

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06552

研究課題名(和文)疾患モデル動物を活用した凝集タンパク質の形成機構とその抑制因子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of aggregated and de-aggregated proteins utilizing animal models of disease

研究代表者

伊原 伸治 (Ihara, Shinji)

県立広島大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70373272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：凝集タンパク質が減少するサブプレッサースクリーニングによって樹立したERdj-5の局在の観察を行い、ERdj-5が小胞体ストレスに応じて、咽頭、体壁筋肉、腸で強い発現が誘導されることを明らかにした。またサブプレッサー変異により凝集タンパク質の過剰なジスルフィド結合が謙虚に減少することが明らかになった。さらに凝集タンパク質に対して、ERdj-5の応答性を調べた結果、ERdj-5はこれらの凝集タンパク質に応答して、その発現が増強すること、さらに凝集タンパク質に組み込まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞ストレスを引き起こす外的要因(紫外線、活性酸素等)は、凝集タンパク質の形成を誘導する事から、神経変性疾患の発症に関与している。神経変性疾患の発症原因の探索、その病態の軽減は、健全な高齢化社会の実現のために喫緊の研究課題である。小胞体ジスルフィド還元酵素ERdj-5は、その凝集タンパク質で過剰に形成されるジスルフィド結合を開裂させる酵素であり、その細胞ストレス応答性やストレスに対する局在変動、凝集タンパク質に対する基質特異性を明らかにしたことは、神経変性疾患の主要因である凝集タンパク質の解消につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Localization patterns of ERdj-5, which is isolated by EMS suppressor screening, show that ERdj-5 is induced to be strongly expressed in the pharynx, body wall muscle, and intestine in response to ER stress. It was also found that suppressor mutations reduced excessive disulfide bonds in aggregating proteins. To address responsibility of ERdj-5 to aggregating proteins, we observed ERdj-5 localization pattern in aggregated proteins within ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：モデル生物 凝集タンパク質 小胞体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のミスフォールディングと分泌障害に起因する病態は、これまでに多数例が同定されており、例えば先天性甲状腺腫では、サイログロブリンの変異タンパク質が小胞体内に滞留することで甲状腺ホルモン低下が観察され、甲状腺腫を引き起こす(Kim, PS. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 1996)。また多発性骨髄腫では、抗体産生細胞からの免疫グロブリンの異常産生により、小胞体の肥大化が促進される。さらに凝集タンパク質が、アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などの原因であることも広く知られている。これまでに申請者は分泌タンパク質が小胞体内腔に蓄積する変異体の解析から、糖脂質 GPI アンカーの修飾酵素 PIGN の新規な機能を同定している。ヒト *pigN* の遺伝子変異は精神遅滞、てんかん、眼振、顔貌の異常等を示す重篤な遺伝子疾患である Multiple Congenital Anomalies-Hypotonia-Seizures syndrome type 1(MCAHS-1 症候群)を引き起こすことが知られている(Maydan, G. J. *et al.*, *J. Med. Genet.*, 2011)。PIGN は、GPI アンカーの基本骨格のマンノースにエタノールアミンを転移する修飾酵素の働きをもつ。申請者は線虫 *C. elegans* とヒト培養細胞を用いて、2017年に PIGN には GPI アンカーの修飾機能のみならず、小胞体でタンパク質のフォールディングに関わる未知の機能が存在することを報告したが (Ihara, S. *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2017)、その詳細な機能は未同定である。申請課題では、凝集タンパク質の形成を抑制する PIGN の非古典的機能を明らかにして、その作用機序を同定する。さらに昨年までに、この凝集タンパク質が観察される *pigN* 変異体を利用して、凝集タンパク質を抑制する Suppressor of Aggregated Protein(*spa*)変異体を 3 系統樹立した。この凝集タンパク質を抑制する *spa* 変異体の解析により、凝集タンパク質を解きほぐす分子機構を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、凝集タンパク質の形成とその凝集を解きほぐす分子基盤を明らかにすることが目的である。凝集タンパク質は機能が失われた状態のみならず、凝集タンパク質そのものが細胞にとって有害であり、様々な神経変性疾患の発症に関わっている。申請者は、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて分泌タンパク質が小胞体内腔に特異的に凝集する *pigN* 変異体を樹立した。その原因遺伝子として糖脂質 GPI アンカーの修飾酵素 PIGN を同定した(Ihara, S. *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2017)。ヒト *pigN* 遺伝子の変異は、厚生労働省より指定難病 320 と定められており、精神遅滞や特異な顔貌などの様々な症状を示し、幼年期に死亡する事が報告されている。申請課題では、サプレッサースクリーニングによって同定した還元酵素が、どのようにして凝集タンパク質を解きほぐすのか、その分子機構を明らかにする。その研究成果は、*pigN* 遺伝子変異による遺伝子疾患の理解のみならず、凝集タンパク質が関与する神経変性疾患の治療法の糸口となる成果が期待できる。

3. 研究の方法

1. native PAGE を用いて、変異アミノ酸をもつ変異型 ERdj-5 が凝集タンパク質の過剰なジスルフィド結合を開裂させているのか、明らかにする。
2. CRISPR-Cas9 システムを立ちあげ、野生型線虫に同定している変異型 ERdj-5 と同じアミノ酸変異を導入する。この導入した変異型 ERdj-5 が、サプレッサースクリーニングで同定した変異体と同様に凝集タンパク質を抑制するのか、明らかにする。変異型 ERdj-5 は優

生変異なので、レスキュー実験の代わりに染色体に同様の変異を作り出し、同じ作用を示すのか明らかにすることによって、真に変異型 ERdj-5 が凝集タンパク質を抑制させているのか、その証明を行う。

3. 凝集タンパク質の割合は、凝集タンパク質を形成する分泌タンパク質に融合させた蛍光タンパク質の蛍光輝度をもちいて定量化を行っている。この蛍光輝度をもちいて、変異型 ERdj-5 が野生型 ERdj-5 に較べて、どの程度の凝集タンパク質への抑制効果をもつのか、定量化を行う。
4. ERdj-5 は小胞体の内腔に局在する酵素であることがわかっている。蛍光タンパク質を融合させた野生型 ERdj-5、変異型 ERdj-5 を作成して、小胞体での局在様式を明らかにする。野生型 ERdj-5 と変異型 ERdj-5 の局在が異なれば、その局在こそが酵素活性に重要であると推定されるので、ERdj-5 の各ドメインの欠損変異体を作成して、局在決定に必要な機能ドメインを明らかにする。

4. 研究成果

これまでにサプレッサースクリーニングにより、凝集タンパク質が観察される *pign-1* 変異体をもちいて、凝集タンパク質が減少するサプレッサースクリーニングによって樹立した *Suppresser of Protein Aggregates (spa-1)* 変異体の変異遺伝子を同定している。その変異体の一つは小胞体内腔に局在するジスルフィド結合を還元する酵素活性をもつ **ER-localized DnaJ (ERdj) family** に属する ERdj5 が原因遺伝子であることが明らかになっている。

Native PAGE を用いて、変異型 ERdj-5 が *pign-1* 変異体で形成される凝集タンパク質の過剰なジスルフィド結合を開裂させているのか、その検討を行った。その結果、*pign-1* 変異体では過剰なジスルフィド結合が観察されたが、サプレッサー変異をもつ *pign-1* 変異体では、その過剰なジスルフィド結合が形成されないことが明らかになった。

次に内在性の ERdj-5 を可視化するために、CRISPR-Cas9 システムを立ちあげ、ERdj-5 の可視化をおこなった。その結果を図1で示す。

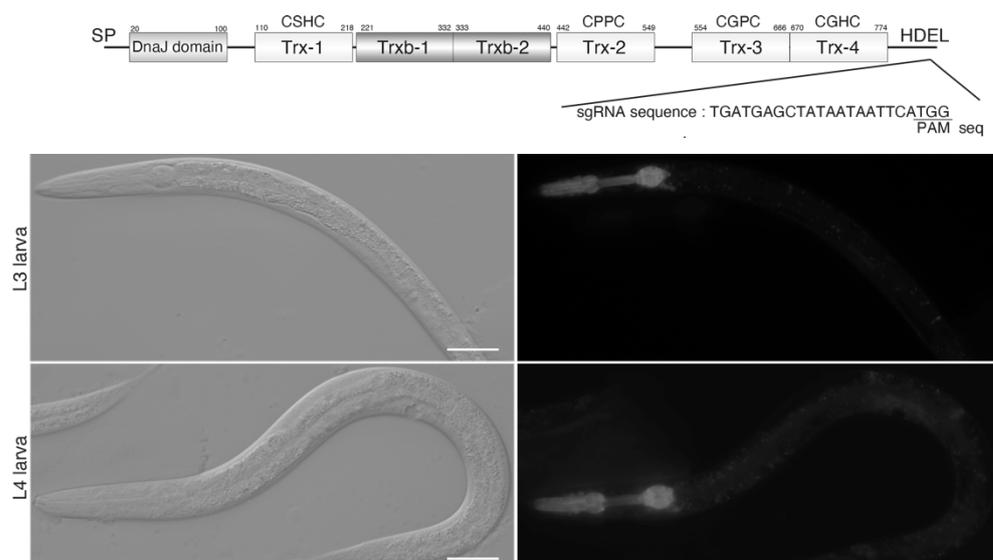


図1 上段 ゲノム編集にもちいた sgRNA 配列を示す。小胞体局在シグナルである KEDL 配列の直前に蛍光タンパク質を導入した。下段 内在性 ERdj-5 は、咽頭筋で強く発現しており、体壁筋肉では弱く発現している。

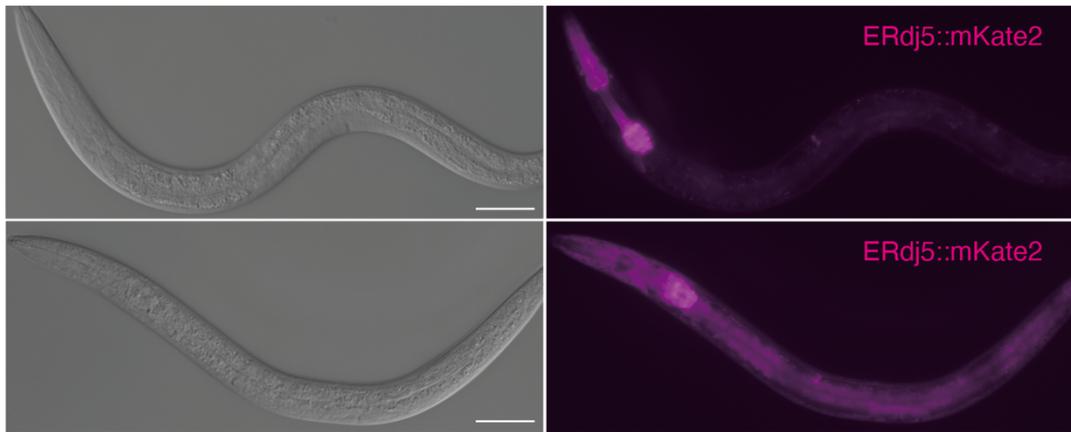


図2 上段 小胞体ストレス前の ERdj-5 の局在。下段 小胞体ストレス後の ERdj-5 の局在 ERdj-5 は、小胞体ストレスに暴露後、咽頭、体壁筋肉、腸で強い発現が観察された。

次に小胞体ストレスを誘導する薬剤を用いて、内在性 ERdj-5 の小胞体ストレスへの応答性を明らかにした(図2)。ERdj-5 は、小胞体ストレスに応じて、咽頭、体壁筋肉、腸で強い発現誘導が観察され、細胞内で小胞体に局在することが明らかになった。

可視化した野生型凝集タンパク質への ERdj-5 がどのように応答するのか、明らかにするために、小胞体内腔で人為的に凝集タンパク質を形成する発現株を構築した。そのストレインは小胞体内腔のシャペロン分子、BiP タンパク質 の ATP 結合部位、ATP 分解部位、変性タンパク質への結合部位のアミノ酸配列に変異を導入したものであるが、いずれの発現株も効率的に凝集タンパク質を観察することができた。この凝集タンパク質に対して、可視化した野生型 ERdj-5 の応答性を調べた結果、ERdj-5 はこれらの凝集タンパク質に応答して、その発現が増強すること、さらに凝集タンパク質に組み込まれることを明らかにした。その結果を図2で示す。

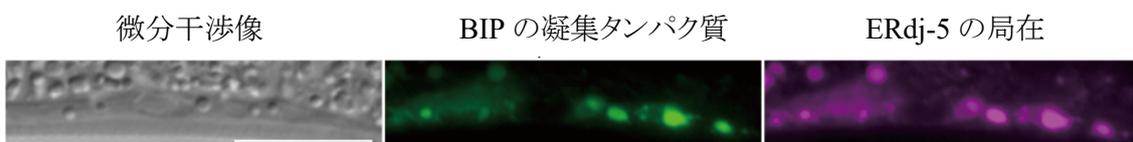


図3 BiP による凝集タンパク質の誘導は、ERdj-5 の発現を誘導する。発現した ERdj-5 は凝集タンパク質内に取り込まれる。

さらに、凝集タンパク質だけでなく、熱ストレスにも ERdj-5 が応答することが明らかになった。現在、この可視化 ERdj-5 に、サプレッサースクリーニングで同定した遺伝子変異を CRISPR-Cas9 法により導入を試みている。CRISPR-Cas9 法で作成したサプレッサー変異と同じ遺伝子変異はすでに凝集タンパク質を抑制することがあきらかになっているので、この凝集タンパク質を抑制する変異型 ERdj-5 の局在を明らかにすることで、どのように凝集タンパク質にアクセスするのか、その動態が明らかになることが期待できる。内在性 ERdj-5 の可視化とストレス応答性については、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Shinji Ihara	4. 巻 1
2. 論文標題 N-terminally endogenous mKate2-tagged HIM-4 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000386.	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 Tetsuya Narimatsu and Shinji Ihara	4. 巻 1
2. 論文標題 New allele of <i>C. elegans</i> gene <i>pign-1</i> , named as <i>xyz11</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000088	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 Kanae Matsuo, Akihiro Koga and Shinji Ihara	4. 巻 1
2. 論文標題 Visualization of endogenous NID-1 and EMB-9 in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17912/micropub.biology.000110.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成松哲也, 伊原伸治
2. 発表標題 変異型ERdj5による凝集タンパク質の抑制機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------