

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2023
課題番号：20K06391
研究課題名(和文) 新規小胞体ストレス発光プローブを用いた抗小胞体ストレス薬の開発及びその応用研究

研究課題名(英文) Drug discovery against ER stress by using a novel luminescence probe sensing ER environments

研究代表者
守村 敏史 (Morimura, Toshifumi)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授

研究者番号：20333338
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)：小胞体内ミスフォールドタンパク質の蓄積は広範な疾患の病態に関与している。本研究で、ホタルルシフェラーゼ (FL) は小胞体内でミスフォールド化し小胞体内に蓄積する事を見出した。小胞体内FL活性は、N型糖鎖付加阻害剤のツニカマイシン、カルシウムポンプ阻害剤のタブシガルジン、還元剤のジチオトレイトールによる立体構造の変化により亢進した。食品成分から小胞体内FL活性を亢進する成分を検索し、apigeninとdiosmetinを同定した。両薬剤とも小胞体に蓄積したFLの分泌を促進し、diosmetinは疾患関連小胞体ミスフォールドタンパク質の小胞体からの移動を亢進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体内のミスフォールドタンパク質の蓄積が関与する疾患は、遺伝性疾患から生活習慣病に至るまで幅広く、ミスフォールドを改善する化合物の検索は医療上重要な位置を占めている。本研究より、感度が高く定量性に優れた小胞体内のホタルルシフェラーゼが、小胞体内のミスフォールドタンパク質の構造を改善する化合物の検索に有効である事が示され、これまでに見出せなかった抗小胞体ストレス化合物の発見につながる事が期待できる。今回候補薬として同定されたdiosmetinは、細胞質のミスフォールドタンパク質に対する構造改善化合物としても報告されており、小胞体ストレスが関与する疾患への治療応用に期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) is involved in numerous disorders. I demonstrate that firefly luciferase (FL) fused with an ER penetration signal is misfolded and accumulates in the ER, evoking ER stress. FL activity in the ER was increased by the N-glycosylation inhibitor tunicamycin, in a site dependent manner. The ER calcium pump inhibitor thapsigargin and reductant dithiothreitol, both known disrupters of ER protein folding, also enhanced luminal FL activity in the absence of newly translation. Screening of dietary ingredients uncovered that several flavones including apigenin and diosmetin were able to induce luminal FL activity. These compounds enhanced extracellular release of luminal FL, and diosmetin significantly increased ER exit of a disease-associated misfolded membrane protein from the ER. These results indicate that luminal FL can be utilized to identify compounds that can improve the conformation of luminal misfolded proteins.

研究分野：神経科学

キーワード：ホタルルシフェラーゼ 小胞体 ミスフォールドタンパク質 diosmetin

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、膜タンパク質・分泌タンパク質の産生の場合であると併に、細胞内カルシウムストアや脂質代謝器官としての機能を有する。小胞体内環境の悪化やアミノ酸変位に伴うに折り畳み不全なタンパク質の小胞体内における蓄積は、いわゆる小胞体ストレスを惹起し、家族性・孤発性を問わず多くの疾患の病理発症に深く関与している。小胞体内環境は小胞体ストレスにより、小胞体外で活性化するシグナルカスケードの変化や核での標的遺伝子の発現変動により評価されてきた。ストレス応答による指標は、評価系はあくまで細胞質や核で起きる細胞応答の結果であり、検出結果は二次応答（例えば過剰応答に対する抑制反応）以降を含め全ての反応を平均化した評価系である事、小胞体ストレスが閾値を超えた場合細胞が正常に反応できない可能性がある事、などの理由から細胞の状態をリアルタイムに評価する事は難しい。この問題を解決する目的で、私は小胞体内のミスフォールドタンパク質（基質）それ自体をプローブとして用い、小胞体内部よりミスフォールドタンパク質の蓄積の定量化を試みた。

ホタルルシフェラーゼは発現に伴うタンパク質量を発光という形で定量化でき、検出感度が極めて高い。私はホタルルシフェラーゼに分泌のためのシグナルペプチドを融合しても細胞外にほとんど分泌されずに、小胞体内にミスフォールド化して蓄積することに気がついた(図1)。小胞体内に細胞毒性を示さない程度の微量なホタルルシフェラーゼを発現させ発光の強度をモニターすれば、小胞体内のミスフォールドタンパク質の量を反映できるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の4点である。1) 小胞体内のホタルルシフェラーゼの性状を明らかにする、2) 薬剤により小胞体ストレスを誘導し、小胞体内にミスフォールドタンパク質を蓄積させた際の小胞体内ホタルルシフェラーゼの活性を解明する、3) 小胞体内のホタルルシフェラーゼの活性に影響を及ぼす天然化合物を食品成分から検索する、4) 同定した化合物の効果を培養細胞を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 小胞体内に強制発現させた各種ルシフェラーゼの性状解析

マウス免疫グロブリン軽鎖のシグナルペプチド及びHAタグに融合した各種ルシフェラーゼ遺伝子を一過性にHeLa細胞に導入し、培養上清中への分泌効率、Western blotによるタンパク質発現及び小胞体ストレスに伴う下流遺伝子の発現誘導を比較した。

(2) 小胞体ストレス試薬に対する小胞体ホタルルシフェラーゼの応答

Igシグナル配列融合ホタルルシフェラーゼ及び細胞質・核に局在する非融合野生型ホタルルシフェラーゼをHeLa細胞に一過性に導入し、代表的な3つの小胞体ストレス誘導試薬、ツニカマイシン、タブシガルジン及びジチオトレイトールのルシフェラーゼ活性に対する影響を解析した。内部標準としては、小胞体型ナノルシフェラーゼ及び細胞質や核に局在する野生型ナノルシフェラーゼを用いた。ホタルルシフェラーゼは一箇所N型糖鎖が付加されるアスパラギン残基を含んでいることから、ツニカマイシンによるN型糖鎖付加阻害効果を直接受けないN197Q変異体に対するツニカマイシンの効果についても解析した。また、小胞体ストレス下の細胞は著しい翻訳抑制が引き起こされることから、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で、タブシガルジン及びジチオトレイトールのホタルルシフェラーゼ活性に対する影響も検討した。

(3) N型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼの活性に影響を及ぼす食品成分の検索

安全性の高い食品成分由来の化合物およそ140種から、N型糖鎖欠損小胞体内N197Qホタルルシフェラーゼの活性に影響を及ぼすが、細胞質・核に局在するN197Q変異体の活性に影響がない成分のスクリーニングを行った。内部標準は、(2)と同様に小胞体または細胞質・核型ナノルシフェラーゼを用い、刺激は20 μ Mの濃度で2時間行い、ナノルシフェラーゼ活性で補正した値が非刺激細胞の1.5倍以上亢進を示した化合物を抽出した。ヒット化合物については、小胞体N197Qホタルルシフェラーゼ活性に対する濃度依存性、翻訳阻害剤存在下での効果、分泌効果について検証した。

(4) 小胞体内ミスフォールドタンパク質 MPZdel506T に対するヒット化合物の細胞膜輸送効果

ヒット化合物について、ホタルルシフェラーゼ以外の小胞体ミスフォールドタンパク質の細胞局在に及ぼす影響の解析を目的に、小胞体ストレスに起因するCharcot-Marrie-Tooth病の原因タンパク質Myelin Protein Zero del 506T(MPZdel506T)の細胞膜への輸送促進効果により検証した。FLAGペプチド融合MPZdel 506T-FLAG発現HeLa細胞は、10 μ Mのヒット化合物で4時間処理し、細胞膜タンパク質のビオチン化を行った。次いでアビジンビーズで細胞膜タンパク質精製し、総タンパク質及び膜表面タンパク質それぞれの画分について抗FLAG抗体を用いたWestern blotにより発現解析を行った。バンドの強度はデンシトメトリー解析により定量化し、MPZdel

506T-FLAG の総タンパク質量に対するビオチン化タンパク質量の比で評価した。

4. 研究成果

(1) Ig 融合ホタルルシフェラーゼは小胞体内に蓄積し小胞体ストレスを誘導する。小胞体内への侵入のためのシグナル配列と HA ペプチドに融合した分泌型ホタルルシフェラーゼ (IgHA-FL)、ウミシイタケルシフェラーゼ (IgHA-RL)、ナノルシフェラーゼ (IgHA-NL) を HeLa 細胞に強制発現させ、培養上清への分泌効率やタンパク質発現について解析した。その結果、IgHA-RL や IgHA-NL と比べ、IgHA-FL は、分泌効率が著しく低いことが明らかとなった (図 1 A, 1C)。IgHA-FL の培養上清のホタルルシフェラーゼ活性は、小胞体から Golgi 体への輸送阻害剤であるブレフェルジン A (BrefA) の処理によりさらに低下したことから、極めて微量の IgHA-FL は分泌されていることが明らかとなった (図 1 B)。細胞染色から、IgHA-FL は小胞体マーカータンパク質である GRP78 と局在が一致し (図 1 D)、IgHA-FL 発現 HeLa 細胞では、小胞体ストレスにより誘導される各種遺伝子発現が亢進していた (図 1 E)。

以上の結果より、ホタルルシフェラーゼは小胞体内でミスフォールド化する為に分泌が阻害されることが明らかとなった。

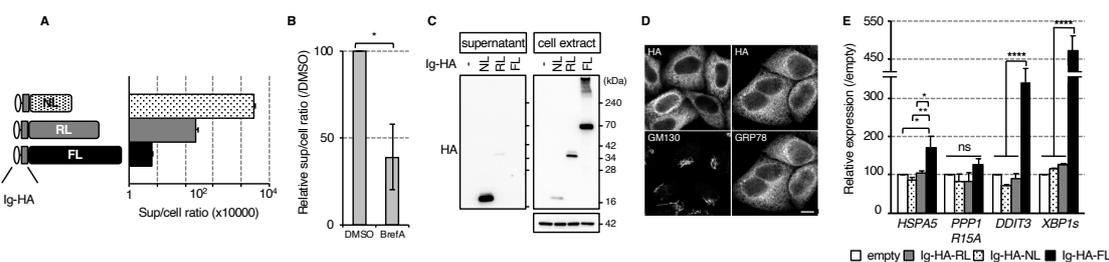


図 1. Ig 融合ルシフェラーゼの性状解析

- (A) Ig 融合各種ルシフェラーゼの分泌効率 (B)ブレフェルジン A 存在下の IgHA-FL の分泌効率比活性は細胞内のルシフェラーゼ活性に対する培養上清中の活性の比で示している (C)培養上清と細胞における各種ルシフェラーゼの Western blot 解析 (D) IgHA-FL の細胞局在 (スケールは 10 μ m) (E) IgHA-FL による小胞体ストレスの誘導
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant ($p > 0.05$)

(2) 小胞体内のホタルルシフェラーゼ活性は小胞体タンパク質の立体構造阻害剤により亢進する。

N 型糖鎖付加阻害剤や小胞体膜上のカルシウムポンプ阻害剤、還元剤は小胞体タンパク質構造変化をきたす事により小胞体ストレスを惹起する。これらの化合物の小胞体型及び細胞質・核に局在する野生型ルシフェラーゼに対する影響を解析した。それぞれのホタルルシフェラーゼ活性は、小胞体型ナノルシフェラーゼまたは野生型の細胞質や核に局在するナノルシフェラーゼ活性を内部標準として補正した上で、DMSO 刺激細胞に対する相対値として評価した。N 型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンは、薬剤添加 4 時間後から小胞体型ホタルルシフェラーゼ活性を経時的に増加させたが、このような変化は細胞質・核型ホタルルシフェラーゼでは観察されなかった (図 2A)。一方、カルシウムポンプ阻害剤であるタプシガルジンや還元剤のジチオトレイトール処理細胞では、添加直後から小胞体型ホタルルシフェラーゼ活性の上昇を誘導した。ジチオトレイトール処理細胞では、添加 4 時間以上経過すると細胞質・核局在型ホタルルシフェラーゼの活性も優位に亢進した (図 2C, D)。タプシガルジンやジチオトレイトールによる小胞体内のホタルルシフェラーゼの活性亢進は、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド存在化でも起こることから、これら化合物による小胞体内ホタルルシフェラーゼの構造変化により活性が回復したことが示唆された (図 2E, F)

(3) N 型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼ活性はツニカマイシン刺激により低下する。小胞体内のホタルルシフェラーゼの構造変化を伴わずに小胞体ストレスが惹起された際のルシフェラーゼ活性の変化を解析する為、ホタルルシフェラーゼに一箇所存在する N 型糖鎖付加の標的アスパラギン残基をグルタミンに置換した N197Q 変異体に対するツニカマイシンの効果を解析した。その結果、小胞体内の野生型ホタルルシフェラーゼの応答 (図 2A) とは逆に、小胞体内 N197Q ホタルルシフェラーゼ活性は低下することが示された (図 2B)。同様の変化は、小胞体内にホタルルシフェラーゼを発現させた細胞を、ブレフェルジン A で処理した際にも観察された (結果は示さず)。ブレフェルジン A は小胞体から Golgi 体への輸送を阻害することにより小胞体ストレスを誘導し、ツニカマイシン、タプシガルジン及びジチオトレイトールとは異なり、翻訳直後または成熟小胞体タンパク質の構造変化には影響がない。

以上 (2) (3) の結果を総括して、小胞体内ですでにミスフォールド化しているホタルルシフェラーゼはその構造変化をきたす化合物に対しては活性化する一方、立体構造の変化を伴わない小胞体ストレス誘導化合物に対しては活性低下をする事が示唆された。

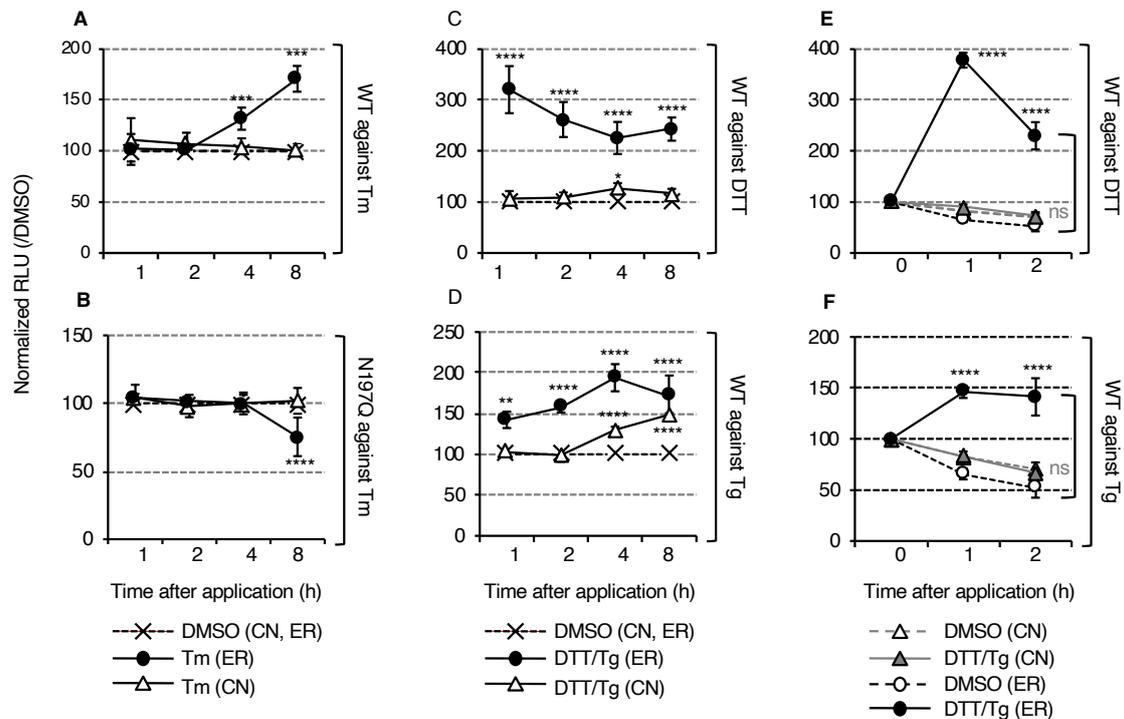


図2. 小胞体内ホタルルシフェラーゼの小胞体ストレス誘導薬に対する応答 (A-D)細胞質・核に局在する野生型ホタルルシフェラーゼと野生型ナノルシフェラーゼ (△) 及び Ig 融合ルシフェラーゼと小胞体型ナノルシフェラーゼ (●) を導入した HeLa 細胞を、ツニカマイシン (Tm, 1 μM) (A)、タブシガルジン (Tg, 125 nM) (C)、ジチオトレイトール (DTT, 1 mM) (D) で 8 時間処理し、ナノルシフェラーゼ活性で補正したホタルルシフェラーゼ活性を、非刺激細胞 (×) の相対活性値として示した。ツニカマイシンに対する反応は、N 型糖鎖欠損ホタルルシフェラーゼについても解析した (B)。(E-F)小胞体ストレスに伴う翻訳阻害の影響を除外する目的で、レポーター遺伝子導入細胞は翻訳阻害剤存在下でタブシガルジン (E) 及びジチオトレイトール (F) により刺激した。三角印は細胞質・核の、丸印は小胞体内の刺激前の活性に対する相対活性値の変化を示した。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant ($p > 0.05$)

(4) N 型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼ活性を亢進する食品成分の検索

小胞体内のホタルルシフェラーゼは、小胞体内タンパク質の構造に影響を及ぼす化合物の検出が可能なプローブである事が示唆された。安全性の高い食品成分からそのような化合物のスクリーニングを目的に、N 型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼ活性に対する食品成分およそ 140 種の効果の検証を行った。その結果、ポリフェノールに属す共通のベンゼン環骨格を持つ 6 種のフラボンがヒットした。特に効果の強い apigenin、diosmetin、luteolin について再解析を行い、apigenin と diosmetin で強い活性亢進効果が確認された (図 3A)。

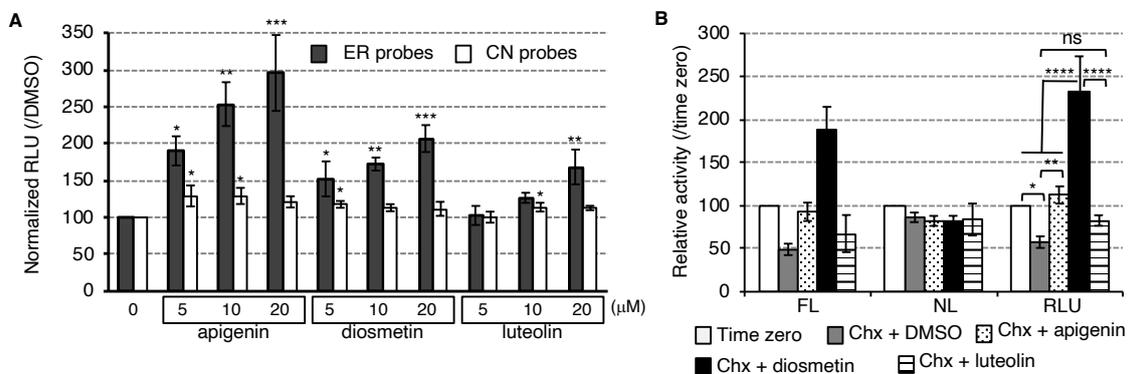


図3. apigenin、diosmetin、luteolin は、N 型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼの活性を亢進する (A)レポーター遺伝子発現 HeLa 細胞は、5-20 μM の各フラボンで 2 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。グレーカラムは小胞体内、ホワイトカラムは細胞質及び核内の N197Q ホタルルシフェラーゼ活性を内部標準で補正し、非刺激細胞との相対値として示している。(B) N 型糖鎖欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼ導入細胞は、シクロヘキシミド存在下各フラボンで 2 時間刺激し、ホタルルシフェラーゼ (FL)、内部標準の小胞体型ナノルシフェラーゼ (NL)、及びその補正值 (RLU) を刺激前のサンプルに対する相対値として示している。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant ($p > 0.05$)

5) フラボンによる N 型糖鎖付加欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼの分泌亢進効果

特に apigenin と diosmetin は翻訳阻害剤存在下でも有意に小胞体内ホタルルシフェラーゼの活性を亢進することから (図 3B)、これら化合物は小胞体内でミスフォールド化したホタルルシフェラーゼをリフォールドする活性があると推測した。そこで、小胞体内 N197Q ホタルルシフェラーゼ発現細胞を $10\mu\text{M}$ の各フラボンで 4 時間処理し、培養上清と発現細胞のルシフェラーゼ活性及びタンパク質量の解析を行った。予想通り、3 種のフラボン処理細胞の培養上清中のホタルルシフェラーゼ活性の上昇傾向が観察され (図 4A)、培養上清中への分泌亢進は Western blot により確認された (図 4B)。培養上清中のホタルルシフェラーゼ活性の上昇はブレフェルジン A (BrefA) 処理により消失することから (図 4A)、小胞体内 N197Q ホタルルシフェラーゼの分泌亢進は、小胞体から Golgi 体を経由した経路を介していることが明らかとなった。

(6) diosmetin による PMZdel1506T の小胞体から細胞膜へ輸送効果

フラボンのミスフォールドタンパク質の小胞体からの輸送効果を検証する目的で、1ヌクレオチド欠失によりフレームシフト型の変異を起こし小胞体内でミスフォールド化する myelin protein zero del 506T (MPZdel1506T) の細胞表面への輸送促進効果について検証した。その結果、細胞で発現する FLAG タグ融合 MPZdel1506T 総量に対する細胞膜上のポプレーションは、いずれのフラボンを処理した細胞でも増加傾向にあり、diosmetin 処理細胞では有意差を持って亢進することが明らかとなった (図 4D)。

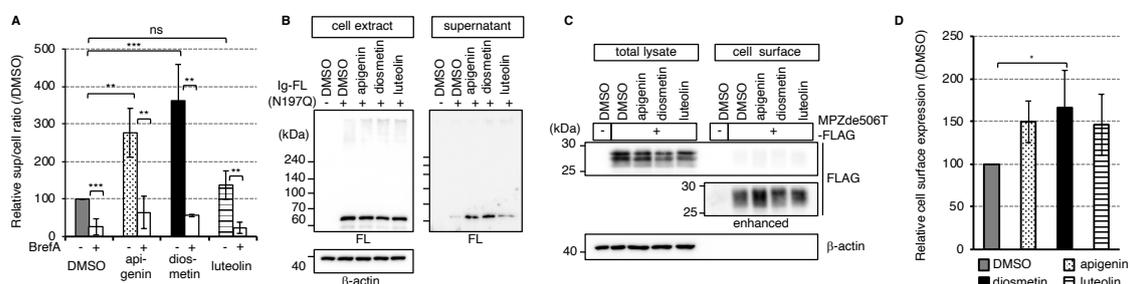


図 4. 各フラボンの小胞体内ミスフォールドタンパク質に対する効果

(A-B) N 型糖鎖付加欠損小胞体内ホタルルシフェラーゼ発現細胞を $10\mu\text{M}$ の各フラボンで 4 時間処理し、培養上清中への分泌効果をレポーターアッセイ (A) 及び Western blot (B) により解析した。

(C-D) MPZdel1506T-FLAG 遺伝子を強制発現させた HeLa 細胞の、細胞膜上に輸送された MPZdel1506T-FLAG の発現総量に対する割合を Western blot 及びデンシトメトリーにより解析した。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant ($p > 0.05$)

本研究の遂行中に、別のグループより apigenin や diosmetin は、化学シャペロン活性、すなわちミスフォールドタンパク質の構造を改善する活性、を有する化合物である事が報告された。ホタルルシフェラーゼや MPZdel1506T も小胞体内でミスフォールド化することから、シャペロン活性によりリフォールド化され小胞体外への輸送が亢進したものと推測された、当初、小胞体内のホタルルシフェラーゼは小胞体内のミスフォールドタンパク質量をモニターできるものと考えたが、小胞体ストレス試薬に対する活性上昇は、ミスフォールド化したルシフェラーゼがリフォールドされた結果を反映し、化学シャペロンのスクリーニングに利用可能である事が示唆された。小胞体内ルシフェラーゼがどの程度広範にシャペロン活性を持つ化合物のスクリーニングをカバーできるかという点は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Asada-Utsugi M, Uemura K, Ayaki T, T Uemura M, Minamiyama S, Hikiami R, Morimura T, Shodai A, Ueki T, Takahashi R, Kinoshita A, Urushitani M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Failure of DNA double-strand break repair by tau mediates Alzheimer's disease pathology in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communication Biology	6. 最初と最後の頁 348-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03312-0.	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 Hikiami R, Morimura T, Ayaki T, Tsukiyama T, Morimura N, Kusui M, Wada H, Minamiyama S, Shodai A, Asada-Utsugi M, Muramatsu SI, Ueki T, Takahashi R, Urushitani M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Conformational change of RNA-helicase DHX30 by ALS/FTD-linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16030-16046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20405-2.	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 Wada H, Hikiami R, Kusui M, Minamiyama S, Asada-Utsugi M, Shodai A, Muramatsu SI, Morimura T, Urushitani M.	4. 巻 193
2. 論文標題 In vivo analysis of aggregation propensity of low levels of mislocalized TDP-43 on cytopathological and behavioral phenotype of ALS/FTLD	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 41-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2023.02.006.	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 Buyandelger U, Walker DG, Yanagisawa D, Morimura T, Tooyama I.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of FTMT Expression by Retinal Pigment Epithelial Cells on Features of Angiogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 3635-3653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103635	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0件

〔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	漆谷 真 (Urushitani Makoto) (60332326)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

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
---------	---------