグナル分子の活性をリアルタイムで観測する検出系として幅広く使用されている。一般的に、蛍光タンパク質を用いるFRETバイオセンサーは、ドナー蛍光タンパク質、アクセプター蛍光タンパク質、センサー、リガンド、そしてリンカー領域からなる(図2)。センサー領域には低分子の結合やリン酸化修飾により構造が変化する部位を、そしてその構造変化を識別して特異的に結合できる領域をリガンド領域として用いる。また、そのリガンド-センサー間をつなぐ領域をリンカー領域と呼ぶ(図2)。本研究ではこれらのリガンド-センサー領域にIRE1 $\alpha$ の自己集合に必要なCSSR領域を、そしてリンカー領域にIRE1 $\alpha$ とBiPの結合領域を利用することで新しいUPRバイオセンサーの開発を試みた。

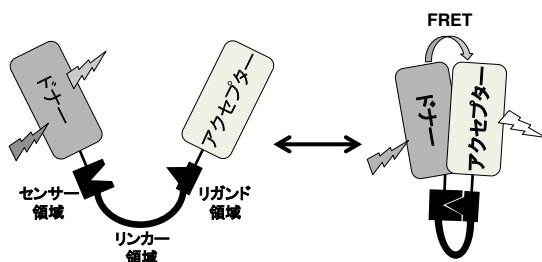


図2 1分子FRETバイオセンサーのデザイン

## (2) バイオセンサーのデザイン

UPR には IRE1 $\alpha$  経路、PERK 経路、そして ATF6 経路という 3 つの経路が存在し、これまでの研究から小胞体ストレスによる各経路の制御機構が明らかにされている。小胞体膜タンパク質 IRE1 $\alpha$  と PERK は通常時、BiP と結合しており小胞体内のストレスを BiP が感知すると IRE1 $\alpha$ 、PERK から解離する。その後、IRE1 $\alpha$ 、PERK は自己集合することで活性化し、下流にシグナルを伝える。ATF6 も同様に BiP と結合しており、小胞体ストレスにより BiP が解離することで ATF6 はゴルジ体へと移行し、切断され、活性化体となる。このように UPR には大きく 3 つの経路が存在するが、興味深いのは、そのどれもが小胞体内タンパク質 BiP を介して機能制御を果たしているという点である。本研究ではこの点に注目し、BiP の結合-解離の変化を利用した FRET バイオセンサーの開発を行う。これまでの我々の研究結果より、IRE1 $\alpha$  の小胞体内腔側のサブ領域 V が BiP と直接結合し、また同じく内腔側の CSSR 領域が自己集合に必要なことを明らかにしている。興味深いことに、IRE1 $\alpha$  のサブ領域 V と相同性の高い領域が PERK にも保存されており、PERK はこの領域を介して BiP と結合していることが明らかにされている。培養細胞に薬剤で小胞体ストレスを誘導すると PERK と BiP の結合は 15 分以内に、また IRE1 $\alpha$  と BiP の結合は 5 分以内に解離し、PERK、IRE1 は自己集合の後、活性化することが報告されている。また、細胞に薬剤で小胞体ストレスを誘導した後、薬剤を培地中から除去すると 10 分以内に IRE1 $\alpha$  と BiP の結合が回復することも報告されている。これらの事実は、IRE1 $\alpha$  と BiP の結合-解離は小胞体ストレスの ON-OFF をリアルタイムで検出する良いセンサーとなることを示唆している。このことより IRE1 $\alpha$  のサブ領域 V、そして自己集合に必要な CSSR 領域をバイオセンサーに用いることで速いタイムスケールでの小胞体ストレスを検出することが可能となると考えた。また小胞体移行シグナルと小胞体保留シグナルを付加することで、小胞体内にとどまりストレスを感知する FRET バイオセンサーの開発を目指した(図 3)。

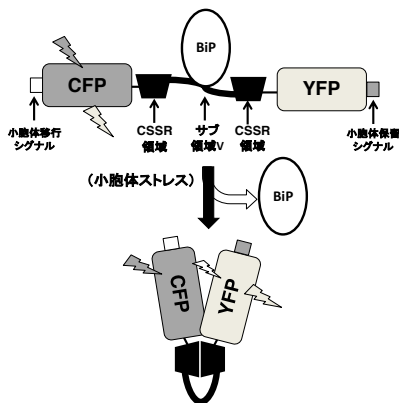


図 3 小胞体ストレスバイオセンサーの概略

## 4. 研究成果

### (1) バイオセンサーの発現パターン

はじめに試作した小胞体ストレスバイオセンサーの発現と細胞内局在を検討するために、ヒト胎児腎細胞である HEK293T 細胞に一過性に発現させた後、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、細胞内における蛍光タンパク質の発現が確認できたことより、作製したバイオセンサーが発現していることが明らかとなった(図 4)。また、ウェスタンブロット法でバイオセンサーの分子量を検討した結果、目的とする位置にバンドが検出されたことより、作製したバイオセンサーが正常に発現していることが確かめられた(data not shown)。

しかし一方で、バイオセンサーの細胞内における発現パターンが小胞体様の網目構造の局在を示しておらず、凝集体様の構造物を形成していることが明らかとなった(図 4)。これは、作製したバイオセンサーが細胞内で不安定な構造を取っているために起きていると考えられる。

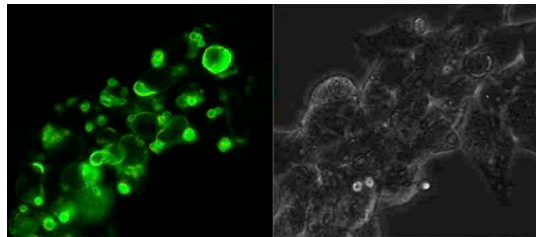


図 4 作製したバイオセンサーの細胞内局在

このままではバイオセンサーとして使用することは難しいと考え、次に、バイオセンサーの改変を試みた。図 4 の結果より、作製したバイオセンサーは凝集体様の局在を示すが、一方で単純に凝集体だけではなく、(小胞体?) 膜上に局在している像が観察される。そこで、細胞を分画処理したのちウェスタンブロット法で局在を調べた結果、膜分画に多く発現していることが確かめられた。バイオセンサーが膜分画に組み込まれていることより、膜挿入のモチーフとなる疎水性アミノ酸に富んだ配列を調べた結果、バイオセンサーのリンカー領域に利用した IRE1 $\alpha$  のサブ領域 V に疎水性アミノ酸のトランスメンブレン領域がわずかに含まれていることが明らかとなった。おそらくこのトランスメンブレン領域を介して何らかの形で小胞体膜上に局在するために、このような局在、発現パターンを示している可能性が考えられた。そこで、サブ領域 V にアミノ酸変異、もしくは少しずつ短くしていくなどの改変を加え、凝集体を形成せず、かつ小胞体様の局在を示すバイオセンサーの作製を試みた。その結果、サブ領域 V の一部を欠損させ、かつ CSSR 領域との間にスペーサー配列を加えることで小胞体様の局在を示すバイオセンサーの開発に成功した(図 5)。

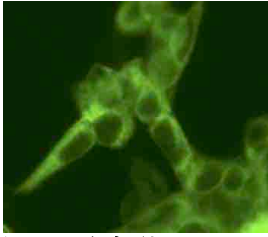


図5 改変型バイオセンサーの細胞内局在

## (2) バイオセンサーを用いた今後の展望

小胞体はタンパク質合成やレドックス制御、そしてカルシウム濃度制御に重要な働きを果たし、これらの制御に異常が生じると小胞体ストレス応答が誘導される。この小胞体ストレス応答を可視化するバイオセンサーが数種類開発されているが、これらは小胞体ストレス応答の後期過程を検出系として利用しており、時間分解能や空間分解能が低いなどの問題点がある。本研究ではこれらの問題点を解決し得る新しい小胞体ストレスバイオセンサーの開発を目的とした。

本研究により、複数の改変型バイオセンサーを作製し、細胞内での発現パターンなどを検討したが、研究を遂行するにあたっていくつかの問題点が生じた。それは、バイオセンサーを細胞内にトランスフェクションすることで一過性に発現させているが、調べてみると、トランスフェクション処理だけで小胞体ストレスが生じるということが明らかとなった。そのため、発現後のストレス刺激によるバイオセンサーの応答を検出することが非常に困難であった。そこで、バイオセンサーを恒常的に発現する細胞株の樹立を行い、現在、作製した細胞株を用いてバイオセンサーが小胞体ストレスなどの細胞内刺激に応答するかを検討している。今後、作製したバイオセンサーを用いることで、これまで明らかにされていない新規 UPR シグナル機構の解析を検討することが期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 雅昭 (Koike Masaaki)  
奈良先端科学技術大学院大学・  
研究推進機構・特任助教  
研究者番号：10598402

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )