

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19640

研究課題名（和文）非破壊的小胞体ストレス測定法の創出

研究課題名（英文）Measurement of ER stress without destruction

研究代表者

村上 智彦（Murakami, Tomohiko）

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50510723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス時に細胞外に放出される因子をプロテオーム解析にて探索した。その結果、小胞体ストレス依存的に細胞上清中に放出されるタンパク質を見出した。さらに、この因子の機能を調べるために、そのリコンビナントタンパク質を細胞培養に添加したところ、炎症関連遺伝子の発現を強く誘導した。以上の結果、今回同定したターゲット因子は小胞体ストレスインディケーターになると共に新規の炎症誘導物質としても機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス依存的に細胞外に放出される因子の同定により、非破壊的に小胞体ストレス状態を測定する技術の確立に近づいた。この技術の応用による小胞体ストレス関連疾患に対する新規予測診断法の確立は、内分泌、骨軟骨代謝疾患、神経を含む難病の予防あるいは早期治療への応用に発展していくことが期待される。さらに、今回同定した因子は新規の炎症誘導物質としても機能することから、小胞体ストレスインディケーターとしての役目だけではなく疾患自体との関連性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：To identify proteins released to extracellular space in response to endoplasmic reticulum (ER) stress, we searched for the proteins by proteome analysis. As a result, we found a protein that is released into the cell supernatant after ER stress. To investigate the function of the protein, we analyzed gene expression of cells stimulated with or without the recombinant protein. These results indicated that the protein strongly induced the expression of inflammation-related genes. Taken together, these findings suggested that the protein acts as an ER stress indicator and also functions as a novel inflammation inducer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス プロテオーム解析 オルガネラ障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜貫通型タンパク質あるいは分泌型タンパク質はその合成過程において小胞体内に一旦運び込まれ、適切な折り畳みと様々な修飾を受けて機能を持ったタンパク質に成熟していく。細胞内外からの多様な刺激により小胞体内腔でのタンパク質の成熟が阻害されると小胞体内に不良タンパク質となって蓄積し細胞にダメージを与える。細胞にとって小胞体機能異常すなわち小胞体ストレスは極めて重篤な事態で、直ちにストレスから回避するため小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーを起点とした防御システムを活性化させる。小胞体ストレスセンサータンパク質としては、IRE1, PERK, ATF6 の 3 つのセンサーがよく知られており、これら小胞体ストレスセンサーを中心としたストレス応答系は小胞体ストレス応答と呼ばれる。これら小胞体ストレスセンサーは各種細胞に広く発現し、小胞体のホメオスタシス維持に寄与していると考えられている。このように小胞体はタンパク質の成熟を支えるための必要不可欠なオルガネラであるとともに、非常時に細胞死から身を守るシグナル発信基地としての役割を併せ持つ。

(2) 近年、小胞体ストレス応答は細胞の危機的状態から回避するためだけのシステムではなく、特定の細胞の分化・成熟にも重要な役割を演じていることが証明されてきた。例えば、上記の 3 つの小胞体ストレスセンサーに加え、細胞種特異的な小胞体ストレスセンサーは細胞種に特化した小胞体ストレス応答に関わることが報告されている。一方、生体制御に必須のこれら応答系の機能障害が糖尿病、肥満などのメタボリックシンドローム、神経変性疾患、骨軟骨疾患、がん、歯周炎などの様々な疾患の発症に直結することもヒトの遺伝子機能解析やマウスモデルを用いた研究から明らかにされ、小胞体ストレス応答は疾患研究のひとつの大きな領域を占めるに至っている。

2. 研究の目的

小胞体ストレスが関連する疾患としては、これまで糖尿病、肥満などのメタボリックシンドローム、神経変性疾患、骨軟骨疾患、がん、歯周炎などが報告されている。これら疾患において共通することは、小胞体ストレスがそれぞれの疾患発症の前兆あるいは病態進行に関わっているとされる点である。従って、もし生体内の小胞体ストレスレベルを測定することができれば、小胞体ストレス関連疾患の前兆あるいは病態進行を捉えることにつながると考えられる。患者の細胞あるいは臓器を破壊することなく、細胞内あるいは臓器内の小胞体ストレスをモニタリングする試みは国内外ともになされていない。本研究では、細胞外から非破壊的に細胞内の小胞体ストレスレベルを測定する技術を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレス時に細胞外に放出される因子の探索

小胞体ストレス状態において、小胞体で作られるタンパク質の多くは翻訳抑制あるいは折り畳み不全になり細胞質に輸送後プロテアソームによるタンパク質分解を受ける。一方、小胞体ストレス時にむしろ翻訳が促進されるようなタンパク質も知られている。このようなタンパク質の中で細胞外に放出されるものが存在する可能性がある。そこで小胞体ストレス時に細胞外に放出される因子の探索として、サブシガルジンやツニカマイシンなどといった各種小胞体ストレス誘導剤を培養細胞に負荷し、培養上清を回収、変動する因子を探索した。培養細胞としては、一般的な細胞株に加え、小胞体ストレス関連疾患の患部で認められる細胞としてマクロファージなどの初代培養を用いた。探索方法としては、タンパク質、ペプチドをターゲットにした網羅的プロテオーム解析を行うために、大阪大学の共通機器である最新鋭の質量分析機器 LC-ESI-MS/MS を用いた。また遺伝子発現を網羅的に分析するためにマイクロアレイ解析も同時に行った。遺伝子の発現変動と放出されるタンパク質を網羅的に解析することで、変動の認められる因子あるいは経路の探索を行った。

(2) 小胞体ストレス誘導性因子の機能解析

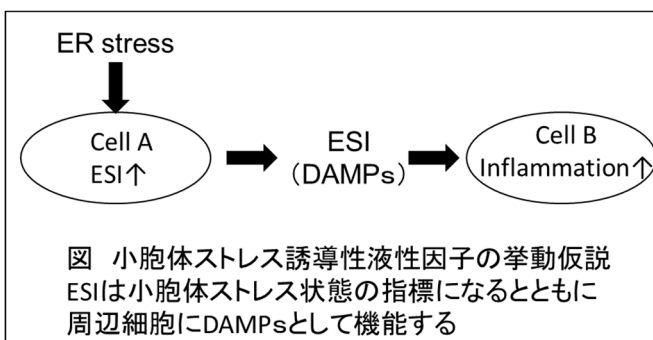
小胞体ストレス時に細胞外に放出される因子の探索において、変動が認められた因子に対し詳

細な機能解析を行った。まず質量分析で検出された因子が実際の細胞上清サンプルで検出できるかを確認するために細胞培養上清を用いてウエスタンブロッティングによる検出確認を行った。またターゲット因子によっては適切な抗体が存在しない場合があるため、ウエスタンブロッティングにて検出が困難な場合は ELISA 法による検出を試みた。続いて同定した因子あるいはその関連分子が、小胞体ストレスシグナルに関わるか否かを検討するために、培養細胞を用いた過剰発現実験、レンチウイルスシステムを用いた shRNA によるノックダウン実験等を実施し、ウエスタンブロッティングや PCR などの分子細胞生物学的手法を用いて小胞体ストレスシグナルとの関連性を検証した。また小胞体ストレスは炎症や低酸素応答など他のストレス応答を誘導することが知られていることから、同定した因子あるいはその関連分子が炎症など他のストレス応答にも関与するかについて検討した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスによって小胞体で作られるタンパク質の多くは翻訳抑制や折り畳み不全になりタンパク質分解を受けるが、小胞体ストレス時にむしろ翻訳が促進されるようなタンパク質も知られている。このようなタンパク質の中で細胞外に放出されるものが存在する可能性があった。そこで小胞体ストレス時に細胞外に放出される因子の探索として、サブシガルジンやツニカマイシンといった各種小胞体ストレス誘導剤を培養細胞に負荷し、培養上清を回収、変動する因子をプロテオーム解析にて探索した。その結果、小胞体ストレス依存的に細胞上清中に放出されるタンパク質群を見出した。これらのタンパク質群の中にはサブシガルジンあるいはツニカマイシン負荷で共通して放出されるタンパク質も複数存在した。さらに細胞種を変えると、細胞種間で共通して小胞体ストレス負荷により検出されるタンパク質あるいは細胞種依存的に検出されるタンパク質が存在した。

(2) 細胞種により放出されるタンパク質には違いがあったが、その中でも細胞種間で共通して小胞体ストレス負荷により放出されるタンパク質を ER stress indicator (ESI) と名付け、詳細な解析を行った。タンパク質検出として一般的に行われるウエスタンブロッティングでは抗ターゲット抗体の非特異的反応で検出が困難であったことから、ELISA 法による検出を試みた。その結果、小胞体ストレス依存的に ESI が細胞外に放出されることが確認された。この結果は、ESI の測定により、細胞を破壊することなく細胞内の小胞体ストレスのレベルを検出することが理論的に可能であることを示していた。さらに、この ESI の機能を調べるために、ESI リコンビナントタンパク質を細胞培養に添加する実験を行ったところ、興味深いことに炎症関連遺伝子の発現を強く誘導した。この結果は小胞体ストレスによって細胞外に放出された ESI が他の細胞の炎症応答を誘導する可能性を示していた。このことは、本研究において同定した ESI が新規の damage associated molecular patterns (DAMPs) として機能していることを示していた(右図)。結果をまとめると、小胞体ストレス依存的に細胞外に放出される ESI は小胞体ストレスのインディケーターになると共に新規の炎症誘導物質としても機能することが示唆された。



(3) 以上のように小胞体ストレス依存的に細胞外に放出される因子の同定により、非破壊的に小胞体ストレス状態を測定する技術の確立に近づいた。この技術の応用による小胞体ストレス関連疾患に対する新規予測診断法の確立は、内分泌、骨軟骨代謝疾患、神経を含む難病の予防あるいは早期治療への応用に発展していくことが期待される。さらに、今回同定した因子は新規の炎症誘導物質としても機能することから、小胞体ストレスインディケーターとしての役目だけでなく疾患自体との関連性も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami T, Ruengsinpinya L, Nakamura E, Takahata Y, Hata K, Okae H, Taniguchi S, Takahashi M, Nishimura R.	4. 巻 202
2. 論文標題 G Protein Subunit 1 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1942-1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801388	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 Kida Jumpei, Hata Kenji, Nakamura Eriko, Yagi Hiroko, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Maeda Yoshinobu, Nishimura Riko	4. 巻 8
2. 論文標題 Interaction of LEF1 with TAZ is necessary for the osteoblastogenic activity of Wnt3a	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-28711-4	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 村上智彦	4. 巻 32
2. 論文標題 小胞体ストレスセンサーOASISによる骨形成制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nishimura Riko, Hata Kenji, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Nakamura Eriko, Ohkawa Maki, Ruengsinpinya Lerdluck	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of Signal Transduction Pathways and Transcription Factors in Cartilage and Joint Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1340 ~ 1340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041340	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高畑佳史、中村恵理子、波多賢二、若林真、村上智彦、若森幹太、吉川浩史、松田昭生、福井尚志、西村理行
2. 発表標題 転写因子Sox4 はADAMTS4 およびADAMTS5 の発現を誘導して変形性関節症の発症に関与する
3. 学会等名 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上智彦、Lerdluck Ruengsinpinya、中村恵理子、高畑佳史、波多賢二、西村理行
2. 発表標題 Gタンパク質サブユニットbeta 1はNLRP3インフラマソームを負に制御する
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murakami T
2. 発表標題 ER stress and bone metabolism
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会 日韓シンポジウム（招待講演）（国際学会）
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
研究協力者	西村 理行	大阪大学・歯学研究科・教授	
	(Nishimura Riko)		
	(60294112)	(14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	波多 賢二 (Hata Kenji) (80444496)	大阪大学・歯学研究科・准教授 (14401)	
研究協力者	高畑 佳史 (Takahata Yoshi fumi) (60635845)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	