

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870605

研究課題名(和文)1回膜貫通型糖蛋白質GPNMBの小胞体および酸化ストレス応答機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of GPNMB function in endoplasmic reticulum stress and oxidative stress responses

研究代表者

鶴間 一寛 (Tsuruma, Kazuhiro)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50524980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)、緑内障など様々な病気と小胞体ストレスの関係が示唆されている。過度な小胞体ストレスは細胞死を引き起こすことが知られている。本研究では、緑内障やALSとの関連が報告されている蛋白質であるglycoprotein non-metastatic melanoma B (GPNMB)が小胞体ストレスによって発現量が増加することを見出し、GPNMBは分子シャペロンの一つであるglucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP)のmRNAの成熟に関与して小胞体ストレス誘発神経細胞死を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress is known to be associated with Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and glaucoma. Excessive ER stress causes cell death. In this study, I revealed that glycoprotein non-metastatic melanoma B (GPNMB), which is related to ALS and glaucoma, was upregulated by ER stress and GPNMB reduced the cell death induced by ER stress. GPNMB promoted the mRNA maturation of glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) known as a molecular chaperone in ER.

研究分野：薬理学

キーワード：小胞体ストレス 神経変性疾患 GPNMB 小胞体ストレス応答機構

1. 研究開始当初の背景

Glycoprotein non-metastatic melanoma B (GPNMB, 別名 osteoactivin) は、低転移性メラノーマより同定された1回膜貫通型糖蛋白質である。これまでの研究により、がんの転移や線維芽細胞分化、骨芽細胞分化や破骨細胞の発生等に関与していることが明らかにされており、その他緑内障をはじめ様々な疾患への関与も示唆されている。GPNMBは主に細胞膜に存在し、酵素的に切断を受けて細胞外ドメインと細胞内ドメインに分離される。細胞外ドメインの添加により extracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化が引き起こることが報告されており、何らかの受容体を介して細胞に影響を与えている可能性が示唆されているが詳細な生理的機能は未だ不明なままである。申請者および共同研究者の検討により、筋萎縮性側索硬化症病態に伴う運動神経細胞死にGPNMBが関与していることを見出した。この結果より、GPNMBの細胞外ドメインが神経細胞保護に重要であることが証明されたが、詳細な作用機序についてはやはり不明な点が多い。とくに細胞内におけるGPNMBの機能および切断されたC末端側の細胞内ドメインの機能についてはほとんど不明である。一方、近年の研究において、GPNMBは蛋白質合成を調節する細胞内小器官である小胞体やゴルジ体に局在することが報告されたことから、GPNMBが蛋白質の合成および成熟過程に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。蛋白質の「組立て(folding)」および「分解」のバランスが崩れると構造異常な蛋白質の蓄積により細胞死を惹起する小胞体ストレスが生じる。小胞体ストレス条件下では、異常蛋白質のre-foldingを促進するために、glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP)に代表される分子シャペロンが誘導されることが知られている。一方、小胞体ストレスが過剰な場合は蛋白質の翻訳停止やアポトーシス経路の活性化を引き起こし細胞死へと導く。小胞体ストレスは緑内障をはじめ様々な病態への関与が示唆されている。そこで、申請者は小胞体ストレス存在下におけるGPNMBの機能を明らかにするために、培養細胞(NSC34細胞)に小胞体ストレスを惹起させた。その結果GPNMBは分子シャペロン同様に蛋白質レベルで発現の上昇が認められたことから、小胞体ストレス応答に対するGPNMBの関与が推測された。さらに、siRNAを用いたGPNMBのノックダウンにより、小胞体ストレス存在下でのみGRP78の発現誘導が特異的に抑制された。これらの結果より、GPNMBが小胞体ストレス応答因子の可能性があり、さらに、GRP78の発現をストレス存在下でのみ調節するストレスセンサー分子である可能性が示唆された。また、GPNMBは酸化ストレスとの関連も示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では1)小胞体ストレスによるGPNMBの発現量上昇のメカニズムの解明、2)プロテアーゼによるGPNMBの切断の必要性の有無、3)細胞内局在の変化の有無、4)BiPのmRNAの増加機構(転写活性化、BiPのmRNA成熟への影響、安定化など)の解明を行い、小胞体ストレス時におけるGPNMBの詳細な機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)小胞体ストレスによるGPNMBの発現量上昇のメカニズムを解明するために、ウエスタンブロットおよび定量的PCR法により検討した。

(2)GPNMBの細胞保護作用およびBiPの発現調節にどの部位が関与しているか明らかにするために、完全長、細胞内(C末端側)フラグメントをNSC34細胞に発現させ検討した。また、小胞体ストレスによりGPNMBの細胞内局在の変化が起きるか否か免疫染色法で検討した。

(3)GPNMBによるBiPの発現調節がどのようなメカニズムで行われているか、ルシフェラーゼアッセイ、未成熟なBiP mRNAの発現量の定量により検討した。

(4)マウス中大脳動脈虚血再灌流モデルにおけるGPNMBの機能をヒトGPNMBトランスジェニックマウスを用いて検討した。

4. 研究成果

(1)小胞体ストレスによるGPNMBの発現量上昇のメカニズムを解明する目的で、NSC34細胞に小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギンを添加してGPNMBの発現量をウエスタンブロットおよび定量的PCR法により解析した。その結果、GPNMBの蛋白質量は小胞体ストレス誘導1時間後から有意に増加した(図1)。一方、mRNAの発現量には変化がなかったことから、GPNMBは小胞体ストレス時には蛋白質の分解が抑制されて発現量が増加している可能性が示唆された。

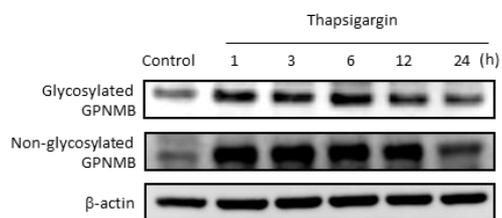


図1. 小胞体ストレス時におけるGPNMB蛋白質の発現量の変化

(2)NSC34細胞に小胞体ストレスを負荷するとGPNMBの局在が細胞質から核へと移行した(図2)。また、同時にウエスタンブロットによりGPNMBの発現量を検討したとこ

る、小胞体ストレスにより細胞内フラグメント発現量が減少し、完全長の GPNMB の増加が認められた。また、細胞内フラグメントを強制発現させても BiP の発現量に変化は認められなかったことから、BiP の発現調節には完全長の GPNMB が関与していることが明らかとなった。

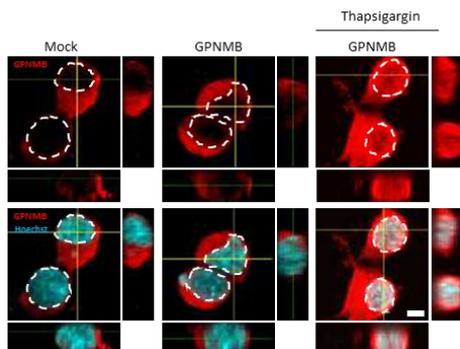


図 2. 小胞体ストレスによる GPNMB の細胞内局在の変化

(3) BiP の発現調節が転写レベルで行われているか否か、BiP のプロモーター領域に存在する小胞体ストレス応答配列 (ERSE) を含んだレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、GPNMB は ERSE を介した転写には影響を与えなかった。一方、RNA 干渉法を用いて GPNMB の発現量を低下させた細胞において、小胞体ストレス存在下で BiP の未成熟な mRNA を定量したところ、コントロール比較して未成熟な BiP mRNA 量が有意に増加したが (図 3)、成熟した BiP mRNA 量は減少した (図 4)。これらの結果から、GPNMB は BiP mRNA の成熟 (スプライシング) に関与している可能性が示唆された。

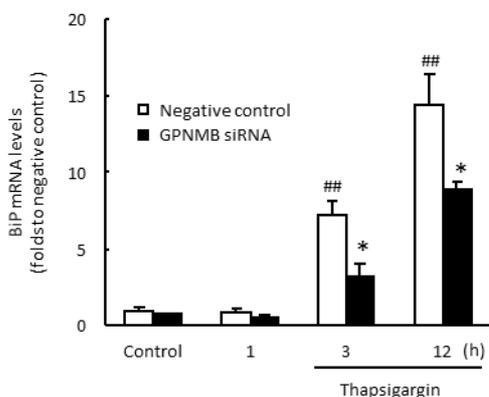


図 3. GPNMB のノックダウンによる BiP (GRP78) mRNA の発現量の変化

(4) ヒト GPNMB を発現するトランスジェニックマウスを用いて中大脳動脈虚血再灌流モデルを作製し、BiP 蛋白質の発現量を定量したところ、野生型マウスと比較して有意に

発現量の増加が認められた (図 5)。一方、GRP94 の発現量に変化はなかった。

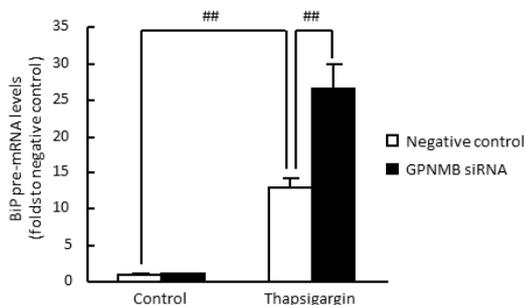


図 4. GPNMB のノックダウンによる未成熟型 BiP (GRP78) mRNA の発現量の変化

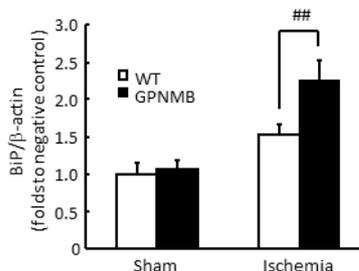


図 5. GPNMB 過剰発現マウスを用いた中大脳動脈虚血再灌流モデルの脳内における BiP (GRP78) 蛋白質発現量の変化

以上の結果とこれまでの知見を考慮すると、小胞体ストレス時において GPNMB は発現が増加し、BiP mRNA の成熟を促進させて特異的に発現量を増加させていることが明らかとなった。GPNMB がこれまで報告されてきた小胞体ストレス応答機構とは異なるメカニズムによって小胞体ストレスを低減している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

野田泰裕, 鶴間一寛, 高田真史, 田中彦孝, 嶋澤雅光, 原英彰
小胞体ストレス存在下における GPNMB の BiP pre-mRNA スプライシング促進作用
第 89 回日本薬理学会年会 (横浜, 2016, 3, 9-11)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴間 一寛 (TSURUMA KAZUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50524980