

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26292052

研究課題名（和文）レドックス可視化センサーで追跡するタンパク質代謝異常のレドックス破綻と回復の機構

研究課題名（英文）Mechanism analysis of redox imbalance caused by aberrant proteostasis and its recovery using fluorescence protein sensors visualizing redox states.

研究代表者

阪井 康能（Sakai, Yasuyoshi）

京都大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：60202082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,700,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞内レドックスを可視化するroGFPと申請者が作製したRedoxfluorをもとにオルガネラターゲット型のスーパーレドックスセンサーを創生し、哺乳動物細胞内における局所的レドックスモニタリング技術を開発した。その可視化技術を用いて、タンパク質代謝異常に伴うレドックス破綻の細胞内における機序と分子機構を明らかにした。さらにこれを回復する食品由来成分を探索し、当該化合物のレドックスモジュレーターとしての分子機能・効能を実証した。

研究成果の概要（英文）：Based on the redox sensors, roGFP and our developed Redoxfluor, we have created organelle-targeting super redox sensors and techniques monitoring intracellular local redox states in mammalian cells. Using these techniques, we have elucidated molecular mechanisms of abnormal redox states caused by aberrant intracellular protein metabolisms. Furthermore, we demonstrated food-derived compounds that recovered abnormal redox states as redox modulators.

研究分野：応用微生物学

キーワード：レドックス 蛍光タンパク質 タンパク質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

老化やアルツハイマー病などの神経障害に伴って、オートファジーやプロテアソーム分解活性が低下した結果、アミロイド (A $\beta$ ) を始めとするタンパク質凝集体の蓄積が起こり、細胞内が酸化環境になると言われている。しかし、その作用機作については異なる2つの仮説、1)タンパク質凝集体が細胞内に蓄積した結果、細胞内酸化を引き起こす、2) 酸化環境がタンパク質凝集体の蓄積を引き起こす、が提唱されているが、その機序と連関について明確な結果は示されていない。また小胞体におけるタンパク質の折りたたみ・品質管理とその破綻によって起こる小胞体ストレスは、疾患やタンパク質生産にとって重要な因子である。しかし、従来、局所的レドックス状態を知る方法論がなかったこともあり、系統だった研究はほとんど行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内レドックスを可視化する roGFP と自ら作製した Redoxfluor をもとにオルガネラターゲット型スーパーレドックスセンサーを創生し、哺乳・酵母細胞内における局所的レドックスモニタリング技術を開発する。次にタンパク質分解系の一つであるプロテアソームの活性阻害によってもたらされるレドックス破綻の細胞内における機序と分子機構を明らかにする。その可視化技術を用い、老化や神経疾患にともなって起こるレドックス破綻を回復する化合物・食品機能成分の探索を培養細胞レベルで実施し、同定した化合物のレドックスモジュレーターとしての分子機能・効能を実証、新たな機能性食品・創薬開発のための礎とする。

## 3. 研究の方法

細胞内レドックスを可視化する Redoxfluor と roGFP に円順列変異や既知の安定化変異を導入し、かつオルガネラ局在配列の付加により、サイトゾル、小胞体、ミトコンドリア、などの各オルガネラ特異的なレドックスを検出できるスーパーレドックスセンサーを開発した。これらを用いて、プロテアソーム阻害や A $\beta$  ペプチドの添加といった「タンパク質凝集体の蓄積」が細胞内レドックス異常を発症する機序をオルガネラ特異的な抗酸化酵素の過剰発現が各オルガネラのレドックスに与える効果を計時的に見ることで同定した。また、上記のレドックス異常を回復させるレドックスモジュレーターの探索を行い、各オルガネラのレドックスやタンパク質凝集体の蓄積量を調べることで、これらがレドックス異常を回復させる機序を解明した。

## 4. 研究成果

### (1)スーパーレドックスセンサーの創生

Redoxfluor に対して円順列変異やシステ

イン残基の置換を導入することで、本プロローブのダイナミックレンジを改良した。また、安定性が悪く、蛍光強度が弱いためにレドックス観察に適さない小胞体型 roGFP にスーパーフォルダー-GFP 由来の4つの安定化変異を導入することで、その安定性を改善し、小胞体レドックス観察に適した roGFP 変異体 ERroGFP S4 を開発した。

### (2)プロテアソーム阻害に伴うレドックス破綻の機構

ミトコンドリア roGFP と Redoxfluor を用いることでプロテアソーム阻害初期にミトコンドリア酸化が引き起こされ、その後遅れてサイトゾルが酸化され、細胞死に至ることを明らかにした。

さらに、プロテアソーム阻害によるレドックス破綻を正常に戻す「レドックスモジュレーター」を、食品由来の抗酸化剤を対象にし、Redoxfluor を用いた細胞内レドックスの可視化によりスクリーニングを実施したところ、赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールをはじめとし、「レドックスモジュレーター」として同定された抗酸化剤は、いずれも抗酸化酵素の誘導活性ではなく、ミトコンドリアで産生した活性酸素種を除去することでプロテアソーム阻害に伴うレドックス異常を回復させることを明らかにした。

### (3)アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ 42)の細胞内蓄積による細胞死の機構

A $\beta$ 42 は細胞外で産生されるので、化学的に合成した A $\beta$ 42 をヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞に添加したところ、オリゴマー化した A $\beta$ 42 がリソソームに蓄積することがわかった。さらに、オリゴマー化傾向の異なる A $\beta$ 42 変異体を添加したところ、オリゴマー化の程度に依存してリソソームへの蓄積量が増加し、細胞死も増加した。A $\beta$ 42 は *in vitro* においてオリゴマー化の程度に比例して ROS を産生することが知られており、リソソームに蓄積した A $\beta$ 42 はリソソーム膜酸化とリソソーム膜崩壊を引き起こした。そこで、リソソーム膜にターゲットさせた抗酸化酵素 Prx1 の過剰発現やリソソーム膜からのコレステロール排出を抑制することでリソソーム膜を安定化させる U18666A の添加は、A $\beta$ 42 蓄積によるリソソーム膜崩壊や細胞死を抑制することを明らかにした。生体内の主要な抗酸化化合物であるグルタチオンの前駆体である NAC も弱いながらも同様な効果を示した。したがって、A $\beta$ 42 は細胞内に取り込まれ、リソソームにオリゴマーとして蓄積して ROS を産生し、リソソーム膜を酸化させ、さらにはリソソーム膜を崩壊させ、最終的に細胞死を引き起こすことを明らかにした。また、リソソームに対する抗酸化処理は A $\beta$ 42 のリソソーム蓄積に伴うリソソーム膜崩壊や細胞死を抑制できることも明らかと

なった。

#### 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 4 件)

Sunita Maharjan、奥 公秀、津田 将志、竇関 淳、阪井 康能、Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition, Scientific Reports、査読有、4 巻、2016、5896、DOI:10.1038/srep05896

竇関 淳、大石 麻水、藤村 多嘉朗、阪井 康能、Development of a stable ERroGFP variant suitable for monitoring redox dynamics in the ER, Bioscience Reports、査読有、3 6 巻、2016、e00316、DOI:10.1042/BSR20160027

Sunita Maharjan、阪井 康能、竇関 淳、Screening of dietary antioxidants against mitochondria-mediated oxidative stress by visualizing of intracellular redox state、Bioscience, Biotechnology and Biochemistry、査読有、8 0 巻、2016、726-734、DOI:10.1080/0916841.2015.1123607

奥 勇紀、村上 一馬、入江 一浩、竇関 淳、阪井 康能、Synthesized A $\beta$ 2 Caused Intracellular Oxidative Damage, Leading to Cell Death, via Lysosome Rupture, Cell Structure and Function、査読有、4 2 巻、2017、71-79、DOI:10.1247/csf.17006

[学会発表](計 24 件)

発表者：竇関 淳、Antioxidants derived from foods protect redox aberration and cell death caused by proteasome inhibition, Bordeaux-Kyoto、2014 年 5 月 5 日 - 6 日、Bordeaux (France)(招待講演)

発表者：阪井 康能、「遺伝子発現から薬効薬理評価～新リアルタイムイメージング～」、「異種タンパク質生産の TPO を考える：フォールディングとレドックス」、OYC バイオシンポジウム 2014、2014 年 7 月 4 日、日本工業倶楽部会館(東京都)(招待講演)

発表者：竇関 淳、大石 麻水、阪井 康能、Stable ERroGFP variants are suitable for detection of ER redox state, Gordon Research Conference, “Thiol-based redox regulation & signaling”, 2014 年 7 月 20 日 - 25 日、Girona (Spain)

発表者：阪井 康能、異種タンパク質生産について C1 酵母を使って考える、新産業酵母研究会、2014 年 10 月 17 日、産総研：臨海

副都心センター(東京都)(招待講演)

発表者：Sunita Maharjan、奥 公秀、竇関 淳、阪井 康能、Mitochondria trigger cytosolic oxidative stress under proteasome inhibition, Society for free radical biology and medicine’s annual meeting 2014、2014 年 11 月 19 日 - 23 日、Seattle (USA)

阪井 康能、奥 公秀、竇関 淳、Workshop “Visualization of Local Redox State in Cells: Its Application to Biology and Drug Screening”, 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 24 日、Paris (France)(招待講演)

阪井 康能、Symposium “How can we evaluate “physiological” redox state?” 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 24 日、Paris (France)(招待講演)

阪井 康能、Round Table Discussion “What are the Best & Adequate Methods to Evaluate Oxidative Antioxidants in vitro vs in vivo & in Humans?”、15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 24 日、Paris (France)(招待講演)

奥 勇紀、村上 一馬、入江 一浩、竇関 淳、阪井 康能、Intercellular Accumulation of Amyloid Beta Peptide Leads Lysosomal Membrane Permeabilization-Mediated Cell Death、15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants 2015、2015 年 6 月 22 日 - 24 日、Paris (France)

阪井 康能、蛍光可視化で探るオルガネラホメオスタシスの生理機能と障害、日本生化学会北海道支部共催講演会、2015 年 9 月 8 日、北海道大学地球環境科学研究所(札幌市)(招待講演)

Sunita Mahajan、竇関 淳、阪井 康能、The mechanism underlying mitochondria dysfunction under proteasome inhibition, Cold Spring Harbor Asia Conferences-Mitochondria、2015 年 10 月 12 日 - 15 日、Suzhou (China)

藤村 多嘉朗、大石 麻水、Sunita Maharjan、竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害に伴う小胞体レドックス異常の機序、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 1 日 - 4 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

奥 勇紀、村上 一馬、入江 一浩、竇関 淳、阪井 康能、神経細胞内に蓄積した Aβ42 が細胞死を引き起こす機構、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 1 日 - 4 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

Sunita Mahajan、黒板 智博、竇関 淳、阪井 康能、The mechanisms underlying mitochondrial dysfunction under proteasome inhibition、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 1 日 - 4 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

阪井 康能、細胞内の可視化を通して「わかったこと」「役立てること」、第 10 回中部大学ライフサイエンスフォーラム、2016 年 1 月 13 日、中部大学不言実行館アクティブホール(春日井市、愛知県)(招待講演)

竇関 淳、Sunita Maharjan、阪井 康能、プロテアソーム阻害による異常タンパク質がミトコンドリア障害、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日 - 17 日、京都テルサ(京都市)

竇関 淳、奥 勇紀、藤村 多嘉朗、大石 麻水、奥野 友紀子、萩原 正敏、阪井 康能、小胞体における異常タンパク質発現に伴うレドックス変化とこれを回復させる薬剤探索系、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日 - 17 日、京都テルサ(京都市)

阪井 康能、Gene-encoded Redox Probes, Application to Biology and Drug Screening、FB3: Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks-Design and Applications、2016 年 7 月 7 日 - 11 日、天津大学(天津、中国)(招待講演)

阪井 康能、生理的レドックス状態を可視化する分子プローブの開発と生理化学への応用、2016 年 10 月 31 日、第 37 回「食と健康」研究会、サントリーワールドリサーチセンター(京都府)(招待講演)

黒板 智博、Sunita Maharjan、竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害に伴う鉄代謝異常・酸化ストレスとミトコンドリアストレス障害、2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日、パシフィコ横浜(横浜市)

② 阪井 康能、細胞内の局所的レドックスを指標にした生理化学、京都大学学際融合教育推進センター 生理化学研究ユニット第 6 回公開シンポジウム「Chemistry で紐解く Physiology」、2016 年 12 月 22 日、京都大学農学研究科(京都市)(招待講演)

② 阪井 康能、メタノール資化性酵母の利用を出発点にした分子細胞生物学の発展、大阪大学工学研究科酵母リソース工学寄附講座成果報告シンポジウム「メタノール資化性酵母研究の展望」、2017 年 1 月 29 日、大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)(招待講演)

③ 阪井 康能、植物の葉状における C1 酵母の生存戦略とそれを支える分子細胞機能、第 82 回酵母研究会、2017 年 3 月 8 日、北野工房のまち(神戸市)(招待講演)

④ 奥 勇紀、奥野 友紀子、萩原 正敏、竇関 淳、阪井 康能、小胞体でのミスフォールドタンパク質蓄積に伴うレドックス異常回復剤の同定とその機序について、日本農芸化学 2017 年大会、2017 年 3 月 17 日 - 20 日、京都女子大学(京都市)

〔図書〕(計 2 件)

竇関 淳、阪井 康能、プロテアソーム阻害が引き起こすレドックス異常と抗酸化食品成分による抑制、バイオサイエンスとインダストリー、査読有、73 巻、2015、192-193

竇関 淳、阪井 康能、細胞内レドックス状態の可視化によるレドックスモジュレーター探索、バイオサイエンスとインダストリー、査読有、73 巻、2015、198-201

〔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〕

・研究室ホームページ  
<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp/>

・プレスリリース

「タンパク質分解装置の活性が細胞死を引き起こす初期経路の同定と食品成分による回復」

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2014/140731\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/140731_1.html)

本研究成果は、朝日新聞(8月1日4面)、京都新聞(8月1日26面)、産経新聞(8月1日26面)、日刊工業新聞(8月1日23面)及び毎日新聞(8月1日23面)に掲載された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阪井 康能(SAKAI, Yasuyoshi)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60202082

### (2) 研究分担者

寶閑 淳(HOSEKI, Jun)  
京都大学・大学院農学研究科・特任准教授  
研究者番号：40423058

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし