

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659429

研究課題名(和文) 改変 GFP によるリアルタイム小胞体ストレス検知システム構築と神経変性疾患への応用

研究課題名(英文) Establishment of a system for monitoring endoplasmic reticulum redox state in mammalian cells

研究代表者

石垣 診祐 (Ishigaki, Shinsuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40378170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：小胞体内におけるストレスをリアルタイムで可視化するシステムの構築を目標に、改変 GFP (MERO-GFP) の励起波長の遷移を利用した新しい小胞体ストレスモニターシステムの開発を行った。MERO-GFP は酸化・還元状態に応じて 2 つの異なる励起波長でのピークを有し、その比は酸化還元の状態を反映する。哺乳細胞に MERO-GFP を発現させると細胞は酸化還元状態の変化にともなって励起波長比が変化することを確認した。小胞体酸化還元因子である ER01 と PRDX4 を抑制した細胞で MERO-GFP の波長変化を観察したところ、ER01、PRDX4 の発現抑制は、DTT による波長変化を濃度依存的に増強した。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) performs a critical role in the oxidative folding of nascent proteins such that perturbations to ER homeostasis may lead to protein misfolding and subsequent pathological processes. Among the mechanisms for maintaining ER homeostasis is a redox regulation, which is a critical determinant of the fate of ER stressed cells. Here we report the establishment of a system for monitoring ER redox state in mammalian cells. The new ER redox sensing system was developed based on the previously described monitoring system in yeast. Our system could successfully monitor the dynamic ER redox state in mammalian cells. Using this system, we find that manipulation of ER oxidases changes ER redox state. The mammalian ER redox sensing system could be used to study the mechanisms of ER redox regulation and provide a foundation for an approach to develop novel therapeutic modalities for human diseases related to dysregulated ER homeostasis including neurodegeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ER stress 神経変性疾患 ALS 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレスとは小胞体内における異常タンパク質の蓄積などによって生じる小胞体の機能障害と定義され、神経変性疾患との関連が数多く報告されている。小胞体ストレスが生じる細胞内ではunfolded protein response (UPR)と呼ばれる恒常性維持のためのシステムが活性化される。多くの研究でこのUPR因子の活性度合いが小胞体ストレスの指標に用いられてきた。しかしUPR因子をマーカーとすることは、小胞体ストレスを転写やリン酸化などの現象を介して間接的に観察しているに過ぎない。とりわけ神経変性疾患など慢性的な小胞体ストレスが関与する病態においては、長期に及ぶUPRの変化がストレスレベルを正しく反映しているとは言えない。例えば、我々の実験においてUPR因子の変化は変異SOD1発現誘導後の一時的な期間でしか捉えることが出来なかった。このため、実際の小胞体内における環境変化(ストレス)をリアルタイムで定量化するようなシステムの構築が望まれている。

2. 研究の目的

上記の問題を解決すべく異常タンパク質が蓄積する状況(小胞体ストレス)で還元状態にシフトする状況を改変GFPの励起波長の遷移を利用した新しい小胞体ストレスモニターシステムの開発により哺乳細胞における小胞体ストレスの可視化を目指す。

3. 研究の方法

改変GFP(MERO-GFP)は酸化・還元状態に応じて2つの異なる励起波長でのピークを有する特徴を持ち、この2つの励起波長におけるシグナル比は酸化還元の状態を反映する(図1)。小胞体内でunfolded proteinが増加すると酸化還元状態は還元方向へシフトすることから、励起シグナル比を計算することで小胞体ストレスを数値化しモニターすることが可

能となる。このMERO-GFPを、神経細胞をはじめとする哺乳細胞で発現させて、小胞体ストレスのリアルタイムモニターシステムを構築する。

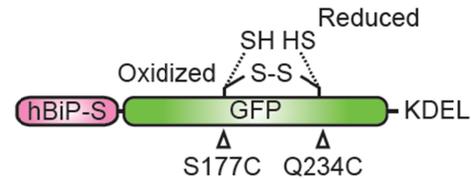


図1 MERO-GFPの構造。MERO-GFPはGFPに変異を導入することで酸化還元状態によりS-S結合が結合・解離して励起波長ピークが変化する。ER retention signalを導入することで小胞体特異的発現を

4. 研究成果

運動神経細胞(NSC34細胞) 膵細胞(INS1細胞)、HEL293細胞にMERO-GFPを発現させ、小胞体マーカーと共染色することで小胞体特異的な局在を示した。(図2)

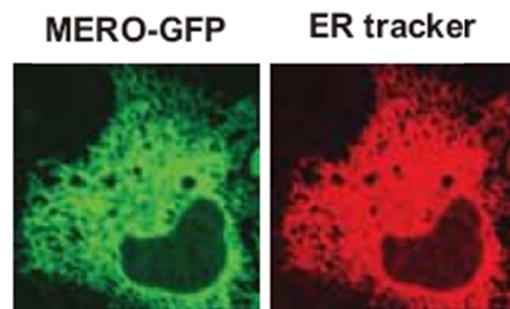


図2. Mammarian EroGFP (MERO-GFP)をCOS7細胞に発現させると小胞体(ER tracker)に局在する。

このMERO-GFPを発現する細胞は酸化還元状態の変化にともなって励起波長比が変化することをDTTの濃度、時間依存的な変化を定量化することで確認した(図3)。

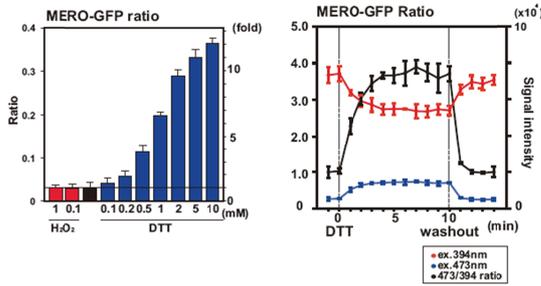


図3 Mammalian EroGFP (MERO-GFP) は酸化還元状態の推移に応じて励起波長の比率を変化させる。

MERO-GFP が哺乳細胞において動的な小胞体の酸化還元をモニターしていることを示すために、小胞体酸化還元の鍵となる因子である ER01 と PRDX4 を抑制した細胞を用意して、MERO-GFP の波長変化を観察した。その結果、ER01 の発現抑制は、MERO-GFP の DTT による波長変化を濃度依存的に増強し、PRDX4 の発現抑制も、同様に DTT による MERO-GFP の波長変化を濃度依存的に増強した (図4)。

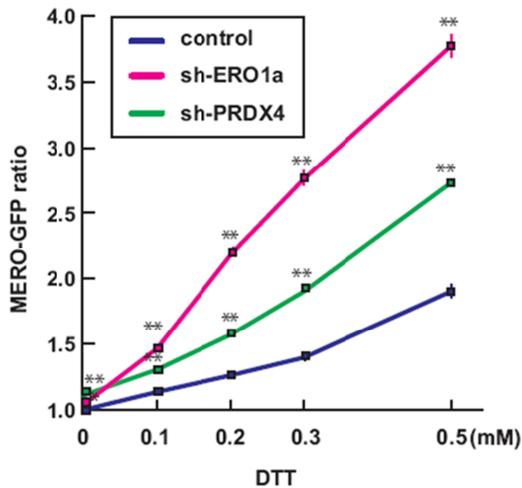


図4. ER01 の発現抑制は、MERO-GFP の DTT による波長変化を濃度依存的に増強し、PRDX4 の発現抑制も、同様に DTT による MERO-GFP の波長変化を濃度依存的に増強した。

このように哺乳類細胞でも小胞体の酸化還元状態の変化を効率良くモニターできるシステムの構築に成功し、これを論文報告した。た

だし、一過性小胞体ストレスによる波長比率の変化は、酵母の系と比較すると極めて軽微であった。このことは、哺乳類細胞の小胞体内は酸化状態にシフトするようなメカニズムが恒常的に機能しており、酵母の小胞体のように単純にタンパク質の S-S 結合の量の変化が直接酸化還元状態に反映しているわけではないことを示唆している。

本研究では小胞体ストレスのモニターの対象として、独自の神経変性疾患モデル(ALS/FTLD モデル) の構築が必要であると判断し、家族性・孤発性の両者に非常に密接であると考えられるようになった RNA 結合タンパク質のひとつである FUS のノックダウンモデルマウスの構築を進め、海馬特異的 FUS 抑制マウスモデルの開発に成功した (図5)。

AAVを用いた海馬特異的 FUS-KDマウス



図5. マウス両側海馬に ALS/FTLD の原因遺伝子である FUS に対する shRNA をコードした AAV を streptotaxic に injection することで、海馬特異的に FUS を抑制することに成功した。

このマウスが FTLD 様の行動異常を呈すること、長期観察において萎縮を呈することをこれまでに見出しており、神経機能異常から神経変性 (神経細胞脱落) を観察するのに適したモデルと考えられた。このため、本研究で開発した小胞体ストレスのリアルタイムモニターシステムを使用することで、ALS/FTLD における小胞体ストレスの関与が神経機能異常から神経変性に至るまでのどの段階であるの

かを明らかにすることが可能になるものと思われる。

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 6 件)以下全て査読あり

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower Motor Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **JAMA Neurol.** (2014) 71(2):172-9. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5489.

Honda D, Ishigaki S*, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. **FEBS Open Bio.** (2013) 4:1-10. doi: 10.1016/j.fob.2013.11.001. eCollection 2013 (*corresponding author)

Kanekura K#, Ishigaki S#, Merksamer P, Papa F, Urano F. Establishment of a system for monitoring endoplasmic reticulum redox state in mammalian cells. **Lab Invest.** (2013) 93(11):1254-8 doi: 10.1038/labinvest.2013.112. (# equally contributed 1st author)

Fujioka Y, Ishigaki S*, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is

associated with cell selectivity in ALS/FTLD. **Sci. Rep.** (2013)3:2388. doi: 10.1038/srep02388. (*corresponding author)

Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, Ishigaki S, Zhu LJ, Hayashi E, Hui ST, Greiner D, Kaufman RJ, Bortell R, Urano F. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. **Cell Metab.** (2012) 16(2):265-73. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.005.

Ishigaki S#, Masuda A#, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. **Sci Rep.** (2012) 2:529. doi: 10.1038/srep00529. (# equally contributed 1st author)

[学会発表](計 3 件)

Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka, Tsuyoshi Udagawa, Daiyu Honda, Masahisa Katsuno, and Gen Sobue FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ in association with clinicopathological features of ALS/FTLD: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTLD. The 43rd Society for Neuroscience annual meeting, 2013.11.10. San Diego, CA アメリカ合衆国

Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka, Tsuyoshi Udagawa, Daiyu Honda,

Masahisa Katsuno, and Gen Sobue
FUS regulates alternative splicing
patterns of Mapt by cooperating with
PSF/SFPQ: a novel link between FUS
and Tau in the pathogenesis of ALS and
FTLD. RNA Metabolism in
Neurological Disease, 8th Brain
Research Conference 2013.11.7. San
Diego, CA アメリカ合衆国

Shinsuke Ishigaki, Yusuke Fujioka,
Akio Masuda, Yohei Iguchi, Masahisa
Katsuno, Kinji Ohno, and Gen Sobue
Comparison of Fus-regulating gene
expression and alternative splicing
profiles among different cell lineages in
the central nervous system. The
42nd Society for Neuroscience annual
meeting, 2012.10.14. New Orleans, LA
アメリカ合衆国

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石垣 診祐 (Ishigaki Shinsuke)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：40378170

(2)研究分担者

なし