

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05788

研究課題名（和文）pHストレス適応を司るpH誘導型転写因子の実体解明

研究課題名（英文）Identification of pH-induced transcription factors governing pH stress adaptation

研究代表者

高橋 重成 (Takahashi, Nobuaki)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70604635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 29,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではpHに対する生物学的理解に変革を起こすべく、pH誘導型転写因子の同定という生命科学の最重要課題の一つに挑むことを主たる目的とした。具体的には、低pH刺激による遺伝子発現誘導に必要なエンハンサー領域を同定した後、質量分析を用いた実験により本領域に結合するタンパク質を網羅的に同定することで、pH誘導型転写因子の候補遺伝子群をおよそ400種類見出した。今後は、それぞれの候補遺伝子群をCRISPR-Cas9技術を用いて遺伝子欠損させ、pH刺激に対する応答が減弱する遺伝子群を同定することで、pH誘導型転写因子を最終決定させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレス誘導型転写因子NRF2や低酸素ストレス誘導型転写因子HIFの発見が及ぼした歴史、またpHが司る生物学的枢要性・多様性を考えると、pH誘導型転写因子の同定により現代の生物学の常識を超えた新規生命現象が見えてくることは間違いなく、かつ多くの研究における源流になることが期待される。またpH異常は事実上すべての疾患に関わっていることが予想されるため、創薬の観点でも非常に重要な知見を得ることになる。

研究成果の概要（英文）：The primary objective of this study was to address one of the most crucial challenges in life sciences, which is the identification of pH-induced transcription factors, with the aim of revolutionizing the biological understanding of pH. Specifically, after identifying enhancer regions required for gene expression induction by low pH stimuli, we extensively identified proteins binding to these regions through mass spectrometry experiments, resulting in the discovery of approximately 400 candidate genes for pH-induced transcription factors. Moving forward, we plan to use CRISPR-Cas9 technology to disrupt each candidate gene and identify those whose response to pH stimuli is attenuated, thereby finalizing the pH-induced transcription factors.

研究分野：分子生物化学

キーワード：pH

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は約 15 年に渡り「生体が如何にして酸化ストレスや低酸素を感知し、応答・適応しているのか？」研究しており、これまで世界的に優れた研究業績をあげてきた (Takahashi N, Nature Chem Biol 2011; Nature Commun 2014; Cancer Cell 2018; Mol Cell 2020 等)。このような研究過程で、研究代表者はある興味深い点に気がついた。それは、酸化ストレス・低酸素と並び代表的なストレスである「pH 変化」においては、生物学的理解が驚くほど進んでいないという事実である。

生体内の細胞は様々な物理的、化学的ストレスにさらされながら生存している。特にがん細胞は、正常細胞に比べて特に厳しい酸化、低酸素、低 pH などのストレスにさらされており、生体が有する様々なストレス応答機能を巧妙に利用・発展させることで生存している。一般的に、我々の体には大きく分けて 2 つのストレス感知・応答システムが備わっている。1 つ目は、形質膜上に存在するイオンチャネルが担っており、細胞(内)外のストレスを感知し、活性化するとイオンシグナル (Ca²⁺シグナルや脱分極) を介して増殖・分化や神経活動など多彩な細胞応答を惹起する。2 つ目は、細胞内に存在するストレスセンサータンパク質が特定の「ストレス誘導型転写因子」を活性化することで、抗ストレス遺伝子群の発現を誘導する。

酸化ストレスセンサーチャネルとして、研究代表者らはこれまでに一群の Ca²⁺透過型 TRP チャネルを同定してきた (Yoshida T, Nature Chem Biol 2006; Yamamoto S, Nature Med 2008; Takahashi N, Nature Chem Biol 2011; Takahashi N, Nature Commun 2014; Takahashi N, Cancer Cell 2018)。また提案者は、TRPA1 チャネルが穏やかな低酸素に対するセンサーとして機能し、呼吸活動を介して体内に取り込む酸素供給量を制御することを示した (Takahashi N, Nature Chem Biol 2011)。pH センサーチャネルとしては、一部の K⁺チャネル及び ASIC チャネルが同定されており、血中 CO₂ レベルの増大に伴う細胞外 pH 減少を感知し、心肺活動等を制御している可能性がある。提案者は、いくつかの TRP チャネルが pH センサーとして機能することも見出している (Takahashi N, Channels 2008+未発表)。

酸化ストレス誘導型転写因子 NRF2 と低酸素誘導型転写因子 HIF の同定は、現代生命科学史に刻まれる偉大な功績であり、様々な生命現象の分子機構解明に貢献した (低酸素生物学: 2019 年ノーベル生理学・医学賞)。NRF2 は山本雅之らのグループによって同定され (Itoh, BBRC 1997; 引用数 >3,900)、NQO1 や GCLM 等をはじめとした様々な抗酸化に関わる遺伝子群の発現を誘導する。NRF2 自身は酸化センサーとして機能するわけではなく、NRF2 結合タンパク質である KEAP1 が酸化センサーとして働き、NRF2 の活性を制御している。近年、NRF2 が抗酸化タンパク質のみならず、解糖系に関わる遺伝子群の発現を誘導することが明らかになり (Mitsuhashi Y, Cancer Cell 2012)。「酸化ストレスと代謝」という新概念が形成されつつある。特にここ 10 年間は、NRF2 の恒常活性化を引き起こす遺伝子変動が様々な腫瘍において、しかも高頻度に認められることがわかり、がん分野において世界規模で非常に盛んに研究が進められている。

HIF は Gregg Semenza のグループによって同定 (Semenza GL, Mol Cell Biol 1992; 引用数 >3,600) 遺伝子クローニングされ (Wang GL, PNAS 1995; 引用数 >7,000) 造血因子 EPO や血管新生因子 VEGF 等の抗低酸素化に関わる遺伝子群の発現を誘導する。HIF 自身は低酸素センサーとして機能しているわけではなく、HIF 結合タンパク質であるプロリン水酸化酵素群 (PHDs) が主に低酸素感知に関わっている。その後の研究により、HIF は血管新生、代謝リプログラミング、発生・幹細胞制御など多様な低酸素応答を誘導することがわかり、がん病態をはじめとした様々な生命現象の解明に貢献した。以上のように、ストレス誘導型転写因子の同定は生命科学研究において所謂「0 を 1 にする」ような効果を持っており、転写因子の同定を皮切りに新たな学術領域が一気に花開くことになる。しかしながら、抗 pH ストレス応答を司る pH 誘導型転写因子は未だ発見されていない。

事実上、全タンパク質は pH 変化に伴い三次元構造・機能が失われてしまう。実際、細胞培養に必要な“CO₂”インキュベーターは NaHCO₃ を含む培地の pH レベルを 7.4 付近に保つために使用されており、pH 制御が細胞生存に必須のパラメータであることが良くわかる。このように、pH は生物化学反応において最も Fundamental な因子の一つであり、定常状態からの逸脱は細胞にとって甚大なダメージを与える。しかし、呼吸を含めた代謝反応の多くは H⁺を生み出す反応であり、生命体は常に pH 変動の危機と隣り合わせである。特にがん細胞は一般的に解糖系 (1 グルコースあたり 2H⁺を産生) が亢進しているため pH の低下が顕著であり、酸化ストレスや低酸素にも増して固形がんの代表的な特徴 (Hallmark) である。細胞内で産生された H⁺は Na⁺/H⁺交換体などのトランスポーター、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase: CA) などによって細胞外へ放出されることで、細胞内 pH の恒常性が保たれている。このように、生体には細胞内 pH の恒常性を維持する「アダプター」が存在しており、それらは古くから研究されている。しかし、細胞内 pH レベルを感知し、システムを駆動する制御分子系はその実体が全く明らかにされていない。現状の理解では、HIF が H⁺排出系遺伝子群を一部制御すると考えられているが (Semenza GL, J Clin Invest 2013) HIF は pH 変動によって活性が制御されているわけではなく、pH 適応機構を担う責任分子とは言い難い。

2. 研究の目的

本研究では pH に対する「生物学的」理解に変革を起こすべく、pH 誘導型転写因子の同定という生命科学の最重要課題の一つに果敢に挑み、解き明かすことを主たる目的とする。本研究テーマは、化学・神経科学・がん生物学・分子進化学という一般的な研究者とは異なるユニークなバックグラウンドを持つ高橋だからこそ着想に至ったものであり、独創的であるといえる。NRF2 や HIF の発見が及ぼした歴史、また pH が司る生物学的枢要性・多様性を考えると、pH 誘導型転写因子の同定により現代の生物学の常識を超えた新規生命現象が見えてくることは間違いない。

3. 研究の方法

pH 誘導型転写因子の同定には 2 種類の戦略を用いる。(A) DNA 切断能を有していない不活性化 Cas9 (deactivated Cas9: dCas9) を用いた in situ アッセイ系 (Liu, Cell 2017) と (B) CRISPR Screening を用いた方法である。これら戦略を同時に進めることで、既存の転写因子に捉われることなく、できる限り unbiased に候補を選出する。さらに、得られた候補群に対し、過剰発現やノックアウトを用いた個別アッセイを行うことで、最終的な pH 誘導型転写因子を決定する。

戦略 A: dCas9 を用いた in situ アッセイ系による同定

まず、低 pH 刺激により特に顕著な発現増加が認められた SLC16A3、SLC9A7 に注目し、遺伝子発現の誘導に必須なプロモーター領域を、luciferase reporter assay により同定する。その後、本遺伝子配列に特異的に結合する sgRNA と dCas9 を細胞に導入後、ゲノム回収、shearing によるゲノム断片化を行った後、Cas9 抗体を用いた免疫沈降により dCas9-DNA-転写因子の複合体を得る。その後、質量分析によるタンパク質同定を行い、戦略 B と共通する分子を探ることで候補を絞り込む。

戦略 B: CRISPR Screening による同定

本戦略は、遺伝子クローニングの大家である長田 重一 (大阪大学) の伝統を継承する圓岡 (研究分担者) と鈴木 淳 (研究協力者: 京都大学) が中心となり、リン脂質スクランブラーゼを同定した手法を基軸とした Expression Cloning を応用して行う (Suzuki, Nature 2010)。まず、CRISPR-Cas9 技術を用いて、SLC16A3、SLC9A7 の上流に GFP を組み込んだノックイン細胞株を樹立する。続いて、CRISPR library を遺伝子導入することで、pH 刺激に対する GFP 蛍光の増大が減弱する遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

まず腫瘍で特に発現増加が認められるプロトン排出系タンパク質 8 種類が、低 pH 刺激により発現増加することをおよそ 15 種類の肺がん細胞株を使った実験により明らかにした。即ち、細胞には低 pH 刺激応答してプロトン排出系タンパク質の発現誘導が行われるシステム (pH 誘導型転写因子) が存在していることが強く示唆された。続いて、pH 低下で特に強く発現誘導することが明らかになったプロトン排出系遺伝子に注目し、CRISPR-Cas9 技術を駆使したゲノム編集および単一細胞クローニングを行うことで当該プロトン排出系遺伝子の上流および下流およそ 2,000 bp において、200-300 bp ずつゲノム領域を欠損させた細胞株を計 14 種類作出し、低 pH 刺激に対する当該プロトン排出系遺伝子の発現誘導を評価した。その結果、当該プロトン排出系遺伝子の上流ゲノム領域 (約 300 bp) が低 pH 刺激による発現誘導に重要であること、即ち pH 誘導型転写因子のゲノム結合領域を含むことが強く示唆された。また、本転写因子結合領域に結合するタンパク質について質量分析を用いて同定し、さらに圓岡 (研究分担者) においては、低 pH 刺激により発現増加が認められた遺伝子の上流に GFP を組み込んだノックイン細胞株の樹立し CRISPR Screening を行うことで、最終的に質量分析を用いた実験結果と併せておよそ 400 種類の pH 誘導型転写因子の候補遺伝子群を同定した。

現在、この候補遺伝子群について、一つずつ CRISPR-Cas9 技術を用いて遺伝子欠損株を作成しており、およそ 50 種類の遺伝子については pH 刺激に対する応答の解析が完了している状況である。今後は全ての候補遺伝子群について解析を完了させることで、pH 誘導型転写因子を最終決定させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi N, Cho P, Selfors LM, Kuiken HJ, Kaul R, Fujiwara T, Harris IS, Zhang T, Gygi SP, and Brugge JS	4. 巻 80
2. 論文標題 3D Culture Models with CRISPR Screens Reveal Hyperactive NRF2 as a Prerequisite for Spheroid Formation via Regulation of Proliferation and Ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 828-844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2020.10.010	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 該当する

1. 著者名 Nakao A, Matsunaga Y, Hayashida K, Takahashi N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of Oxidative Stress and Ca ²⁺ Signaling in Psychiatric Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 615569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.615569	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 Kida T, Takahashi N (Co-first author), Mori MX, Sun JH, Oota H, Nishino K, Okauchi T, Ochi Y, Kano D, Tateishi U, Watanabe Y, Cui Y, Mori Y, Doi H.	4. 巻 13
2. 論文標題 N-Methylamide-structured SB366791 derivatives with high TRPV1 antagonistic activity: toward PET radiotracers to visualize TRPV1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1197 ~ 1204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2md00158f	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10件（うち招待講演 10件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高橋 重成
2. 発表標題 pHストレス・酸化ストレスの連関
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Molecular evolutionary study reveals TRPA1 channel as the hypoxic stress sensor that regulates blood supply to the fetus in maternal anemia
3. 学会等名 8th IRCMS seminar at Kumamoto University (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 重成
2. 発表標題 がん細胞による酸化ストレス適応戦略
3. 学会等名 京都大学臨床×工学(化学)異分野交流会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Oxidative Stress Defense in Cancer
3. 学会等名 Smart Aging Research Center at Tohoku University (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Oxidative Stress Defense Programs in Cancer
3. 学会等名 Cancer Program Meeting in Broad Institute of MIT (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 重成
2. 発表標題 腫瘍内H2O2イメージングにより明らかになった新規がん酸化ストレス防御機構
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 重成
2. 発表標題 腫瘍内H2O2イメージングにより明らかになった新規がん酸化ストレス防御機構
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Oxidative Stress Defense Programs in Cancer
3. 学会等名 Redox week in Sendai 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Oxidative Stress Defense Programs in Cancer
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuaki Takahashi
2. 発表標題 Oxidative Stress Defense Programs in Cancer
3. 学会等名 ION CHANNELS & CANCER MEETING 2022 in France (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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	圓岡 真宏 (Maruoka Masahiro) (70736412)	京都大学・高等研究院・特定助教 (14301)	

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