

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19901

研究課題名(和文)ゲノム編集技術による新規ストレス制御機構の探索と老年病治療への応用

研究課題名(英文) Exploring novel stress signaling pathways using a genome-editing approach for development of geriatric treatments

研究代表者

大橋 憲太郎 (Kentaro, Oh-hashii)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50332953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR/Cas9システムを用いることにより種々の小胞体ストレス関連因子をノックダウンした細胞株の樹立し、それらの解析を試みた。とりわけ、ATF4、GADD34、IRE1、MANF及びCRELD2欠損Neuro2a細胞におけるストレス応答能などの特徴を明らかにした。さらに、小胞体関連分解(ERAD)の1つSEL1Lを欠損したHEK293を樹立・解析したところ、ERADは、小胞体ストレス応答のみならずゴルジ体ストレス応答にも関与することが明らかとなった。以上のように、これら知見は小胞体ストレスが関わる各種疾患の発症と進行を理解するための新たな知見をもたらすものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ゲノム編集技術の1つとしてCRISPR/Cas9システムを用いて小胞体を中心としたストレス応答機構の解明を試みた。本システムは、標的遺伝子の下流に薬剤耐性遺伝子をノックインし、特定の薬剤によりセレクションすることでノックダウン細胞を樹立できる簡便なシステムである。とりわけ、2種類の薬剤耐性遺伝子を異なる標的遺伝子下流に挿入することにより、double knockdown細胞を簡便に樹立することが可能になった。本システムにより得られた小胞体異常に起因する細胞死シグナル機構は、今後の各種病態解析に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established several cell-lines in which ER stress-related genes were respectively knock-downed using the CRISPR/Cas9 system. Especially, we studied ATF4-, GADD34-, IRE1-, MANF- and CRELD2-deficient Neuro2a cells among the ER stress signaling factors. Furthermore, characterization of the SEL1L-deficient HEK293 cells showed that ER-associated degradation is associated with not only ER stress responses but also Golgi stress ones. It is considered that these findings might give insights into understanding onset and progression of ER stress-related diseases.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：小胞体ストレス ゴルジ体ストレス ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年我が国は、急速な高齢化に伴い他に類を見ない高齢化社会を迎えようとしている。今後、加齢による脳神経系・循環器・運動器などの多くの疾患を抱える高齢者の増大が予想される。我が国が持続可能な高齢化社会を維持するには、難治性神経変性疾患をはじめとする老年病に関する基礎的研究とそれに基づく予防・治療法の確立が必須であると考えられる。これまで細胞保護を目的として、神経成長因子(NGF)など多くの分泌性因子が研究されてきたが、いずれの因子も神経変性疾患の有効な治療薬とはなっていない。このような現状を打破するには、より新しい視点での病因の解明や薬剤の開発が必要であると考えられる。申請者は過去数年にわたり、細胞内小器官の小胞体に起因する“小胞体ストレス”に着目し、新規因子の同定などの研究を行ってきた。申請者が着目する小胞体ストレス応答は、脳神経系のみならず末梢組織でも見られる普遍的現象であり、各種老年病のみならず癌、糖尿病や虚血性疾患などにおいてもこの小胞体ストレス応答制御の破綻が報告されている。このように小胞体ストレス応答は、各疾患に対する新規の予防・治療薬の開発のための重要な標的になりうると考えられるが、未だ十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

近年、分子生物学における全く新しい手法としてゲノム編集技術が開発された。この技術は、これまで莫大な費用と時間を要していた遺伝子欠損細胞(動物)の作製を安価にかつ簡便に行うことを可能にした。本研究では、申請者がこれまで行ってきた小胞体ストレス応答に対する知見と新規技術であるゲノム編集を組み合わせることにより、未知の小胞体ストレス制御機構を発見・解明し、神経変性疾患などの治療への糸口にしたいと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR/Cas9 を用いたより簡便なゲノム編集による標的因子の欠損細胞の樹立とその性状解析を目的として、標的遺伝子の翻訳開始領域下流に薬剤耐性遺伝子を挿入可能とするコンストラクトを作製した。主な標的因子として、小胞体ストレスシグナルに関わる ATF4, GADD34, IRE1 α 、小胞体関連分解(ERAD)に関わる SEL1L, Herp 及び機能が十分に解明されていない小胞体ストレス応答因子 MANF, CRELD2 に着目し検討を行った。実験は、遺伝子導入効率が高いマウス神経芽細胞腫 Neuro2a またはヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 を用い、標的遺伝子の編集に必要な plasmid (crRNA 及び Cas9 発現ベクターなど) をトランスフェクションし、ピューロマイシンまたはハイグロマイシンにてセレクションを行なった。主要な実験は、各薬剤でセレクションしたのみの mixed clone を用いた。一部の実験では、限界希釈によりクローン化した遺伝子欠損細胞株も検討した。

標的遺伝子産物を含めた各タンパク質の発現量の変化はウエスタンブロッティングにて解析した。各ゲノム編集及び薬剤刺激による mRNA 量の変化は、RT-PCR 法にて解析した。

ERAD 基質の細胞内外の会合状態の解析には、NHK タンパク質に NanoBiT タグ(LgBiT または SmBiT)を付加するコンストラクトを作製し、各細胞株にトランスフェクションした。NanoBiT タグの会合に由来する NanoLuciferase 活性を測定するために、培養液中に NanoLuc 基質を添加し、細胞内外での酵素活性を測定した。

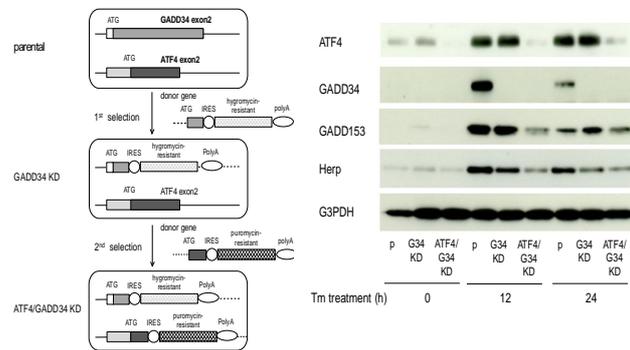
生細胞中における IRE1 α 活性測定には、NanoLuc またはその誘導体である HiBiT と融合した XBP1 コンストラクトを作製し、各細胞株にトランスフェクションした。各小胞体ストレス誘導剤及び IRE1 α 阻害剤で処理の後に、培養液中に NanoLuc 基質を添加することにより IRE1 α 活性の変化を解析した。

4. 研究成果

1) ATF4 及び GADD34 欠損 Neuro2a 細胞株の樹立と小胞体ストレス応答能の解析

一般に、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集細胞の樹立には、変異が導入された細胞株をクローニングにより得る必要がある。しかし、このクローン化により得られた各細胞株は、変異部位によらない細胞特性を獲得する可能性が考えられる。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 による相同組み換えにて標的タンパク質の N 末端をコードしている領域の直下に薬剤耐性遺伝子を挿入し、薬剤存在下で培養、セレクションを行った(図)。その結果、得られた細胞株は複数の変異パターンを有する標的因子欠損細胞株として樹立することができた。また、挿入する薬剤耐性遺伝子を2種類用いることで、異なる2つ標的因子を欠損した細胞株の樹立も試みた。本研究では、これまでの知見に基づき、Neuro2a 細胞における ATF4 及びその下流因子である GADD34

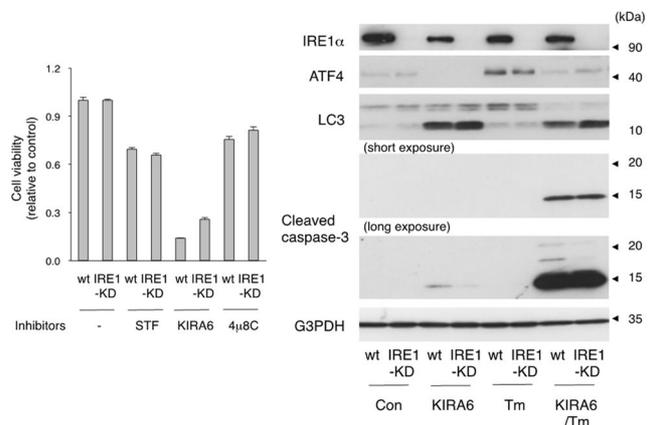
を欠損させ、その性状を解析した。ATF4 欠損 Neuro2a 細胞では、ツニカマイシン (Tm) 刺激による GADD153, GADD34, Herp 発現誘導が野生型と比べて有意に抑制されていた。一方、GADD34 欠損による抑制効果は部分的であった。さらに、ATF4/GADD34 欠損細胞を樹立し解析したところ、ATF4 欠損細胞と類似であり、両因子を欠損した影響は見られなかった (図)。また、Tm 誘導性アポトーシスを cleaved caspase-3 の発現量で解析したところ、ATF4 欠損では有意に抑制されたものの、GADD34 欠損の効果はほとんど見られなかった。



2) IRE1α欠損 Neuro2a 細胞の樹立及び各種 IRE1 阻害剤の評価

小胞体シグナルには、主要な3つの経路として PERK-ATF4、IRE1-XBP1、ATF6系が存在している。そこで次に、IRE1α欠損 Neuro2a 細胞を樹立し、その性状を解析した。はじめに、NanoLuc またはその誘導体である HiBiT 融合 XBP1 を用いて、生細胞中での IRE1 活性測定を行なった。その結果、IRE1α欠損細胞では、小胞体ストレス誘導剤によるルシフェラーゼ活性の上昇が著しく低下していた。この結果は、内因性 XBP1 タンパク質の発現誘導抑制と一致していた。これまでに、数種の IRE1 阻害剤が開発されている。そこで、入手可能な4種 (toyocamycin, STF083010, 4u8C, KIRA6) について検討を行った。

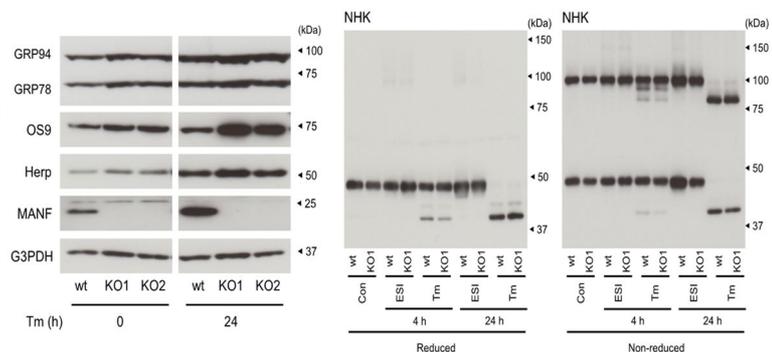
その結果、いずれの薬剤も IRE1α非依存的な細胞毒性を有することが明らかになった (図)。そこで、とりわけ細胞毒性を強く示した KIRA6 について更なる解析をすすめた。その結果、KIRA6 は IRE1α非依存的にオートファジー経路の1つである LC3-II を誘導すること、また、Tm との共処理により cleaved caspase-9, cleaved caspase-3 を著しく誘導することが明らかとなった (図)。



3) MANF 欠損 Neuro2a 細胞の樹立及び小胞体関連分解(ERAD)の解析

MANF は、ATF6 及び IRE1-XBP1 経路により制御される神経栄養因子として報告されている。一方、我々を含めいくつかのグループは、MANF C 末端の KDEL 様配列に着目し、MANF が小胞体内でのタンパク質恒常性や輸送に関わる可能性を報告している。そこで本システムにより、MANF 欠損 Neuro2a 細胞 (KO1, 2) を樹立し、ERAD 関連タンパク質の発現解析を行った。その結果、MANF 欠損細胞では、Tm 刺激 24 時間後の OS-9 発現量が野生型細胞に比べて有意に上昇していた (図)。そこで、ERAD 基質としての研究報告が数多くある NHK を用いて、細胞内での会合、分解、分泌を解析した。

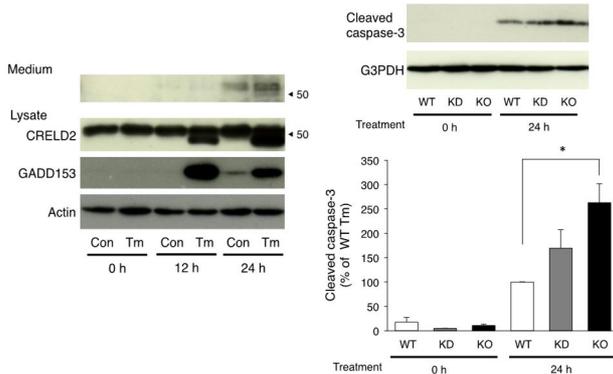
実験は、一般的なウエスタンブロットングに加えて、NHK 遺伝子の3'末端に NanoBiT を付加したコンストラクトを作製し、検討を行った。ERAD 阻害剤として報告がある eeyarestatin I (ESI) 処理は NHK タンパク質の細胞内蓄積を促したものの、MANF 欠損の影響はほとんど見られなかった (図)。



4) CRELD2 欠損 Neuro2a 細胞の樹立及び小胞体ストレス応答能の解析

CRELD2 は、以前申請者が同定した機能未解明な小胞体ストレス誘導性因子である。これまでの解析より、a)ATF6 により転写制御されること、b)CRELD2 タンパク質は小胞体のみならず、その一部は細胞外にも分泌されることを報告してきた。しかしながらこれら検討は、CRELD2 を強制発現した条件でのものであった。そこで、内因性 CRELD2 の発現解析に加えて、本システムにて樹立した CRELD2 欠損 Neuro2a 細胞の性状解析も行った。これまでの知見どおり、Neuro2a 細胞における内因性 CRELD2 mRNA 発現は小胞体ストレス誘導剤で著しく誘導された。しかしながら、短時間の刺激では内因性 CRELD2 タンパク質は殆ど増加しなかった。そこで、12 時間以上の長時間にわたり Tm 刺激を行ったところ、低分子量の CRELD2 タンパク質の増加が見られた(図)。また、同様の CRELD2 タンパク質発現増加が、Tm を腹腔内投与したマウス肝臓でもみられた。

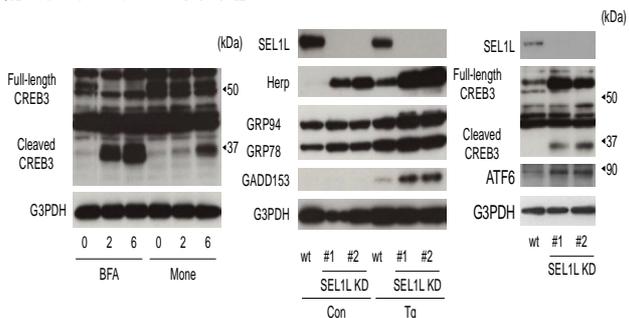
一方、CRELD2 欠損 Neuro2a 細胞(KD, KO)における小胞体ストレス応答について解析したところ、GADD153 を含めた主要な因子の Tm 誘導性は、野生型細胞と同程度であった。最後に、Tm 誘導性 cleaved caspase-3 発現を検討したところ、CRELD2 欠損細胞での発現がわずかではあるが有意に増加していた(図)。



5) SEL1L 及び Herp 欠損 HEK293 細胞の樹立及び小胞体関連分解(ERAD)の解析

これまで、Neuro2a 細胞を用いていくつかのストレス応答関連因子をゲノム編集し、その性状を解析してきた。そこで次に、他の細胞株として HEK293 を用いて ERAD 関連因子 SEL1L, Herp 欠損細胞を樹立し、その性状を解析した。ERAD は、SEL1L, Herp をはじめとする様々な因子が複合体を形成し、制御されていることが明らかとなっている。とりわけ、SEL1L は ERAD の主要因子であり、その欠損は ATF6 分解の低下につながるということが報告されている。本研究では、ATF6 と類似のタンパク質構造を持つ CREB3(Luman)について検討を行った。CREB3 は ATF6 同様に小胞体局在性の膜貫通タンパク質であるが、その活性化機構は小胞体ストレス応答性の ATF6 とは異なることが示唆されている。HEK293 細胞を用いた本研究においても、cleaved CREB3 の発現は brefeldin A (BFA)や monensin 処理で誘導されたものの、タブシガルギンや Tm 刺激ではみられなかった。そこで、樹立した SEL1L 及び Herp 欠損 HEK293 細胞における CREB3 発現量を解析したところ、SEL1L 欠損細胞において著しい増加がみられた(図)。

これは、各欠損細胞における ATF6 タンパク質の挙動と同じ傾向であった。最後に、野生型及び SEL1L 欠損細胞をタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドにて処理したところ、SEL1L 欠損による CREB3 の増加は、その分解抑制によることが明らかとなった。



以上より、本 CRISPR/Cas9 システムを用いることで、簡便かつ迅速にストレス応答因子を欠損させることが可能であることが明らかとなった。また、今回樹立した複数の細胞株を用いることにより、小胞体を起点とした様々な細胞制御機構が明らかとなった。今後これら知見を基に、小胞体を標的とした新たな薬剤及び評価の開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Norisada J, Fujimura K, Amaya F, Kohno H, Hirata Y, Oh-Hashi K.	4. 巻 60(8)
2. 論文標題 Application of NanoBiT for Monitoring Dimerization of the Null Hong Kong Variant of -1-Antitrypsin, NHK, in Living Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 539-549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12033-018-0092-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oh-Hashi K, Fujimura K, Norisada J, Hirata Y.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Expression analysis and functional characterization of the mouse cysteine-rich with EGF-like domains 2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 12236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30362-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oh-Hashi K, Soga A, Naruse Y, Takahashi K, Kiuchi K, Hirata Y.	4. 巻 448(1-2)
2. 論文標題 Elucidating post-translational regulation of mouse CREB3 in Neuro2a cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 287-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-018-3333-9. Epub 2018 Feb 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oh-hashii K, Sugiura N, Amaya F, Isobe KI, Hirata Y.	4. 巻 440
2. 論文標題 Functional validation of ATF4 and GADD34 in Neuro2a cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 65-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-017-3156-0. Epub 2017 Aug 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oh-hashii K, Furuta E, Fujimura K, Hirata Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in Neuro2a cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.08.002. eCollection 2017 Dec.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oh-hashii K, Matsumoto S, Sakai T, Hirata Y, Okuda K, Nagasawa H	4. 巻 188
2. 論文標題 Effects of 2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide on ERAD Component Expression in HT-29 Cells Under a Serum- and Glucose-Deprived Condition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl Biochem Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 1009-1021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-019-02969-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oh-hashii K, Takahashi K, Hirata Y	4. 巻 593
2. 論文標題 Regulation of the ER-bound transcription factor Luman/CREB3 in HEK293 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2771-2778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13535.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oh-hashii K, Hirata Y	4. 巻 190
2. 論文標題 Elucidation of the Molecular Characteristics of Wild-Type and AALS-Linked Mutant SOD1 Using the NanoLuc Complementation Reporter System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl Biochem Biotechnol	6. 最初と最後の頁 674-685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-019-03114-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oh-hashii K, Kohno H, Kandeel M, Hirata Y	4. 巻 465
2. 論文標題 Characterization of IRE1 in Neuro2a cells by pharmacological and CRISPR/Cas9 approaches.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 53-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-019-03666-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤村 啓斗、平田 洋子、大橋 憲太郎
2. 発表標題 マウス cysteine-rich with EGF-like domains 2 の発現および機能の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 貴人、平田 洋子、大橋 憲太郎
2. 発表標題 HEK293細胞におけるER局在性転写因Luman/CREB3の調節
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天谷 文昌 (Amaya Fumimasa) (60347466)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	