

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21751

研究課題名(和文) 脳老化に関わる小胞体選択的オートファジー基質の探索と神経老化制御への応用

研究課題名(英文) Exploration of ER-phagy substrates involved in brain aging and its application to the control of neuronal senescence

研究代表者

大橋 憲太郎 (Oh-hashii, Kentaro)

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、小胞体制御機構能1つである小胞体オートファジー(ER-phagy)に着目した。とりわけ、ER-phagy受容体の1つで、遺伝性の感覚神経異常に関わるFAM134Bに着目した。まずはじめに、種々の栄養欠乏条件下における内因性FAM134Bタンパク質の変化を解析し、血清・アミノ酸欠乏により著しく低下することを明らかにした。次に、ゲノム編集技術によりFAM134B欠損Neuro2a細胞を樹立し、野生型およびHSAN2B変異型FAM134Bなどを遺伝子導入・解析することで、それらの差異を明らかにした。今回得られた知見は小胞体を標的とした新たな薬剤及び指標の開発に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ER-phagy受容体の1つFAM134Bタンパク質の発現制御および変異FAM134BがER-phagyに及ぼす影響について検討を行った。とりわけ、本研究において樹立したFAM134B欠損細胞株をはじめとする小胞体制御因子欠損細胞株や生細胞にてER-phagy解析が検討可能なNanoBiT reporterシステムは、今後の詳細な解析や薬剤開発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 investigated ER-autophagy (ER-phagy), one of the ER regulatory mechanisms. In particular, we focused on FAM134B, one of the ER-phagy receptors, which is involved in hereditary sensory nerve abnormalities. First, we analyzed endogenous FAM134B protein expression under various nutritional deficiency conditions and found that the protein was significantly decreased by serum and amino acid deprivation. Next, we established FAM134B-deficient Neuro2a cells by genome editing technology, and transfected wild-type and HSAN2B-linked FAM134B into the cells and characterized their features. These findings are expected to lead to the development of new drugs targeting the ER.

研究分野：細胞分子生物学、健康科学

キーワード：ER-phagy ER stress ERAD Golgi stress FAM134B

1. 研究開始当初の背景

現在我が国は、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・運動器官などの多くの疾患を抱える高齢者の増大が予想される。今後、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。

神経変性疾患を含めた多くの疾患の発症・進行には、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常が伴うことが明らかとなっている。その中で、小胞体は細胞が産生するタンパク質の約 1/3 の合成・折りたたみ・修飾に関わるオルガネラであり、その異常は小胞体ストレスシグナルの活性化を引き起こす。この小胞体の恒常性維持の機構には、ユビキチン - プロテアソーム系に依存する小胞体関連分解とリソソーム系による小胞体オートファジー (ER-phagy) が知られている。前者では、複数の小胞体局在性ユビキチンリガーゼが同定され、その基質との関連が複数報告されている。一方で、ER-phagy は未だ未解明な部分が多く残されていることから、その分子機構や基質特異性の解明が必要とされている。

2. 研究の目的

自食作用ともいわれるオートファジーは、飢餓時などに細胞内の不要なものを分解し、新規分子の合成へとつながる重要な経路である。選択性が低いと考えられてきたこのオートファジーは、オルガネラの分解にも関わることが明らかとなってきており、小胞体恒常性においても一役を担うことが明らかとなってきている。しかしながら、その詳細な分子制御や小胞体オートファジー (ER-phagy) により分解されるタンパク質群および疾患との関連は十分に解明されていない。そこで、本研究ではゲノム編集技術をはじめとする分子生物学的手法を用いることにより、ER-phagy 機構を解析し、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、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、血清・アミノ酸・グルコース欠乏時などによるオートファジー誘導を解析した。また、小胞体ストレスの誘導には、タプシガルギン (Tg)、ツニカマイシン (Tm)、ブレフェルディン A (BFA) を用いた。各タンパク質の安定性の解析には、プロテアソーム阻害剤 (MG132)、リソソーム阻害剤 (コンカナマイシン A, CMA)、タンパク合成阻害剤 サイクロヘキシミド (CHX) を使用した。ER-phagy や ERAD 関連因子欠損細胞の樹立には、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った。また、ER-phagy 関連因子の 1 つ FAM134B 遺伝子に GFP、Flag、Myc、HA、NanoBiT (LgBiT または SmBiT) タグなどを付加し、pcDNA ベクターへ挿入したコンストラクトを作製した。ER 局在性因子 (SP-RFP_{KDEL}、SP-RFP-GFP_{KDEL}、RAMP4-GFP、Sec61-GFP) をクローニングし、pcDNA ベクターへ挿入した。LgBiT を付加した LC3 や GABARAPL1 遺伝子もクローニングの後に pcDNA3.1 へ挿入した。これら各コンストラクトは、PEI-MAX を用いたりポフェクションにより遺伝子導入し、一定時間後に回収し解析した。

GFP や RFP タグタンパク質の細胞内局在については、コンフォーカル顕微鏡を用いて行なった。生細胞におけるタンパク質相互作用 (FAM134B-NanoBiT タンパク質間および FAM134B-SmBiT と LgBiT-LC3 または LgBiT-GABARAPL1 タンパク質間の会合は、発光解析用 96-well plate にて行った。具体的には、96-well plate にて培養した細胞に各組み合わせのコンストラクトを遺伝子導入し、一定時間後に培地を OPTI-MEM に置換し、直後に、希釈した NanoBiT 基質を添加し発光強度を測定した。

野生型および各種ゲノム編集細胞における mRNA およびタンパク質の網羅的な解析は、マイクロアレイおよび MS 解析により行なった。また、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法にて解析した。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。

4. 研究成果

これまでに ER-phagy に関わる受容体として 11 種類が報告されている。本研究では、ER-phagy 受容体として初めて同定され、遺伝性感覚性自立神経性ニューロパチー (Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IIB (HSAN2B) 原因遺伝子でもある Family with sequence similarity 134 member B (FAM134B) に着目し、野生型および HSAN2B 変異型の比較解析を中心に検討を行った。

(1) Neuro2a 細胞における内因性 FAM134B タンパク質発現の解析

まずはじめに栄養飢餓培養条件下における内因性 FAM134B タンパク質の発現変化について検討を行った。一般的なオートファジー誘導を起こす血清・アミノ酸除去培地にて培養したところ、時間依存的に FAM134B タンパク質の低下が見られた (図 1)。また、その低下はリソソーム阻害剤である CMA 存在下にて抑制された。そこで、血清除去、血清・グルコース除去および血清・アミノ酸除去培地にて比較検討したところ、血清・アミノ酸除去培地のみが FAM134B タンパク質を減少させ、それは、小胞体ストレス応答因子 GADD153 発現と相関しなかった。

アミノ酸除去が FAM134B 低下に重要であることが示唆されたため、必須アミノ酸、非必須脂アミノ酸、グルタミンを含まない非必須アミノ酸およびグルタミン単独を各々添加した場合の影響を検討した。その結果、いずれもアミノ酸添加においても FAM134B タンパク質量低下を有意に抑制した。興味深いことに、FAM134B 発現低下はグルタミン単独の添加で著しく抑制された (図 2)。

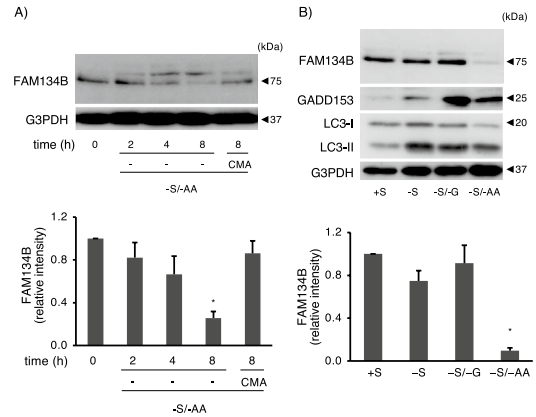


図 1 血清・アミノ酸欠乏による FAM134B タンパク質発現の低下

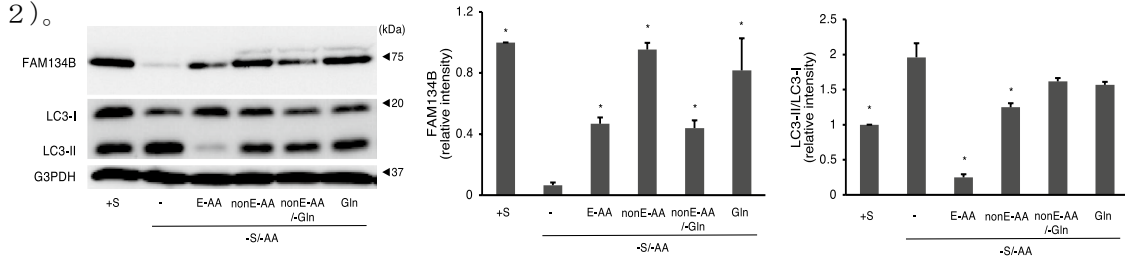


図 2 血清・アミノ酸欠乏による FAM134B タンパク質発現低下に対する各アミノ酸添加の影響

(2) 野生型および HSAN2B FAM134B タンパク質の細胞内局在および発現解析

次に、図 3 に示すような野生型および HSAN2B 変異 FAM134B コンストラクトを作製し、それらの性状の比較検討を試みた。内因性 FAM134B タンパク質の影響を除くため CRISPR/Cas9 法により FAM134B タンパク質欠損 Neuro2a 細胞を樹立し、以下の検討に用いた。まずはじめに、C 末端に GFP を付加した各 FAM134B と赤色蛍光タンパク質発現コンストラクト SP-RFP_{KDEL} を上記の Neuro2a に遺伝子導入し、48 h 後に細胞内局在を解析した (図 4)。

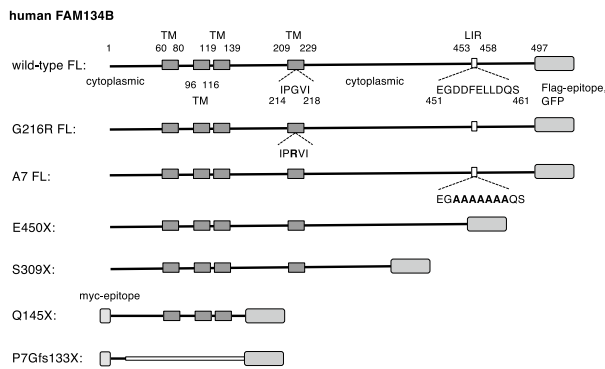


図 3 野生型および各変異型 FAM134B 発現コンストラクト

その結果、P7Gfs133X FAM134B 以外の変異 FAM134B の局在は野生型と差異がなく、小胞体局在性の SP-RFP_{KDEL} タンパク質と共局在していた。一方、P7Gfs133X FAM134B は細胞全体に分布しており、核と考えられる部分にも強い蛍光がみられた。次に、C 末端に Flag タグを付加した各 FAM134B コ

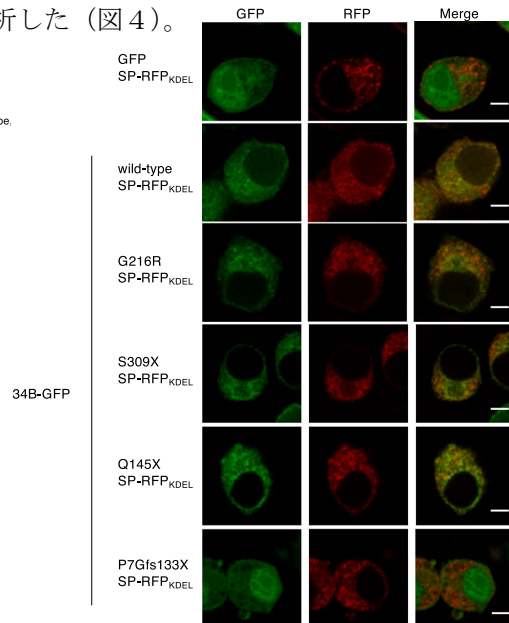


図 4 Neuro2a 細胞における各 FAM134B タンパク質の細胞内局在

ンストラクトを遺伝子導入し、42hに通常の血清含有培地または血清・アミノ酸除去培地に置換し、更に8h培養した後の各FlagタグFAM134Bタンパク質発現量を解析した(図5)。その結果、野生型FAM134Bのみが有意に低下していた。Q145X変異FAM134Bでは、ラダー上のバンドが検出され、血清・アミノ酸除去培地への置換により、複数のバンドが低下していたものの、主要なバンドには大きな変化が見られなかった。

(3) NanoBiT reporter assayによる野生型およびHSAN2B FAM134Bタンパク質の性状解析

最近、FAM134BによるER-phagy誘導にはFAM134Bが多量体することが示唆された。そこで、生細胞中におけるタンパク質会合が検出可能なNanoBiT reporterシステムを用い、野生型および変異型FAM134Bの会合性について検討した。コンストラクトは、N末端またはC末端にLgBiTまたはSmBiTを付加した4種類作製し、それぞれの会合性を検討した(図6)。その結果、野生型FAM134Bでは、N末端にLgBiTおよびSmBiTを付加したコンストラクトを遺伝子導入した場合において特異的なルシフェラーゼ活性が見られた。空ベクターであるLgBiTまたはSmBiT発現コンストラクトを導入した場合との比較により、それ以外の組み合わせによるルシフェラーゼ活性は非特異的なものであると考えられた。

一方で、S309XやQ145X変異FAM134B遺伝子を用いたNanoBiT活性では、N末端同士の間のみならず、N末端とC末端間での会合を示すルシフェラーゼ活性が見られた。P7Gfs133X変異FAM134Bの場合は、空ベクターであるLgBiT単独とのco-transfectionにて高いルシフェラーゼ活性が見られ、P7Gfs133X変異FAM134B間での会合を示す活性は見られなかった。

FAM134BをはじめとするER-phagy受容体は、小胞体膜近傍にてLC3ファミリーと会合するためのLC3-interacting region(LIR)を有している。そこで、LIR部分をアラニンに変異したA7やLIRを含むC末端を欠損したE450X変異FAM134Bコンストラクトを作製し、それぞれのC末端にSmBiTを融合した。また、LC3またはGABARAPL1のN末端にLgBiTを付加したコンストラクトを作製し、野生型および各変異FAM134Bとの会合性を比較検討した。その結果、野生型FAM134B-SmBiTはLgBiT-LC3およびLgBiT-GABARAPL1との会合に起因するルシフェラーゼ活性を示したものの、LIR欠損・変異FAM134B-SmBiTでは著しく低下していた。一方、1アミノ酸変異であるG216R FAM134Bはオリゴマー化を形成しER-phagy促進作用すると報告されているものの、今回開発したNanoBiT reporter assayによるLC3やGABARAPL1との会合性は野生型と同程度であった。

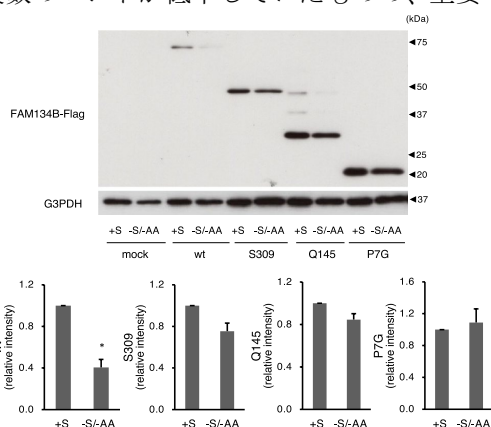


図5 各FAM134Bタンパク質発現に対する血清・アミノ酸欠乏の影響

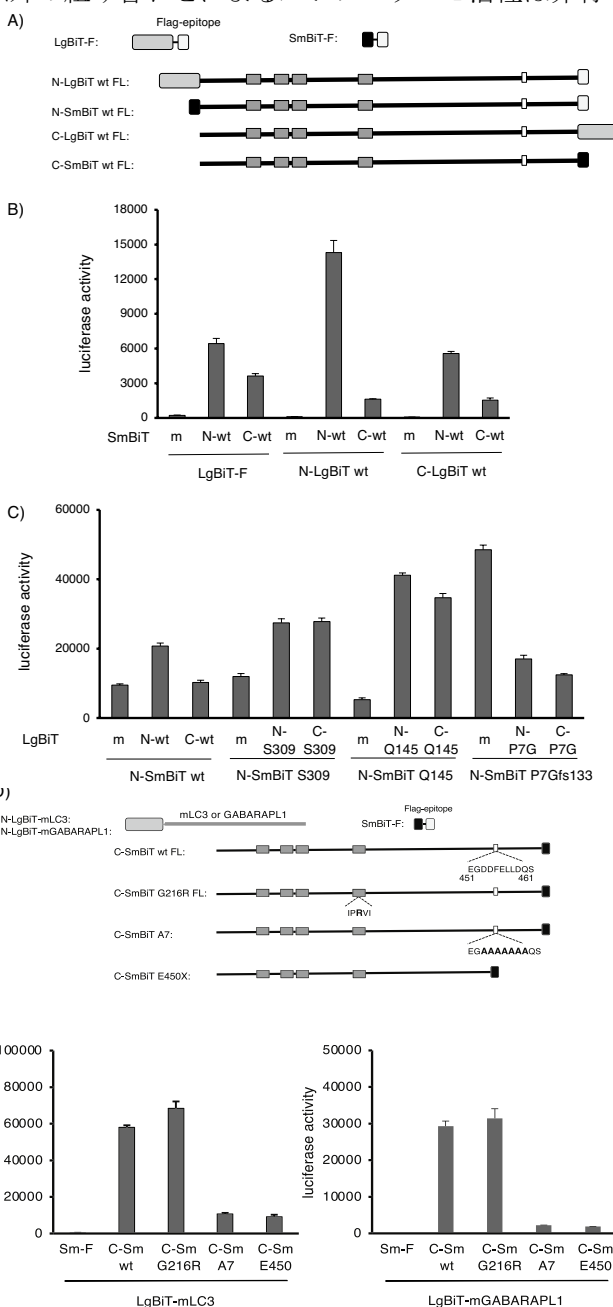


図6 NanoBiT reporter assayを用いた各FAM134Bタンパク質会合性の解析

(4) 野生型および HSN2B FAM134B による ER-phagy 誘導能の比較

最後に、小胞体局在性の蛍光タンパク質である SP-RFP-GFP_{KDEL}、GFP-RAMP4、GFP-Sec61B を各 Flag 付加 FAM134B (FAM134B-Flag) と co-transfection し 48 h 培養することで、FAM134B 依存的な ER-phagy レポータータンパク質切断活性を比較検討した (図 7)。その結果、野生型および G216R FAM134B では同程度の ER-phagy レポーター切断活性が見られたのに対し、LIR に変異を導入した A7 変異 FAM134B では切断型 GFP が殆ど見られなかった。同様に、C 末端欠損型である S309X, Q145X, P7Gfs133X 変異 FAM134B による SP-RFP-GFP_{KDEL} 切断誘導も殆ど見られなかった。

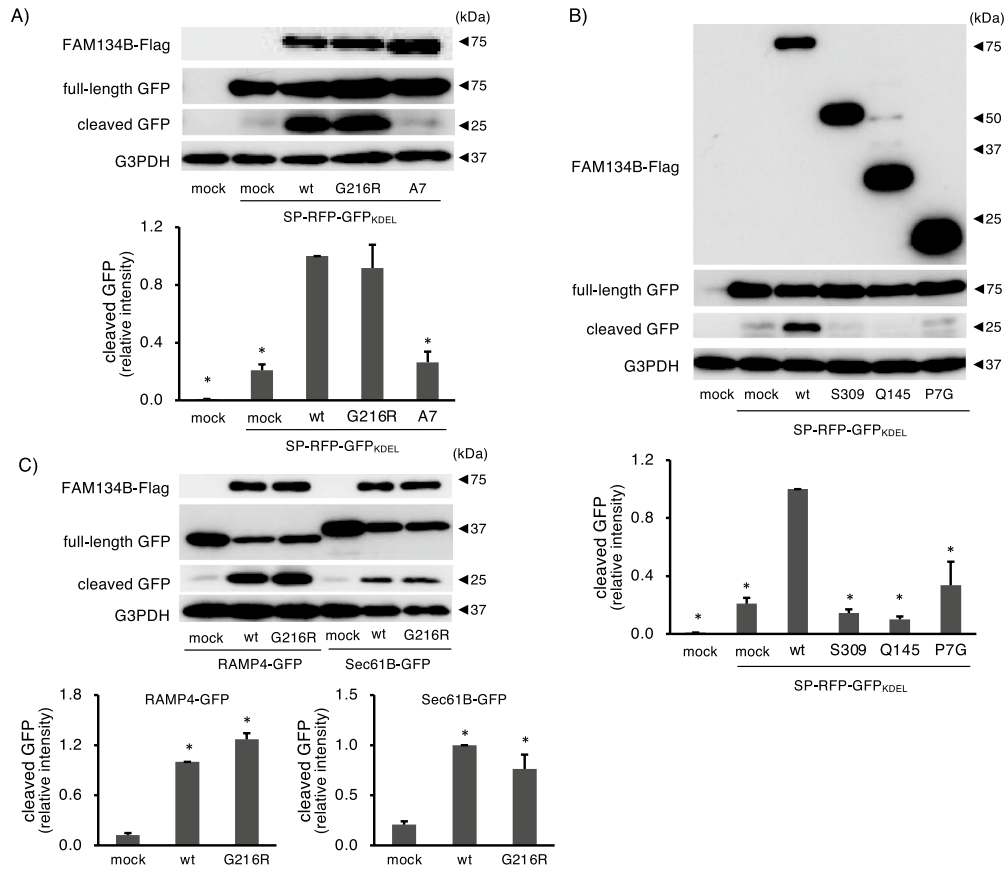


図 7 各FAM134Bタンパク質のER-phagy誘導活性の比較

SP-RFP-GFP_{KDEL} は小胞体内腔に存在するのに対し、GFP-RAMP4、GFP-Sec61B は膜貫通領域を有し小胞体膜上に存在する。GFP-RAMP4 または GFP-Sec61B を野生型または G216R 変異 FAM134B と遺伝子導入したところ、各全長型 GFP (RAMP4 または Sec61B 融合 GFP) の著しい低下が見られたが、両 FAM134B 間に差は見られなかった。また、切断型 GFP の発現量も野生型と G216R 変異 FAM134B 間で同程度であった。

以上より、本研究では小胞体局在性 ER-phagy 因子の 1 つであり、HSN2B 原因遺伝子である FAM134B の野生型および各種変異型発現コンストラクトを作製し、さまざまな観点から比較検討することで、様々な差異があることを明らかにした。今後これら知見が、他の ER-phagy 関連因子の理解につながるものと考えられる。また、今回樹立した FAM134B 欠損細胞の更なる解析は、ER-phagy と ERAD という異なる小胞体恒常性維持機構の関わりについても役立つものと考えられ、それにより得られた知見は小胞体を標的とした新たな薬剤及び指標の開発に繋がること期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oh-hashii K, Hasegawa T, Naruse Y, Hirata Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Molecular characterization of mouse CREB3 regulatory factor in Neuro2a cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 5411-5420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-021-06543-2	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, Yamamoto A, Murase R, Hirata Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative Analysis of CREB3 and CREB3L2 Protein Expression in HEK293 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052767	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 Murase Ryoichi, Yamamoto Ayumi, Hirata Yoko, Oh-hashii Kentaro	4. 巻 49
2. 論文標題 Expression analysis and functional characterization of thioredoxin domain-containing protein 11	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 10541 ~ 10556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07932-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 Kentaro, Nakamura Hibiki, Ogawa Hirotaka, Hirata Yoko, Sakurai Kaori	4. 巻 24
2. 論文標題 Elucidation of OSW-1-Induced Stress Responses in Neuro2a Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5787 ~ 5787
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065787	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 Kanamori Akane, Hinaga Shohei, Hirata Yoko, Amaya Fumimasa, Oh-hashii Kentaro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Molecular characterization of wild-type and HSN2B-linked FAM134B	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-023-08517-y	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	石垣 診祐 (Shinsuke Ishigaki) (40378170)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授 (13901)	
研究分担者	天谷 文昌 (Fumimasa Amaya) (60347466)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	内尾 こずえ (Kozue Uchio) (70373397)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・主任研究員 (84420)	

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