

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21700403

研究課題名（和文） 新規小胞体ストレス応答因子MANFによる神経細胞保護機構の解析

研究課題名（英文） Molecular characterization of a novel ER stress inducible factor, MANF

研究代表者

大橋 憲太郎 (OH-HASHI KENTARO)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50332953

研究成果の概要（和文）：

マウス神経芽細胞腫（Neuro2a 細胞）を小胞体ストレス誘導剤タプシガルギンで刺激することにより誘導される遺伝子群の中から、2 種類のマウス MANF 遺伝子をクローニングし、各種 MANF 発現コンストラクトを用いてその細胞保護能および分泌機構の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Using microarray analysis and RT-PCR, we found that two types of MANF mRNA up-regulation by treatment with thapsigargin, an ER stress inducer. After constructing various expression plasmids of mouse MANF mutants in addition to two full-length mouse MANF, we evaluated the effects of MANF-overexpression on stress-induced cell death and examined the processing and secretion of wild type and mutated MANF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス、ATF6、MANF、CRELD2

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は、その症状は異なるものの、神経変性・脱落が共通の現象として知られている。その要因として、酸化ストレス、細胞内外での異常タンパクの蓄積、神経細胞を取り巻くグリア細胞由来の炎症反応などが、申請者をはじめ多くの研究者により報告されている。しかし、現在までのところ、これら疾患に対する明確な原因の解明や予防・治療法の確立には至っていない。これまでに神経保護、再生に関わる因子として、NGF

や GDNF など多くの神経栄養因子がクローニングされ、その発現および標的細胞における作用機構が明らかになってきた。しかしながら現段階においては、いずれの神経栄養因子も上記に代表される神経変性疾患の予防・治療法の開発には至っていない。近年、新規の神経栄養因子として Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF)、Conserved Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) が報告された。この両栄養因子は、アミノ酸配列で約 60% の相同性を有することからファミリーと考えられる。特に

MANF は、当初は Arginine-rich mutated, in early stage tumors (Armet) としてクローニングされた遺伝子であり、最近機能未知の小胞体ストレス応答因子の一つであることが報告された。本研究では、小胞体ストレスを与えたマウス Neuro2a 細胞の mRNA を、マイクロアレイ法にて網羅的解析により得られた遺伝子群から、オルタナティブスプライシングにより生じる 2 種類の MANF 遺伝子をクローニングし、その性状解析を試みた。また、最近当研究室で同定した新規小胞体ストレス応答遺伝子 cysteine-rich with EGF-like domains 2 (CRELD2) との比較検討も行った。

2. 研究の目的

本研究では次の 2 点を中心に、実験を行った。

- (1) 恒常的 MANF 高発現細胞株の樹立とその解析。
- (2) MANF タンパク質の細胞内挙動および細胞外分泌機構の解析。

3. 研究の方法

(1) マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞より得られた cDNA をもとに、2 つのスプライシングバリエーション MANF の発現コンストラクトを作製した。これらを各種細胞株に遺伝子導入後、G418 によりセクションを行い、解析を行った。

(2) 作製した MANF 発現コンストラクトをもとに、各種欠損型 MANF の発現コンストラクトを作製し、分泌へ及ぼす影響を検討した。また、MANF 分泌に対する小胞体-ゴルジ体輸送の関わりについても検討を行った。

4. 研究成果

(1) マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を小胞体ストレス誘導刺激剤であるタブシガルギン (Tg) で刺激し、MANF mRNA の発現を RT-PCR で検出したところ、DataBase 上に登録されている 2 種類の転写物 NM029103, BC048616 (Fig. 1) はいずれも上昇していた

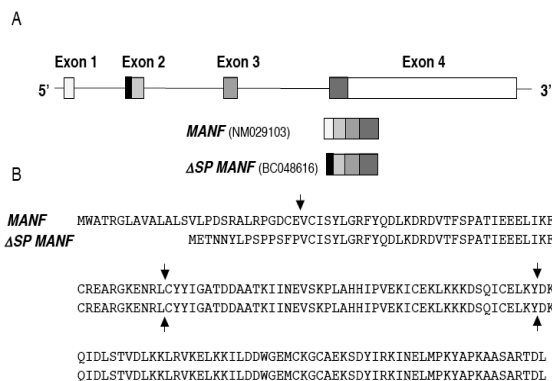


Fig. 1. マウス MANF 遺伝子およびアミノ酸配列

(Fig. 2A)。マウスのみで発現する BC048616 はシグナルペプチドを含む N 末端領域 (Exon 1) が欠損したタイプである (Δ SP MANF) (Fig. 1)。そこで、両 MANF 遺伝子の C 末端に Myc/His タグを付加したコンストラクトを作製し、Neuro2a 細胞に遺伝子導入することによりその発現を比較した (Fig. 2B)。その結果、 Δ SP MANF は、細胞内のみ存在し、その発現量も野生型の MANF (wt) より低かった。これは、他の細胞株 (C6 グリオーマ細胞、HEK293 細胞) においても同様であった。

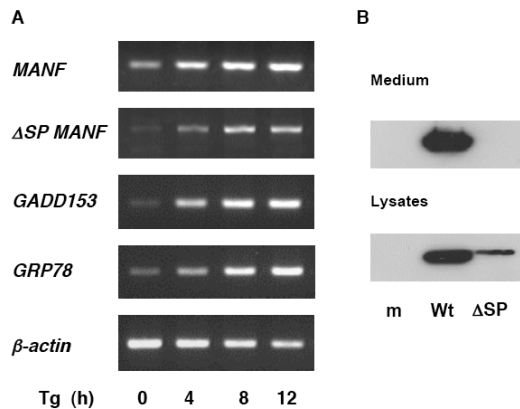


Fig. 2. Neuro2a 細胞における Tg 刺激による各種 mRNA の誘導および各マウス MANF の強制発現

(2) MANF の細胞保護効果が報告されているヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に対し、作製した各マウス MANF を遺伝子導入し、恒常的高発現株を樹立した。作製した細胞株の種々のストレスに対する耐性について、ミトコンドリア活性を指標とした WST-1 測定により検討を加えた。その結果、いずれの MANF 高発現 U2OS 細胞株も、Tg やツニカマイシン (Tm) 刺激、あるいは血清/グルコース除去に対して抵抗性を示さなかった (Fig. 3)。同様に HEK293 細胞株でも MANF の有効性は見られなかった。また、神経系細胞株として、Neuro2a, PC12, HT22 細胞への MANF の一過的遺伝子導入による効果も検討したが、小胞体ストレスをはじめとする各種刺激に対して有意な細胞保護効果は見られなかった。また、いずれの細胞

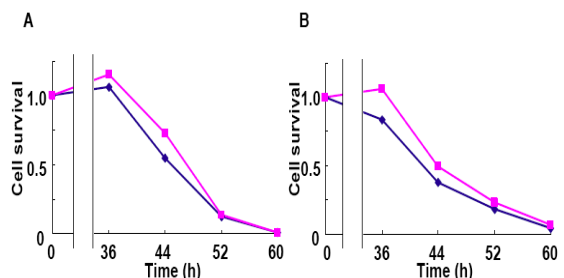


Fig. 3. MANF (wt) を恒常的高発現した U2OS 細胞を Tg (A) またはグルコース・血清除去 (B) 刺激した時の細胞生存率の変化 (青: mock, 赤: MANF (FL-MH) 高発現細胞株)

株においても MANF 強制発現による形態的変化（分化等）はなかった。

(3) 最近 Hellman M らは、MANF がこれまで報告されてきた分泌因子としてではなく MANF C 末端側の Ku70 SAP 様ドメインを介して細胞内因子として細胞保護的に機能することを報告している。そこで、MANF の分泌制御および分泌に関わる MANF のドメインを明らかにするために、各種変異型 MANF を作製し解析を行った (Fig. 4)。

i) 各 MANF を一過的に強制発現させた HEK293 細胞を用いてタンパク質の糖鎖修飾阻害剤 Tm およびゴルジ体崩壊を促す薬剤プレフェ

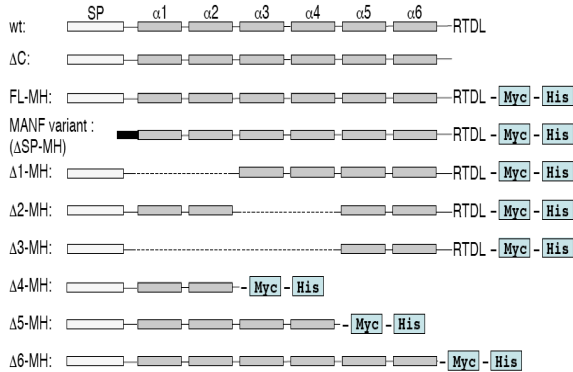


Fig. 4. 本研究で用いた各種マウス MANF 発現コンストラクト

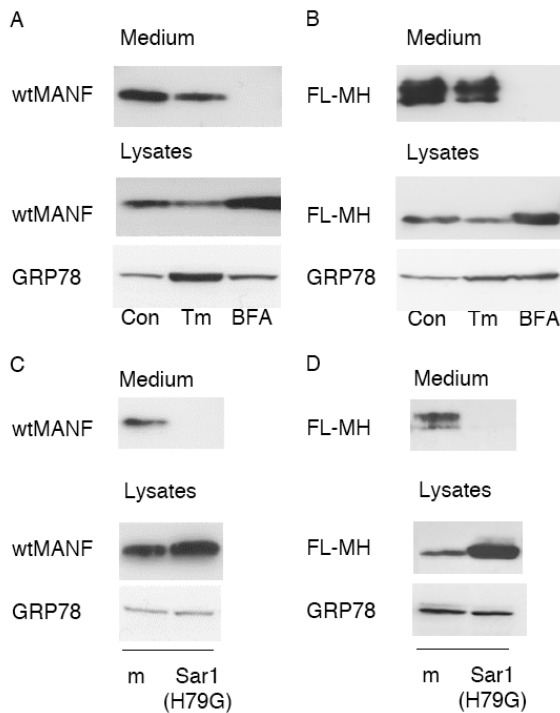


Fig. 5. HEK293 細胞における MANF (wt: A, C) および (FL-MH: B, D) の分泌機構の解析

ルディン A (BFA) の MANF 分泌への影響を検討した (Fig. 5AB)。その結果、Tm 処理では細胞内外での MANF 量の若干の低下が見られたものの分子量の変化は見られなかった。一方、BFA 処理は、MANF の分泌を完全に阻害し、細胞内への蓄積を引き起こした。また、ER - ゴルジ体輸送に関わる COPII の構成因子の一つ Sar1 の変異体 (Sar (H79G)) を強制発現して MANF 分泌に及ぼす影響を調べたところ、BFA 処理と類似した結果が得られた (Fig. 5CD)。またこれらの結果は、野生型 MANF および C 末端に Myc/His タグを付加した MANF でも同様であった。

ii) MANF の 6 つの α -ヘリックスを様々な組み合わせで欠損させた発現コンストラクトを作製し、その発現および細胞外分泌を検討した。その結果、 α -ヘリックス (1,2) または (3,4) の欠損型 MANF ($\Delta 1$, $\Delta 2$) では細胞内への蓄積と比べて分泌量が著しく低下していた (Fig. 6A)。一方、C 末端側の α -ヘリックス (5,6) 欠損型 MANF ($\Delta 5$) では細胞内は低分子量のものが極僅かに見られるのみで、その多くが培養液中で検出された (Fig. 6B)。

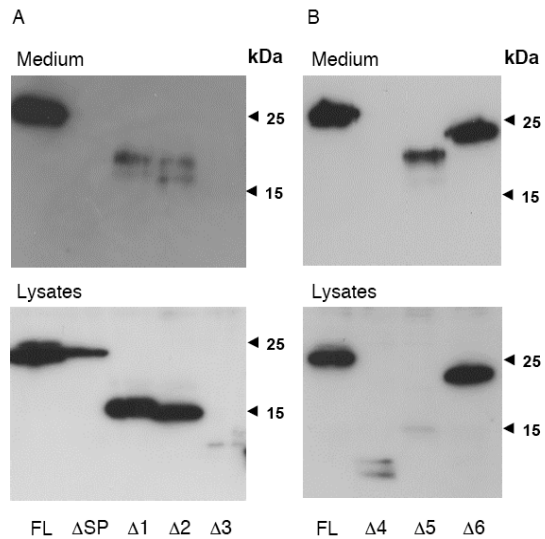


Fig. 6. HEK293 細胞における各欠損型 MANF の発現および分泌

iii) MANF 分泌に対する C 末端 4 アミノ酸 (RTDL) の役割と小胞体局在シャペロン GRP78 との関連について検討した。最近、Glembotski CC らにより定常状態では MANF が KDEL 受容体により小胞体に留め置かれるものの、各種ストレスにより GRP78 量が増加すると KDEL 受容体と GRP78 の会合が促進され、MANF が遊離して分泌が増加するとの仮説が提唱された。MANF の C 末端アミノ酸を各生物種間で比較すると非常によく保存されており、他の小胞体局在性タンパク質のように

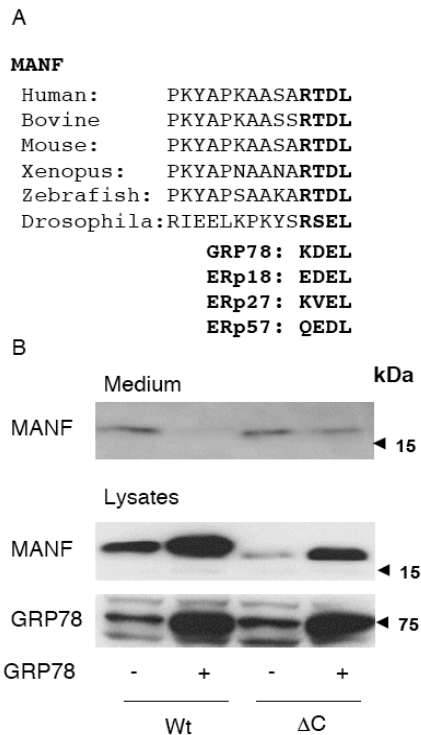


Fig. 7. 生物種間における MANF C 末端アミノ酸の比較 (A) と MANF の分泌への C 末端 4 アミノ酸欠失の影響 (B)

何らかの機能を有するものと考えられた (Fig. 7A)。そこで、RTDL 欠損型 MANF (Δ C) を HEk293 細胞に一過的に強制発現し、細胞内外の発現量を解析した (Fig. 7B)。 Δ C は野生型と比較し、細胞内での発現レベルが著しく低下していたが、培養上清中への分泌量は同程度であった。また、GRP78 強制発現は、野生型 MANF (wt) の分泌を著しく抑制し、細胞内への蓄積を亢進した。一方、 Δ C は GRP78 強制発現により細胞内発現量が増加したにもかかわらず、分泌量は極僅かしか低下しなかった。

最近当研究室では、MANF と同様の新規小胞体ストレス CRELD2 について C 末端 4 アミノ酸の役割を解析した。その結果、CRELD2 では C 末端 4 アミノ酸を欠損させることにより、a) その分泌量が著しく増加すること、b) GRP78 強制発現により野生型 CRELD2 の分泌が促進されることを明らかにしている (現在投稿中)。これらの現象は、MANF の挙動と全く異なるものであり、これまでの予想とは異なるメカニズムにより MANF の細胞内挙動が制御されていることを示唆している (現在投稿準備中)。また、この結果は CRELD2 同様に MANF も細胞内因子としてストレス応答に関わる可能性を示唆するものでもある。今後、MANF や CRELD2 への会合因子を同定し、解析を進めることにより新たなストレス制御メカニズムが明らかになるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1, Oh-hash K, Koga H, Ikeda S, Shimada K, Hirata Y, Kiuchi K.

Role of an ER stress response element in regulating the bidirectional promoter of the mouse CRELD2 - ALG12 gene pair. BMC Genomics. 2010 11:664.

2, Oh-hash K, Koga H, Ikeda S, Shimada K, Hirata Y, Kiuchi K.

CRELD2 is a novel endoplasmic reticulum stress-inducible gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009 387(3):504-510.

[学会発表] (計 2 件)

1, 大橋憲太郎、平田洋子、木内一壽、新規小胞体ストレス誘導遺伝子 CRELD2 の発現制御機構の解析 第 33 回日本基礎老化学会、平成 22 年 6 月 17 日、名古屋

2, 国枝亮佑、大橋憲太郎、平田洋子、木内一壽、新規小胞体ストレス誘導因子 CRELD2 の細胞内挙動の解析 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学大会 平成 22 年 12 月 7 日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ：

岐阜大学工学部生命工学科生命情報工学講 I

(<http://www1.gifu-u.ac.jp/~bioinfo1/Bioinfo1/Bioinfo1.html>)

()
研究者番号 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 憲太郎 (OH-HASHI KENTARO)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号 : 50332953

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者